



## **EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME METABÒLICA EN RATES.**

**Núria Taltavull Anglada**

**Dipòsit Legal: T 1346-2015**

**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 ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

# **EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME METABÒLICA EN RATES**

Núria Taltavull Anglada

Tesi doctoral

Reus, 2015



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015



FEM CONSTAR que aquest treball, titulat " Efecte dels àcids grassos Omega-3 d'origen marí i els polifenols sobre la síndrome metabòlica en rates", que presenta Núria Taltavull Anglada per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

Reus, 28 de Maig de 2015

Les directores de la tesi doctoral

Dra. M. Rosa Nogués LLort

Dra. Marta Romeu Ferran

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

**Autorització del director/a o codirector/s/a/es de la tesi doctoral**

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral : Efecte dels àcids grassos omega-3 d'origen marí i els polifenols sobre la síndrome metabòlica en rates.	
Doctorand/a : Núria Taltavull Anglada	
Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau <small>Biomedicina</small>	
Departament <small>Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques</small>	Grup de recerca : Farmacobiologia Cel·lular
Director/a <small>M. Rosa Nogués Llorc</small>	Correu electrònic del Director/a <small>mariorosa.nogues@urv.cat</small>
Codirector/a <small>Marta Romeu Ferran</small>	Correu electrònic del/de la Codirector/a <small>marta.romeu@urv.cat</small>
Tutor/a (si s'escau)	Correu electrònic del/la Tutor/a

INFORME DEL DIRECTOR/A DE TESI		
El/s (co)director/s sotasignats emeten informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat:		
	SÍ	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Les hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La metodologia està descrita	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hi consta el procediment	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
La bibliografia està ben reflectida	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
- Molinar Torribio E, Ramos-Romero S, et al. Combined action of omega-3 PUFAs and procyanidins on rat model of diet induced metabolic alterations. Article en fase de revisió.		
- Taltavull N, Ras R, et al. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on incipient liver insulin resistance: A lipidomic approach. Article en fase de revisió.		
Altres comentaris sobre la qualitat de la tesi:		

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública.

Reus \_\_\_\_\_, 28 de Maig de 2015



CPISR-1 C  
Maria Rosa  
Nogués Llorc  
2015.05.27  
10:44:25 +02'00'

Director/a de la tesi

M. Rosa Nogués Llorc

Codirector/a (si s'escau)

Marta Romeu Ferran

Codirector/a (si s'escau)



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

*Aquesta tesi està dedicada a n'Edu,*

*sa meua família*

*i a n'Ian, es meu fillol.*

*"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 "S de Beauvoir". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal line.

*Simone de Beauvoir (1908-1986)*

*Jo vos tenc a voltros.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

*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, which appears to be 'M. Gandhi', written in a cursive style.

*Mahatma Gandhi (1869-1948)*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

<b>Índex</b>	<b>Pàg.</b>
Certificat de la direcció de tesis.....	II
Informe de les directores de tesi doctoral.....	IV
Índex general.....	IX
Índex de figures.....	XV
Índex de taules.....	XVII
Abreviatures.....	XIX

## **Introducció**

### **Capítol I: Conceptes**

<b>1. ELS ÀCIDS GRASSOS POLINSATURATS OMEGA-3</b>	<b>1</b>
1.1. Definició i classificació.....	1
1.2. El paper fisiològic dels AGPI.....	4
1.3. Fonts alimentàries d'AGPI .....	9
1.5. Recomanacions nutricionals d'AGPI.....	11
<b>2. LA SÍNDROME METABÒLICA</b>	<b>12</b>
2.1. Definició i diagnòstic.....	12
2.2. Fisiopatologia.....	13
2.2.1. Disfunció del teixit adipós.....	17
2.2.2. Fetge gras no alcohòlic i inflamació hepàtica .....	18
2.2.3. Lesió endotelial .....	19
2.2.4. Alteracions renals.....	21
2.2.3. Models per a l'estudi de la síndrome metabòlica.....	22
<b>3. ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>24</b>
3.1. Els radicals lliures i les espècies reactives de l'oxigen.....	24
3.2. Estrès oxidatiu i sistemes antioxidants.....	26
3.3. L'estrès oxidatiu i la seva determinació al laboratori.....	28
<b>4. POLIFENOLS</b>	<b>31</b>
4.1. Definició i classificació dels polifenols.....	31
4.2. Efectes sobre la salut.....	33
4.3. Ingesta i biodisponibilitat dels polifenols.....	34

### **Capítol II: Interrelacions**

<b>1. AGPI OMEGA-3 I LA SÍNDROME METABÒLICA</b>	<b>39</b>
1.1. AGPI omega-3 i obesitat.....	39

1.2. AGPI omega-3 i resistència a la insulina.....	40
1.3. AGPI omega-3 i hipertriglicreidèmia.....	40
1.4. AGPI omega-3 i hipertensió arterial.....	43
<b>2. SÍNDROME METÀBOLICA I ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>44</b>
<b>3. L'ESTRÈS OXIDATIU I ELS AGPI OMEGA-3</b>	<b>45</b>
3.1. La peroxidació lipídica: la limitació dels AGPI omega-3.....	45
<b>4. L'ESTRÈS OXIDATIU, ELS AGPI I ELS POLIFENOLS</b>	<b>48</b>
<b>5. ELS POLIFENOLS I LA SÍNDROME METABÒLICA</b>	<b>49</b>

## Hipòtesi i objectius

Hipòtesi.....	54
Objectius.....	55

## Material i mètodes

<b>1. DISSENY DE L'EXPERIMENT</b>	<b>59</b>
1.1. Model animal.....	60
1.2. Dietes.....	61
1. Dieta estàndard.....	61
2. Dieta <i>high fat/high sucrose</i> (HFHS).....	63
<b>2. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES</b>	<b>65</b>
2.1. Mostres de sang total.....	66
2.2. Mostres d'eritròcits.....	67
2.3. Mostres de plasma.....	68
2.4. Mostres de teixits.....	68
<b>3. ESTUDI DELS PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'SM</b>	<b>69</b>
3.1. Pes corporal.....	69
3.2. Pressió arterial.....	69
3.3. Glucosa.....	69
3.4. Insulina.....	70
3.5. Hemoglobina glicosilada (HbA1c).....	71
3.6. Perfil lipídic.....	72
3.6.1. Colesterol total .....	72
3.6.2. Triglicèrids (TG).....	73
3.6.3. Colesterol HDL.....	74
3.6.4. Colesterol LDL .....	75

<b>4. ESTUDI DELS PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'ESTRÈS OXIDATIU</b>	<b>75</b>
4.1. Mostres de sang.....	75
4.1.1. Determinacions prèvies.....	75
4.1.1.1. Hemoglobina (Hb).....	76
4.1.1.2. Hematòcrit (HTC).....	76
4.1.2. Sistemes antioxidants enzimàtics.....	77
4.1.2.1. Superòxid dismutasa (SOD).....	77
4.1.2.2. Catalasa (CAT).....	78
4.1.2.3. Glutatió reductasa (GR).....	79
4.1.2.4. Glutatió peroxidasa (GPx).....	80
4.1.3. Capacitat antioxidant del plasma (ORAC).....	80
4.2. Mostres de fetge.....	81
4.2.1. Obtenció de la fracció soluble.....	81
4.2.2. Obtenció del liofilitzat per lipidòmica.....	82
4.2.3. Determinacions prèvies.....	82
4.2.3.1. Proteïnes.....	83
4.2.4. Sistemes antioxidants enzimàtics.....	83
4.2.5. Sistemes antioxidants no enzimàtics, sistema glutatió.....	84
4.2.6. Marcadors d'inflamació.....	85
4.2.7. Contingut lipídic - lipidòmica.....	86
4.2.7.1. Anàlisi de diacilglicerols.....	87
4.2.7.2. Anàlisi de ceramides.....	88
4.3. Mostres de pinsos.....	89
4.3.1. Determinacions prèvies.....	89
4.3.1.1. Extracció de la fracció lipòfila dels pinsos.....	89
4.3.1.2. Extracció de la fracció hidrofílica dels pinsos.....	90
4.3.2. Capacitat antioxidant total.....	91
<b>5. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC</b>	<b>92</b>
<b>6. ANÀLISI ESTADÍSTICA</b>	<b>94</b>

## Resultats i discussió

<b>1. INGESTA CALÒRICA I COMPOSICIÓ NUTRICIONAL</b>	<b>99</b>
1.1. Ingesta i composició de la dieta estàndard.....	99
1.2. Ingesta i composició de la dieta HFHS.....	102
1.3. Ingesta energètica total.....	104
1.4. Capacitat antioxidant dels pinsos ingerits.....	107



<b>2. PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'SM</b>	<b>109</b>
2.1. Pes corporal.....	109
2.2. Greix corporal.....	114
2.3. Perfil lipídic.....	115
2.3.1. Colesterol total .....	115
2.3.2. Triglicèrids (TG).....	117
2.3.3. Colesterol HDL .....	118
2.3.4. Colesterol LDL .....	119
2.3.5. Ràtio HDL/LDL.....	120
2.3.6. Ràtio TG/HDL.....	122
2.4. Pressió arterial.....	122
2.5. Metabolisme de la glucosa.....	123
2.5.1. Glucèmia.....	123
2.5.2. Insulina.....	123
2.5.3. Hemoglobina glicosilada (HbA1c).....	125
2.5.4. Índex HOMA.....	125
2.6. Valoració global.....	127
<b>3. PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'ESTRÈS OXIDATIU A LA SANG</b>	<b>130</b>
3.1. Sistemes antioxidants enzimàtics als eritròcits.....	131
3.1.1. SOD eritrocitària .....	131
3.1.2. CAT.....	131
3.1.3. GR i Gpx .....	133
3.2. Capacitat antioxidant total del plasma (ORAC).....	134
3.3. Valoració global.....	134
<b>4. PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'ESTRÈS OXIDATIU AL FETGE</b>	<b>137</b>
4.1. Sistemes antioxidants enzimàtics .....	138
4.2. Sistemes antioxidants no enzimàtics .....	138
4.2.1. GSH.....	138
4.2.2. GSSG.....	138
4.2.3. GSSG/GSH.....	138
4.3. Dany oxidatiu.....	139
4.3.1. TBARS.....	139
<b>5. PARÀMETRES D'INFLAMACIÓ AL FETGE</b>	<b>140</b>
5.1. PCR.....	141
5.2. TNF $\alpha$ .....	142
5.3. ICAM-1.....	143
5.4. Valoració global.....	143

<b>6. LIPIDÒMICA</b>	<b>144</b>
6.1. TAG.....	152
6.2. DAG.....	158
6.3. MAG.....	164
6.4. Ceramides.....	166
<b>7. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC</b>	<b>172</b>
7.1. Aorta.....	172
7.2. Fetge.....	175
7.3. Ronyó.....	178
7.4. Teixit adipós.....	178
7.4.1. Mida variable.....	178
7.4.2. Macròfags.....	178
7.4.3. Mastòcits.....	179
7.4.4. Inflamació.....	179
7.5. Valoració global.....	180

## Discussió global

Discussió global.....	185
-----------------------	-----

## Conclusions

Conclusions.....	195
------------------	-----

## Bibliografia

Bibliografia.....	199
-------------------	-----

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

<b>Índex de figures</b>	<b>Pàg.</b>
<b>Figura 1.</b> Tipus d'àcids grassos.....	1
<b>Figura 2.</b> Biosíntesi d'AGPI de cadena llarga omega-6 i omega-3.....	3
<b>Figura 3.</b> Repercussió funcional del greix alimentari.....	5
<b>Figura 4.</b> Efecte dels AGPI sobre la resolució de la inflamació.....	8
<b>Figura 5.</b> Composició lipídica de les principals espècies .....	10
<b>Figura 6.</b> Fisiopatologia de l'SM.....	16
<b>Figura 7.</b> Cicle adipòcit- cèl·lula inflamatòria.....	18
<b>Figura 8.</b> Evolució del fetge gras no alcohòlic a fibrosi.....	19
<b>Figura 9.</b> Progressió de la placa d'ateroma.....	20
<b>Figura 10.</b> Models animals d'SM induïda.....	23
<b>Figura 11.</b> Sistemes antioxidants endògens.....	27
<b>Figura 12.</b> Mètodes per a la detecció d'RLL i altres espècies reactives.....	30
<b>Figura 13.</b> Compostos fenòlics.....	33
<b>Figura 14.</b> Absorció i distribució de polifenols.....	36
<b>Figura 15.</b> Peroxidació lipídica.....	46
<b>Figura 16.</b> Peroxidació lipídica de les membranes.....	47
<b>Figura 17.</b> Disseny i cronologia de l'experiment.....	59

<b>Figura 18.</b> Elaboració i composició dels pinsos.....	65
<b>Figura 19.</b> Resum de l'obtenció de mostres.....	66
<b>Figura 20.</b> Mesura de la pressió i la glucosa.....	70
<b>Figura 21.</b> Determinació de l'hematòcrit.....	77
<b>Figura 22.</b> Obtenció de les mostres per lipidòmica.....	82
<b>Figura 23.</b> Extracció dels pinsos per a l'anàlisi de la capacitat antioxidant.....	91
<b>Figura 24.</b> Composició nutricional de dieta estàndard.....	99
<b>Figura 25.</b> Composició nutricional de la dieta HFHS.....	102
<b>Figura 26.</b> Estadi en la progressió de l'SM.....	129
<b>Figura 27.</b> Contingut en TAG.....	154
<b>Figura 28.</b> TAG: Anàlisi de component principal.....	155
<b>Figura 29.</b> TAG hepàtics totals.....	156
<b>Figura 30.</b> Mecanismes d'acció implicats amb cúmul de TAG al fetge.....	158
<b>Figura 31.</b> Contingut en DAG.....	159
<b>Figura 32.</b> DAG: Anàlisi de component principal.....	162
<b>Figura 33.</b> DAG hepàtics totals.....	163
<b>Figura 34.</b> Contingut en MAG.....	164
<b>Figura 35.</b> Contingut en ceramides.....	167

<b>Figura 36.</b> Ceramides: Anàlisi de component principal.....	168
<b>Figura 37.</b> Ceramides hepàtiques totals.....	169
<b>Figura 38.</b> Ceramides: Anàlisi de component principal per tractaments.....	171
<b>Figura 39.</b> Variables categòriques analitzades a l'aorta.....	174
<b>Figura 40.</b> Esteatosi.....	175
<b>Figura 41.</b> Inflamació teixit adipós.....	180

<b>Índex de taules</b>	<b>Pàg.</b>
------------------------	-------------

<b>Taula 1.</b> Criteris de definició de la síndrome metabòlica.....	13
<b>Taula 2.</b> Espècies reactives de l'oxigen i sistemes antioxidants.....	26
<b>Taula 3.</b> Composició del pinso estàndard i dels diferents tractaments.....	62
<b>Taula 4.</b> Composició del pinso HFHS i dels diferents tractaments.....	64
<b>Taula 5.</b> Dilucions necessàries en el cas del fetge.....	84
<b>Taula 6.</b> Categorització de les variables estudiades en cadascun dels teixits.....	93
<b>Taula 7.</b> Kcal/dia.....	105
<b>Taula 8.</b> ORAC mmol TE/ mg mostra sòlida.....	107
<b>Taula 9.</b> Paràmetres relacionats amb l'SM.....	112
<b>Taula 10.</b> Valoració global de l'SM.....	127
<b>Taula 11.</b> Estrès oxidatiu en sang.....	130

<b>Taula 12.</b> Estrès oxidatiu en fetge.....	136
<b>Taula 13.</b> Inflamació en fetge.....	140
<b>Taula 14.</b> Perfil lipídic hepàtic en rates estàndard.....	146
<b>Taula 15.</b> Perfil lipídic hepàtic en rates HFHS.....	148
<b>Taula 16.</b> Diferències perfils lipídics hepàtics entre dietes.....	151
<b>Taula 17.</b> Variables quantitatives analitzades en l'aorta.....	172
<b>Taula 18.</b> Localització de l'esteatosi.....	176
<b>Taula 19.</b> Teixit adipós.....	178

## Abreviatures

<b>A</b>	AA	àcid araquidònic
	AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane)dilhydrochloride
	Ac	anticòs
	ACN	acetonitril
	ADP	adenosin-5-difosfat
	AG	àcids grassos
	AGPI	àcids grassos poliinsaturats
	AHA	American Heart Association
	ALA	àcid alfa linolènic
	ATP	adenosina trifosfat
	Avidina-HRP	peroxidasa de rave picant conjugat a avidina
<b>C</b>	CAT	catalasa
	Cer	ceramida
	COL	colesterol
	CH <sub>2</sub> O	formol
	CHE	colesterol esterasa
	CHOD	colesterol oxidasa
	CSIC	Consell Superior d'Investigacions Científiques
<b>D</b>	DAG	diacilglicerol
	DAP	dihidroxiacetona fosfat
	DGAT	diacil glicerol acil transferasa
	DGLA	àcid di-homo gamma linoleic
	DHA	àcid docosahexaenoic
	DM	diabetis mellitus
	D.O	densitat òptica
	DPA	àcid docosapentaenoic
	<b>E</b>	EDTA
EFSA		Agència Europea de Seguretat Alimentària
ELISA		assaig immunosorvent lligat a enzim
EO		estrès oxidatiu
ERO		espècies reactives de l'oxigen
EPA		àcid eicosopentaenoic
<b>F</b>	FAO	Food and Agriculture Organization of the
	United Nations	
	FL	fluoresceïna



	FRS	<i>free radical scavengers</i>
<b>G</b>	GK	glicerol cinasa
	GLUT-2	transportador de glucosa-2
	GLP-1	pèptid similar al glucagó tipus 1
	GPO	glicerolfosfatdeshidrogenasa
	GPx	glutatió peroxidasa
	GR	glutatió reductasa
	GSH	glutatió reduït
	GSSG	glutatió oxidat
	G3P	glicerol-3-fosfat
<b>H</b>	Hb	hemoglobina
	HbA1c	hemoglobina glicosil·lada
	HCl	àcid clorhídric
	HDL	lipoproteïnes d'alta densitat
	HF	<i>high fat</i>
	HFHS	<i>high fat, high sucrose</i>
	HOMA (index)	<i>homeostasis model assessment</i>
	HTA	hipertensió arterial
	HTC	hematòcrit
	HS	<i>high sucrose</i>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peròxid d'hidrogen
<b>I</b>	ICAM	molècula d'adhesió intercel·lular
	IDF	International Diabetes Federation
	IGF-1	factor de creixement insulínic -1
	IGF-2	factor de creixement insulínic -2
	IMC	índex de massa corporal
	IL-6	interleucina-6
	IQA	Institut de Química Avançada de Catalunya
	IR	insulinoresistència
<b>L</b>	L <sup>·</sup>	radical d'àcid gras
	LA	àcid linoleic
	LC-MS	<i>liquid chromatography–mass spectrometry</i>
	LDL	lipoproteïna de baixa densitat
	LDL-ox	lipoproteïna de baixa densitat oxidada
	LOOH	hidroperòxid d'àcid gras
	LO <sup>2·</sup>	radical peroxil
	LPL	lipoproteïnlipasa
<b>M</b>	MAG	monoacilglicerol

	MAPK	MAP Quinases
	MCP-1	proteïna quimioattractant dels macròfags -1
	MCV	malaltia cardiovascular
	MS/MS	espectrometria de masses
<b>N</b>	NAFLD	fetge gras no alcohòlic
	NASH	esteohepatitis no alcohòlica
	NADPH	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat
	NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat oxidat
	NCEP ATP-III treatment	National Cholesterol Education Program-adult treatment
	NEM	N-etilmaleimida
	NF-κB	factor de transcripció nuclear Kappa-beta
	NOS	òxid nítric sintasa
<b>O</b>	OH·	radical hidroxil
	OMS	Organització Mundial de la Salut
	OPT	o-ftalaldehid
	ORAC	<i>oxygen radical absorption capacity</i>
	O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	radical superòxid
	·OOH	radical peroxil
<b>P</b>	PA	pressió arterial
	PAI- 1	inhibidor de l'activador de plasminogen-1
	PCR	proteïna C reactiva
	PG	prostaglandina
	PPAR	receptor de l'activador de la proliferació de peroxisomes
	Psi	<i>pounds-force per square inch</i>
<b>Q</b>	qQq	triple quadrupol
	q-TOF	<i>quadrupole-time-of-flight</i>
<b>R</b>	RLL	radical lliure
<b>S</b>	SM	síndrome metabòlica
	SHROB	rates obeses espontàniament hipertenses
	SOD	superòxid dismutasa
	SREBP-1c	proteïna d'unió a l'element regulador dels esterols 1c
<b>T</b>	TAG	triacilglicerol
	TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
	TCA	àcid tricloracètic

	TCOL	colesterol total
	TE	equivalents de TROLOX
	TG	triglicèrids
	TMB	3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina
	TNF- $\alpha$	factor de necrosi tumoral- $\alpha$
	TLR-4	<i>Tolllike receptor-4</i>
	TROLOX carboxílic	àcid 6-hidroxi2,5,7,8-tetrametilcroman-2
U	UHPLC	<i>ultra high performance liquid chromatography</i>
V	V	volt
	VCAM-1	molècula d'adhesió vascular-1
	VLDL	lipoproteïna de molt baixa densitat
	4-AF	4-aminofenazona



# *Introducció*

## *Capítol I: Conceptes*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

# 1. ELS ÀCIDS GRASSOS POLIINSATURATS OMEGA-3

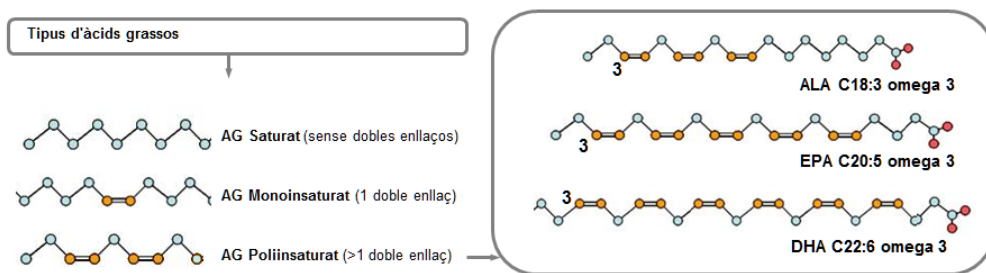
## 1.1 DEFINICIÓ I CLASSIFICACIÓ DELS AGPI

Els àcids grassos (AG) són compostos orgànics formats per una cadena hidrocarbonatada i un grup carboxílic.

Els AG presents en els éssers vius tenen, en la seva majoria, un nombre parell d'àtoms de carboni i es classifiquen en saturats o insaturats segons el nombre de dobles enllaços que hi hagi en la seva estructura química. Així, els àcids grassos poliinsaturats (AGPI) són AG que contenen en la seva estructura química dos o més dobles enllaços, d'aquí el nom d'*àcids grassos poliinsaturats* (figura 1).

El terme *omega-3*, *n-3* o  $\omega-3$  prové de la classificació estructural de la família dels AGPI de cadena llarga. Aquest terme descriu la posició d'un doble enllaç situat en el carboni 3 de la cadena hidrocarbonatada (Calder, 2011). (Figura 1.)

Figura 1. Tipus d'àcids grassos



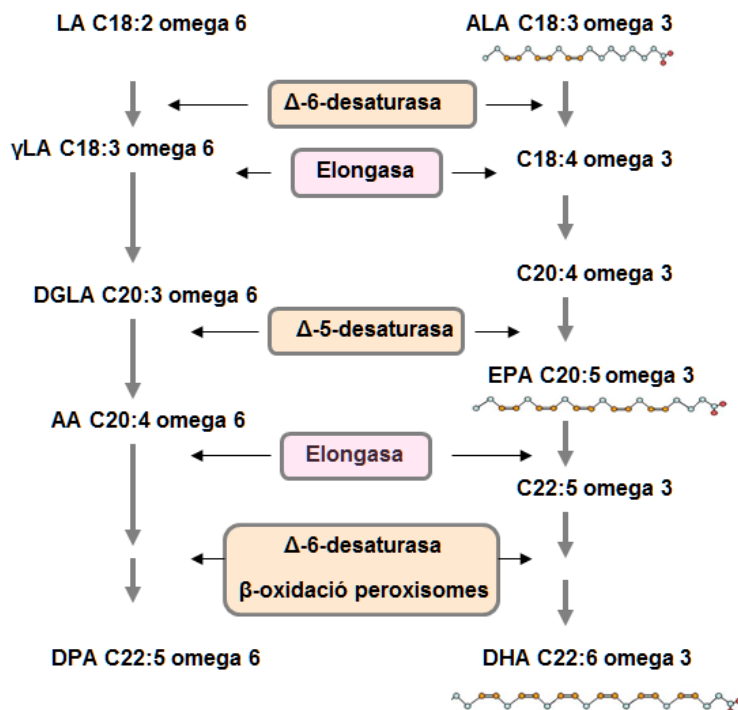
ALA: àcid  $\alpha$ -linolènic, de l'anglès *Alpha Linolenic Acid*; EPA: àcid eicosapentaenoic, de l'anglès *EicosaPentaenoic Acid*; DHA: àcid docosahexaenoic, de l'anglès *DocosaHexaenoic Acid*

Els AGPI de cadena llarga són essencials per a l'ésser humà, és a dir, tenen la característica que no poden ser sintetitzats per l'organisme, sinó que han de ser consumits per mitjà de la dieta.

El paper d'aquesta essencialitat recau en l'existència de dos tipus d'enzims anomenats *desaturases* i *elongases* (figura 2). Aquests enzims són els encarregats d'afegir dobles enllaços a la cadena hidrocarbonatada, és a dir, d'insaturar els AG. Els mamífers no disposem de l'enzim necessari per incorporar més dobles enllaços a partir del carboni 9. Per tant, els AG poliinsaturats de cadena llarga (més de 9 carbonis), o bé s'han de sintetitzar a partir d'un precursor (Acid  $\alpha$ -linolènic [ALA] en el cas dels omega-3) o bé han d'estar presents en la dieta, ja que la manca de desaturasa fa impossible la seva síntesi *de novo*.

L'essentialitat és una característica que els AGPI omega-3 comparteixen amb uns altres AGPI essencials anomenats AGPI omega-6. Diferents estudis, tant *in vitro* com *in vivo*, han demostrat que aquestes dues famílies d'AGPI no només comparteixen aquests enzims per a la seva síntesi, sinó que també competeixen pels mateixos (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009). (Figura 2.) Així doncs, l'equilibri es pot desplaçar cap un costat o cap a l'altre en funció de la ingesta de precursors, àcid linoleic (LA) en el cas dels omega-6 i ALA en el cas dels omega-3.

**Figura 2: Biosíntesi d'AGPI de cadena llarga omega-6 i omega-3**



**Biosíntesi dels AGPI de cadena llarga omega 6 i omega 3; Família omega 6:** LA: àcid linoleic de l'anglès *Linoleic Acid*;  $\gamma$ LA: àcid  $\gamma$  linoleic de l'anglès  *$\gamma$  Linoleic Acid*; DGLA: àcid di-homo  $\gamma$  linoleic, de l'anglès *Dihomo  $\gamma$  Linoleic Acid*; AA: Àcid Araquidònic DPA: àcid docosapentaenoic, de l'anglès *Docosapentaenoic Acid*. **Família omega 3:** ALA: àcid  $\alpha$ -linolènic, de l'anglès *Alpha Linolenic Acid*; EPA: àcid eicosapentaenoic, de l'anglès *EicosaPentaenoic Acid*; DHA: àcid docosahexaenoic, de l'anglès *DocosaHexaenoic Acid*.

El fenomen de competició està marcat bàsicament per l'enzim  $\Delta$ -6-desaturasa. Aquest enzim presenta una afinitat més gran per ALA que no pas per LA, i inhibeix competitivament la formació dels seus derivats àcid araquidònic (AA) i àcid docosapentaenoic (DPA).

Paradoxalment el procés de conversió d'ALA a àcid eicosapentaenoic (EPA) i àcid docosahexaenoic (DHA) en éssers humans és poc eficient; només



entre un 5-10% de l'ALA ingerit acaba convertint-se en EPA. Per tant, només un 2-5% esdevé DHA (Barceló-Coblijn & Murphy, 2009; EFSA, 2009).

## 1.2 PAPER FISIOLÒGIC DELS AGPI

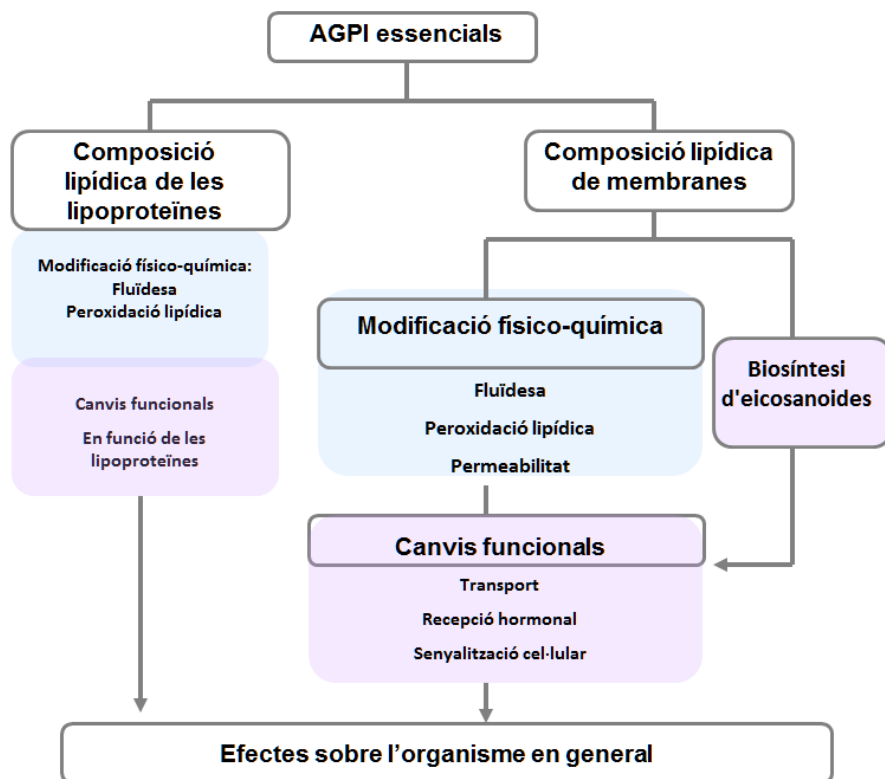
A diferència de la resta de greix alimentari, els AGPI incorporats per mitjà de la dieta no acostumen a consumir-se de manera oxidativa per a la producció d'energia, sinó que el seu destí preferent és la incorporació en les membranes cel·lulars.

La composició de les membranes cel·lulars en condiciona el paper fisiològic i funcional, sobretot pel que fa a les funcions de reconeixement cel·lular, transmissió de senyals, transport de nutrients i metabòlits i diverses activitats enzimàtiques. Aquestes funcions són degudes en gran part a la modificació de la fluïdesa de la membrana.

La fluïdesa es coneix com la capacitat de moviment molecular de la membrana, i és una característica de la membrana, la qual es troba totalment condicionada per la seva composició en AG. Depenent de l'estructura química dels AG, aquests àcids ocupen més o menys espai dins de la bicapa. Així els AG de tipus saturat es disposen d'una manera molt empaquetada amb molt poc moviment, mentre que els AGPI ocupen més espai i són més mòbils, i augmenten, doncs, la fluïdesa.

Per tant, la ingesta dietètica d'AGPI essencials suposa una repercussió funcional en l'organisme com s'exposa en la figura 3 (Mataix Verdu, 2009).

**Figura 3: Repercussió funcional del greix alimentari**



Quan les cèl·lules són activades, les fosfolipases alliberen els AGPI de les membranes i aquests àcids entren en el metabolisme de manera que, o bé són transformats enzimàticament a cadenes més llargues i amb un grau d'insaturació més elevat (figura 2), o bé directament produeixen mediadors químics com els eicosanoides.

Com més fluïdesa de la membrana, més permeabilitat i millor funció associada a proteïnes transmembrana, és a dir, millor transport

transmembrana. Ara bé, com més fluïdesa, també existeix un risc més gran de peroxidació lipídica.

La membrana de les lipoproteïnes té una estructura similar a la membrana de les cèl·lules en general; per tant, si els AGPI s'incorporen en la membrana de les lipoproteïnes, la repercussió es dona en el metabolisme lipídic en general (Kremmyda, Tvrzicka, Stankova, & Zak, 2011; Mataix Verdu, 2009).

Cal destacar també el paper dels AGPI com a segons missatgers, ja que, un cop en les membranes, poden interactuar amb algunes hormones i altres senyals extracel·lulars i desencadenar cascades de senyalització (Kremmyda [et al.], 2011).

La biosíntesi d'eicosanoides que es deriva dels AGPI relaciona els AGPI de les membranes amb els processos inflamatoris.

Depenent de la sèrie o família a la qual pertanyin els AGPI (omega-6 o omega-3), els seus productes finals tenen diferents funcions, la majoria de vegades oposades (figura 4). (Rueda, Domingo, & Mach, 2011.)

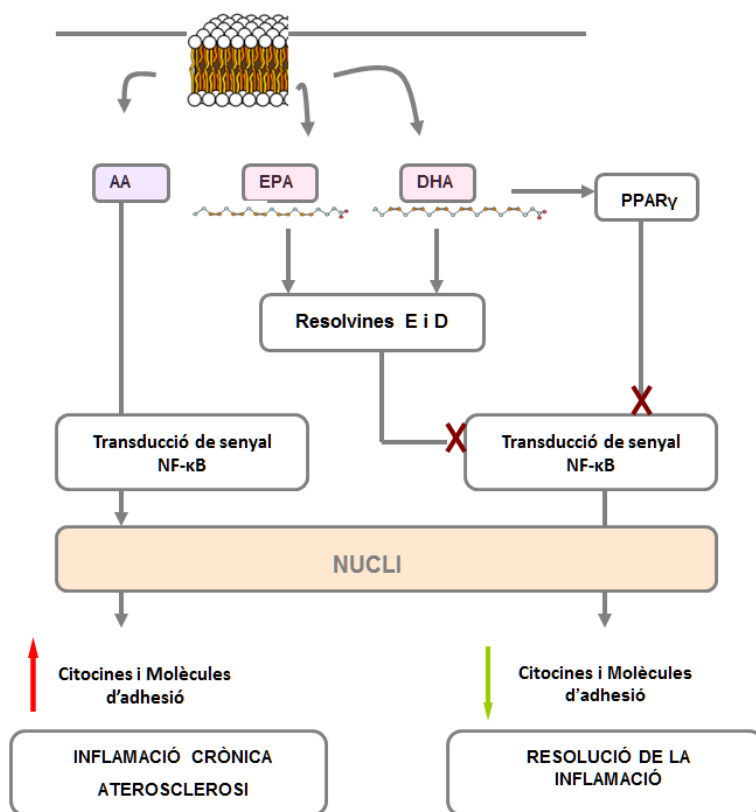
Així, mentre els eicosanoides derivats dels AGPI omega-6 solen ser proinflamatoris, els eicosanoides derivats dels AGPI omega-3 solen ser antiinflamatoris. A partir dels omega-6, es formen prostaglandines (PG) i lipoxines. A partir dels AGPI omega-3, en canvi, es formen altres PG, resolvines i protectines. Són de la sèrie E si provenen de l'EPA o de la sèrie D si provenen del DHA. Com indica el nom, les resolvines i les protectines resolten i protegeixen els processos inflamatoris per mitjà de la seva interacció amb diferents substàncies implicades en la inflamació. Les resolvines i protectines provinents dels AGPI omega-3, a diferència de les

PG i les lipoxines provinents dels AGPI omega-6, desactiven alguns factors de transcripció, entre els quals NF- $\kappa$ B (de l'anglès *Nuclear Factor  $\kappa$ B*).

Quan el NF- $\kappa$ B no s'activa, s'inhibeix l'expressió de múltiples gens que codifiquen proteïnes relacionades amb la inflamació, per exemple la proteïna C reactiva. Alhora, la inhibició d'aquest factor de transcripció es tradueix en la disminució d'algunes citocines inflamatòries i molècules d'adhesió.

Una de les vies que explica la inhibició del NF- $\kappa$ B és el fet que el DHA sigui un lligand directe del receptor nuclear PPAR $\gamma$  (de l'anglès *Preroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$* ), el qual, igual que les resolvines i protectines, inactiva NF- $\kappa$ B (Rueda [*et al.*], 2011). (Figura 4.)

Figura 4. Efecte dels AGPI sobre la resolució de la inflamació



Esquema adaptat en part de Rueda [et al.](2011).

A part de la família dels PPAR, s'han identificat altres receptors nuclears i factors de transcripció regulats pels AGPI omega-3, tots involucrats amb el **metabolisme lipídic**. Un exemple n'és la proteïna d'unió a l'element resposta a esterols (SREBP-1c).

Aquesta proteïna regula positivament l'activitat d'enzims relacionats amb la síntesi d'AG i amb els processos de dessaturació i elongació d'AG (Kremmyda [et al.], 2011).

La SREBP-1c també indueix el transportador de glucosa 2 (GLUT-2), el qual facilita l'entrada de glucosa per les membranes cel·lulars, i relaciona els AGPI amb el metabolisme de la glucosa (Kremmyda [et al.], 2011).

Per tot això, els AGPI de cadena llarga omega-3 han estat estudiats en un ventall força ampli de rols fisiològics i terapèutics (Jump, 2002).

La modificació en la composició de les membranes per mitjà de la ingesta alimentària d'AGPI, es dona de manera dosi-depenent. En els éssers humans, s'ha vist que un període de quatre setmanes d'ingesta d'AGPI és suficient per donar lloc a una composició de membrana totalment nova, tot depenent de les dosis ingerides (Calder, 2011).

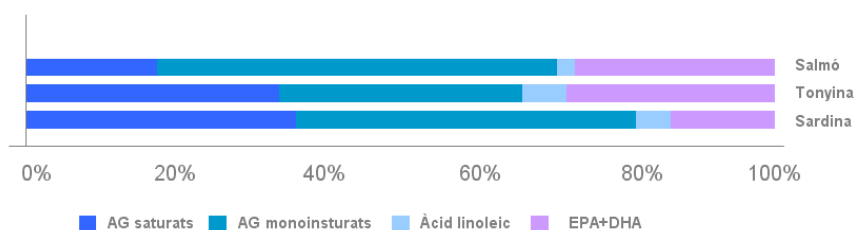
Alguns efectes adversos han estat descrits en éssers humans amb relació a grans ingestes d'EPA i DHA, els quals inclouen alteració del metabolisme de la glucosa i dels lípids, elevada peroxidació lipídica, hemorràgies i alteració de la funció immune. Tot i així, cap autoritat o organisme oficial ha establert encara un nivell tolerable per aquests AG. Els estudis realitzats en éssers humans que hi ha disponibles, els quals avaluaven l'eficàcia d'EPA i DHA sols o en combinació, dosis més altes d'1g/dia estudiades en temes de salut com malalties cardiovasculars, problemes neurològics o immunitat, no han descrit efectes adversos (EFSA, 2009).

### **1.3 FONTS ALIMENTÀRIES D'AGPI**

La principal font alimentària d'AGPI omega-3 és el peix blau i el marisc. En aquests productes, els AGPI omega-3 s'hi troben de manera natural. No obstant això, de manera artificial també els trobem en aliments funcionals o aliments enriquits com algunes llets de soja, suc i altres productes manufacturats.

Pel que fa al peix blau, les espècies considerades com a font principal són el salmó, les sardines, la tonyina, l'arengada i la truita. La composició greixosa de les tres primeres apareix representada en la figura 5 (Mataix Verdu, 2009; Vannice & Rasmussen, 2014).

**Figura 5: Composició lipídica de les principals espècies**



*Figura extreta del llibre Nutrición y alimentación humana (Mataix Verdu. 2009).*

En les diferents espècies de peix trobem els AGPI de cadena llarga omega-3, EPA i DHA, en quantitats i proporcions variables depenent de diversos factors: la mateixa espècie, l'entorn, les característiques metabòliques del peix, la seva dieta, la temperatura de l'aigua on viu i la temporada o estació de l'any. La relació EPA:DHA varia entre 0,8 i 4,5. Per exemple, el fetge de bacallà (d'on s'extreuen la majoria d'olis de peix per fer suplementes) és més ric en EPA que en DHA, mentre que l'oli de tonyina és més ric en DHA que en EPA (Calder, 2011).

Els olis de peix que es comercialitzen són més concentrats i, per tant, més rics en AGPI que no pas les racions de peix que podem incloure a la dieta. Ara bé, el consum d'oli de peix avui dia és poc habitual en el món occidental.

Darrerament estudis del nostre grup han determinat la proporció EPA/DHA 1:1 com a proporció més adient d'aquests dos AG, amb relació als

marcadors de risc cardiovascular, l'estrès oxidatiu i les alteracions histològiques en la síndrome metabòlica (SM). (Lluís [et al.], 2013a; Molinar-toribio [et al.], 2015; Taltavull [et al.], 2014.)

Segons Lluís [et al.], la proporció EPA:DHA 1:1 és la més beneficiosa pel que fa a la millora de l'estat antioxidant, l'oxidació de lipoproteïnes LDL i la relació Apo-B100/Apo-A1, tots signes de disminució del risc de patir malaltia cardiovascular.

Pel que fa a les alteracions histològiques que es relacionen amb les malalties cardiovasculars i la síndrome metabòlica (SM), també es va veure com la proporció EPA:DHA 1:1 és la més adient perquè millora l'estructura de les parets aòrtiques i l'atrofia renal en models animals amb SM. Aquesta proporció 1:1 va millorar tant la inflamació de fetge i de teixit adipós tant en el model animal sa com en el model animal amb SM (Taltavull [et al.], 2014).

## **1.4 RECOMANACIONS NUTRICIONALS D'AGPI**

Segons l'Agència de Seguretat Alimentària Europea (EFSA, de l'anglès *European Food Safety Agency*), les recomanacions nutricionals per a AGPI omega-3 són de 250 mg/dia (EFSA, 2009).

Si tenim en compte altres organismes oficials de caràcter internacional com l'Organització Mundial de la Salut (OMS), la Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) i l'American Heart Association (AHA), aquestes recomanacions nutricionals es troben en un rang entre 200->600 mg/dia per a adults (Aranceta & Pérez-Rodrigo, 2012).



Per assolir aquestes recomanacions, es recomana la ingesta de dos racions a la setmana, una de les quals ha de ser de peix blau.

Tenint en compte la variació entre espècies, amb dos racions de peix a la setmana la incorporació dietètica d'EPA i DHA ronda entre 200 i 500 mg/dia, i concorda, doncs, amb les recomanacions establertes per l'EFSA (Strobel, Jahreis, & Kuhnt, 2012).

## 2. LA SÍNDROME METABÒLICA

### 2.1 DEFINICIÓ I DIAGNÒSTIC

L'SM, també anomenada *síndrome X* o *síndrome metabòlica X*, no és una patologia en si mateixa; sinó que és una entitat clínica controvertida que apareix, amb àmplies variacions fenotípiques, en persones amb una predisposició endògena determinada genèticament i fortament condicionada per factors ambientals com ara una dieta inadequada o el sedentarisme.

Avui dia no existeix una definició consensuada en l'àmbit internacional per descriure l'SM, tot i que des d'un punt de vista pràctic i eminentment clínic els paràmetres més extensos per la identificació d'aquesta síndrome són els que va establir el National Cholesterol Education Program (NCEP ATP-III) el 2001, els quals han estat posteriorment actualitzats per l'American Heart Association (AHA) el 2005.

Altres organismes internacionals com l'Organització Mundial de la Salut (OMS) i la International Diabetes Federation (IDF), han incorporat altres

critèris per al diagnòstic, encara que són critèris bastant similars als que estableix l'NCEP ATP-III (Eckel, Grundy, & Zimmet, 2005).

Així, el diagnòstic es determina quan apareixen els tres o més símptomes determinants de risc de malaltia cardiovascular (MCV) que figuren en la taula 1. Aquesta taula resumeix els paràmetres proposats per les tres organitzacions principals:

**Taula 1: Criteris de definició de la síndrome metabòlica**

Factor de Risc	NCEP-ATPIII	OMS	IDF
Obesitat abdominal	Circumferència abdominal: >102 en homes > 88 en dones	Índex Cintura-cadera: > 0.90 en homes > 0.85 en dones	Circumferència abdominal: > 94 en homes > 80 en dones
Triglicèridèmia	≥ 150 mg/ml	≥ 150 mg/ml	≥ 150 mg/ml
Colesterol HDL	< 40 mg/dl en homes < 50 mg/dl en dones	< 35 mg/dl en homes < 39 mg/dl en dones	< 40 mg/dl en homes < 50 mg/dl en dones
Hipertensió arterial	≥ 130 mmHg sistòlica ≥ 85 mmHg diastòlica	≥ 140 mmHg sistòlica ≥ 90 mmHg diastòlica	≥ 130 mmHg sistòlica ≥ 85 mmHg diastòlica
Nivells de glucosa en dejú	≥ 100 mg/dl en homes ≥ 100 mg/dl en dones o tractament farmacològic	≥ 110 mg/dl o bé 2 h postcàrrega ≥ 140 mg/dl en homes i dones	≥ 100 mg/dl en homes i dones o DM tipus 2 diagnosticada

NCEP-ATPIII: *National Cholesterol Education Program*; OMS : *Organització Mundial de la Salut*; IDF: *International Diabetes Federation* ; DM: *Diabetes Mellitus*

## 2.2. FISIOPATOLOGIA

La fisiopatologia de l'SM encara és controvertida, però l'associació entre aquesta síndrome, l'obesitat i la inflamació està ben documentada.

L'**obesitat** representa un rol preponderant en la fisiopatologia de l'SM. El teixit adipós és molt actiu en l'alliberament de diferents substàncies: àcids

grassos, factor de necrosi tumoral (TNF $\alpha$ ), interleucina-6 (IL6), PAI-1, leptina, etc. Aquests factors poden promoure l'aparició d'un **estat proinflamatori**, de resistència a la insulina i de dany endotelial. La inflamació augmenta des del punt de vista sistèmic, gràcies a factors d'adhesió, com la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1) al fetge i la molècula d'adhesió vascular (VCAM) a l'endoteli, que augmenten alhora l'estrès oxidatiu.

La resistència a la insulina normalment augmenta de manera proporcional a l'acumulació de greix. Els **àcids grassos lliures no esterificats augmenten al plasma**, al fetge i al múscul (Eckel [et al.] 2005).

Al fetge, la major oferta d'AG augmenta la gluconeogènesi i la producció de triglicèrids, augmenta la síntesi de les apolipoproteïnes VLDL i LDL, i disminueix la síntesi d'HDL, a més d'augmentar la producció de substàncies amb activitat protrombòtica com el fibrinogen. En el múscul, s'acumula teixit adipós i estimula la utilització d'AG com a font d'energia en lloc de la glucosa. Aquesta glucosa no utilitzada muscularment, sumada a la gran producció de glucosa hepàtica, genera **hiperglucèmia**.

En resposta a aquest fet, el pàncrees incrementa la secreció d'insulina que compensa la situació i així manté un nivell de glucèmia basal més estable; aquest fet és el que es coneix com a **resistència a la insulina**.

La hiperinsulinèmia intensifica la reabsorció de sodi i aigua i augmenta l'activitat del sistema nerviós simpàtic i contribueix a augmentar la despesa cardíaca i la vasoconstricció, i provoca **hipertensió arterial**. Quan hi ha resistència a la insulina, el seu poder vasodilatador es perd, però l'efecte de reabsorció de sodi per part del ronyó es preserva.

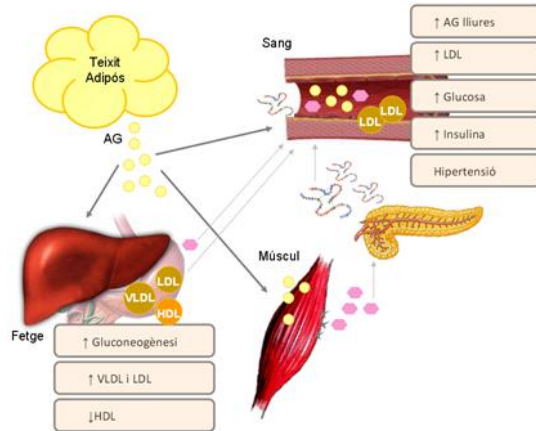
També es produeixen canvis en les lipoproteïnes plasmàtiques, diferents enzims i receptors. Aquestes alteracions poden produir un increment de la síntesi hepàtica de VLDL, reduir els nivells de colesterol HDL i modificar-ne la composició.

L'augment del colesterol VLDL i LDL afavoreix l'acumulació de colesterol en les artèries, un estat protrombòtic, que juntament amb l'estat proinflamatori, esdevenen **aterosclerosi** i altres malalties cardiovasculars (Eckel [*et al.*], 2005).

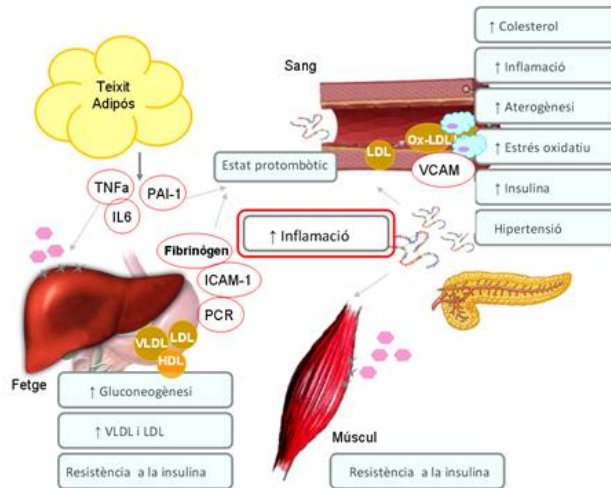
Així, podem diferenciar bàsicament dos grans vessants en la fisiopatologia de l'SM, d'una banda l'augment dels AG lliures circulants i, de l'altra, la inflamació; totes dues degudes a l'increment de teixit adipós (figura 6).

**Figura 6: Fisiopatologia de l'SM**

**A: Efecte dels AG lliures circulants**



**B: Efecte de les citocines alliberades**



● Glucosa ● AG lliures 🦋 Insulina 🦋 Macròfags

Així, els principals òrgans afectats en l'SM són el teixit adipós, el fetge, l'endoteli vascular i el ronyó.

### 2.2.1. Disfunció del teixit adipós

Els adipòcits sintetitzen un ampli rang d'hormones, citocines i altres substàncies relacionades amb diferents funcions en l'organisme. Aquesta funció secretora dels adipòcits es modifica en individus obesos (Hajer, van Haefen, & Visseren, 2008). La disfunció del teixit adipós es defineix com l'estat d'hipersecreció de citocines proinflamatòries i amb efecte sobre el metabolisme de la glucosa.

Aquesta disfunció està donada per la relació entre adipòcit i macròfag (figura 7).

Com hem vist anteriorment, l'obesitat comporta un estat d'inflamació crònic; de fet, s'ha vist que la presència de macròfags és més prevalent en el teixit adipós d'individus obesos que no pas en individus amb normopès (Hajer [et al.], 2008).

A mesura que els adipòcits es divideixen (obesitat hiperplàstica) o es fan més grans (obesitat hipertròfica) s'allibera una quantitat més gran d'AG lliures. Aquests AG lliures s'enganxen a la proteïna TLR-4 (de l'anglès *Toll-like receptor-4*), la qual activa el factor de transcripció NFK $\beta$ . El TNF $\alpha$  derivat d'aquest procés activa els adipòcits i augmenta la secreció de més TNF $\alpha$  i altres citocines com l'IL-6 i factors d'adhesió com ICAM i MCP-1 (de l'anglès *Macrophage chemo attractant protein-1*). Aquests factors d'adhesió faciliten la diapedesi dels monòcits de la sang al teixit adipós, on es diferencien en macròfags gràcies també a ICAM i MCP-1. Tot això fa que es produeixi un cicle tancat entre obesitat i inflamació (figura 7).

Alhora que se secreten més citocines, els adipòcits hipertròfics sintetitzen menys nivells d'adiponectina.

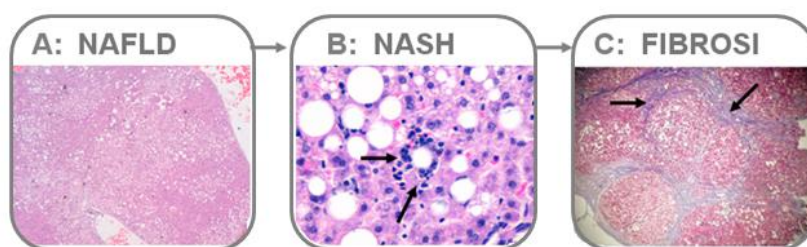


La resistència a la insulina incrementa la lipòlisi en el teixit adipós, i allibera AG lliures, que són captats pel fetge.

Aquest greix acumulat en els hepatòcits augmenta la peroxidació dels AG, i incrementa la producció de citocines proinflamatòries i l'estrès oxidatiu. De manera que es dona l'evolució d'NAFLD a NASH, la qual pot desencadenar una fibrosi final, conseqüència de la inflamació perllongada (figura 8).

Des del punt de vista histopatològic, l'evolució d'aquests tres estats es pot observar clarament (figura 8).

**Figura 8: Evolució del fetge gras no alcohòlic a fibrosi**



**A:** Foto fetge de rata amb NAFLD 40x, tinció hematoxilina-eosina. Els espais en blanc són dipòsits de greix que en aquest cas superen el 5% del pes total del fetge **B:** Foto fetge de rata amb NASH 400x, tinció hematoxilina-eosina. Les cèl·lules inflamatòries característiques del NASH apareixen marcades amb fletxes negres. També es poden observar els dipòsits més clarament. **C:** Imatge extreta de Talgle *et al*, *Clinica, biochemical and hepatic histological findings in overweight and obese peruvian adults: first national prospective study, 2008*, Foto de fetge humà 20x tinció tricròmica de Masson. Marcades amb fletxes negres apareixen les bandes fibròtiques que delimiten els futurs nòduls degeneratius.

### 2.2.3 Lesió endotelial

La resistència a la insulina és també un dels mecanismes més importants pel qual l'SM acaba generant disfunció endotelial. A aquesta resistència a la insulina que es dona al múscul esquelètic, teixit adipós i fetge, cal sumar-hi la dislipèmia, la inflamació i la formació de radicals lliures (RLL). (Fernández-Sánchez *et al.*, 2011.)

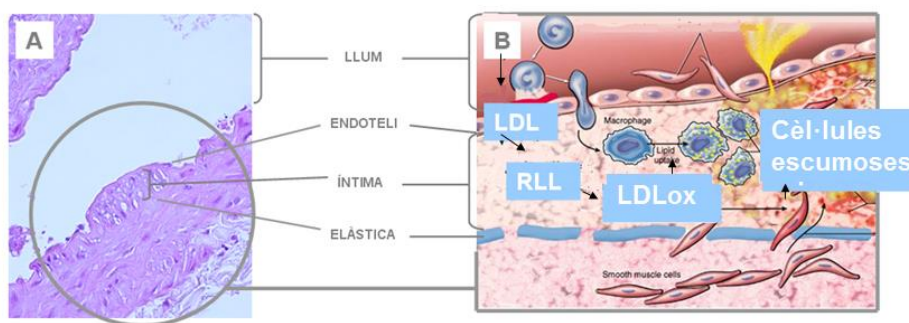


La dislipèmia es caracteritza per la distribució i composició anòmala del colesterol LDL a l'espai endotelial, des d'on participa activament en el procés arterioscleròtic (figura 9).

Les LDL a l'espai endotelial poden ser oxidades per l'excés de radicals lliures, i es converteixen en LDL oxidades (LDLox). Un cop oxidades, no són reconegudes pels macròfags, els quals les fagociten i es converteixen en cèl·lules escumoses que queden atrapades en la íntima de la paret vascular. Aquestes cèl·lules atrapades gràcies a diferents factors d'adhesió i altres molècules protrombòtiques com el fibrinogen o el PAI-1, donen lloc a la progressió de la placa d'ateroma i, per tant, al procés d'aterosclerosi (figura 9).

La disfunció endotelial és el pas previ fonamental en la progressió de l'aterosclerosi, procés característic de les malalties cardiovasculars (Fernández-Sánchez [et al.], 2011; Tesouro [et al.], 2011).

**Figura 9: Progressió de la placa d'ateroma**



A. Foto: Aorta de rata Wistar alimentada amb dieta HFHS, 20x, tinció d'eosina-hematoxilina **B.** Esquema de l'endoteli on es representa la progressió de la placa d'ateroma.

### 2.2.4 Alteracions renals

L'SM i l'obesitat també estan associades a la nefropatia diabètica i a la patologia crònica renal; ara bé, alguns estudis han descrit que aquestes alteracions es poden desenvolupar sense arribar a patir diabetis tipus 2 (Ruggiero, Ehrenshaft, Cleland, & Stadler, 2011).

Els mecanismes patològics proposats en les alteracions renals inclouen la lipotoxicitat per l'acumulació de lípids en el ronyó, l'estat proinflamatori conseqüència de les diferents citocines, la hiperfiltració, la hipertensió i l'efecte de les espècies reactives de l'oxigen (ERO) i els RLL.

Encara que el ronyó no es considera un òrgan insulinosensible, la resistència a la insulina es relaciona amb el dany renal per diverses vies.

D'una banda, la insulina augmenta la reabsorció tubular, i col·labora a la hipertensió i, per tant, a la sobrecàrrega renal. D'altra banda, la insulina estimula la síntesi de factors de creixement insulínics (IGF-1 i IGF-2 de l'anglès *Insulin Grow Factor*), els quals promouen la hipertròfia glomerular (Tesauro [et al.], 2011).

Les afectacions més comunes en casos d'alteració renal per obesitat i insulinoresistència són hipertròfia glomerular, glomerulosclerosi, inflamació i la consegüent fibrosi glomerular (Ruggiero [et al.], 2011).

## 2.3 MODELS PER A L'ESTUDI DE LA SÍNDROME METABÒLICA

Com que es tracta d'una entitat clínica àmpliament condicionada per factors externs, molts dels models utilitzats són models sans als quals s'indueix l'SM per mitjà de la dieta, i s'augmenta el contingut calòric total. Aquest augment es pot dur a terme mitjançant l'addició de diferents components calòrics com greixos, sacarosa, fructosa, colesterol o hidrats de carboni (figura 10).

S'ha descrit àmpliament que una dieta amb elevat contingut calòric perllongada durant el temps esdevé obesitat, i es relaciona amb altres trets característics de l'SM, com l'HTA, la insulinoresistència o la hipertrigliceridèmia.

De fet, molts dels models d'estudi de l'SM s'esdevenen de l'administració de components calòrics com es veu a la figura 10.

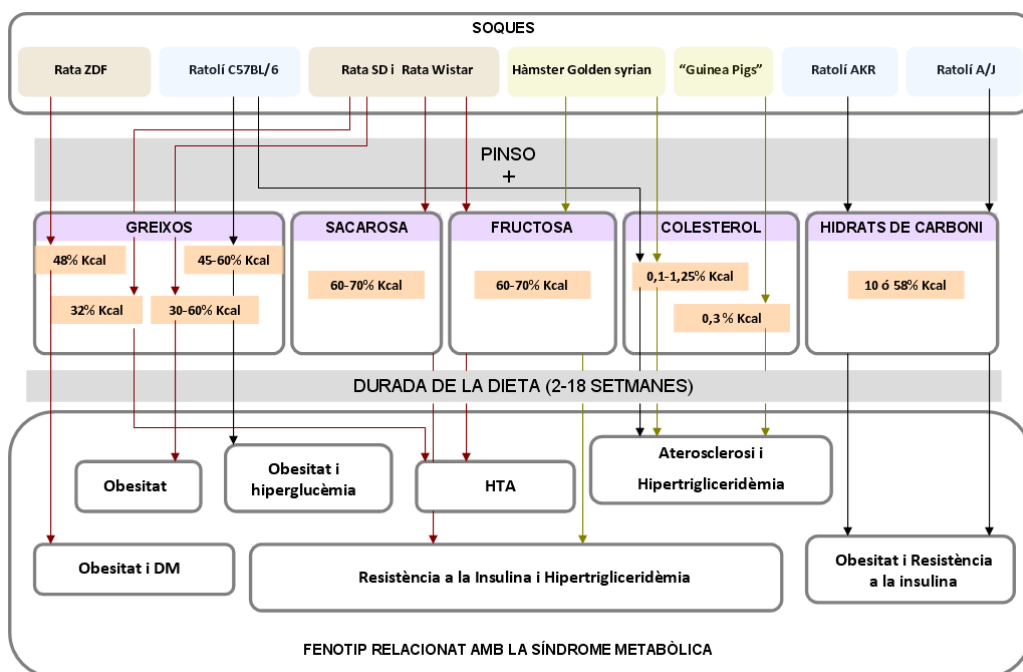
Ara bé, amb aquests models, moltes vegades, és difícil determinar si els canvis metabòlics són directament provocats per la dieta o bé són conseqüència indirecta de l'obesitat que comporta. Se la Fleur [*et al.*] (2010) demostren com la intolerància a la glucosa, provocada per la resistència a la insulina, s'afecta directament per la composició de la dieta i no per la obesitat *per se* (la Fleur, Luijendijk, van Rozen, Kalsbeek, & Adan, 2011).

Mitjançant un experiment dut a terme en rates alimentades amb elecció lliure de dietes *high fat high sucrose* (HFHS), *high fat* (HF) o *high sucrose* (HS), varen poder observar com tant les rates que van consumir dieta HF com HFHS desenvolupaven obesitat i presentaven continguts plasmàtics

similars d'AG lliures; ara bé, només les HFHS desenvolupaven hiperglucèmia, hiperinsulinèmia i resposta a la insulina disminuïda. Per tant, l'adipositat provocada per la dieta no explicava les diferències en el metabolisme de la glucosa.

En aquest mateix estudi, Se la Fleur [et al.] (2010) van correlacionar positivament l'augment de la ingesta calòrica amb l'augment del contingut de teixit adipós. Per tot això, calen més estudis amb relació a les diferents entrades que influeixen en l'SM.

Figura 10: Models animals d'SM induïda



ZDF: "Zucker Diabetic Fatty"; SD: Sprague Dawle.

Esquema adaptat de l'article d'Aydin [et al.] (2014).

## 3. ESTRÈS OXIDATIU

### 3.1. ELS RADICALS LLIURES I LES ESPÈCIES REACTIVES DE L'OXIGEN

**Els radicals lliures (RLL)** es defineixen com a espècies químiques (àtom, ió o molècula) capaces d'existir de manera independent i que presenten un o més d'un electró desaparellats en la seva estructura (Barry Halliwell & Gutteridge, 1999).

Els electrons són més estables quan es troben aparellats en les orbitals dels àtoms; per tant, els RLL són molt més reactius que les espècies químiques no radicals.

Un RLL pot cedir el seu electró desaparellat a una altra molècula o bé pot robar-lo d'una altra molècula i aparellar l'electró desaparellat. Sigui com sigui, d'aquesta interacció sempre quedarà un RLL, altament reactiu capaç d'interaccionar amb una altra molècula.

En els organismes aeròbics, la font endògena més gran d'RLL és la cadena respiratòria mitocondrial. Durant aquesta cadena, es formen RLL d'oxigen, com ara el radical superòxid  $O_2^{\cdot-}$ , el radical hidroxil  $OH^{\cdot}$  i el radical peroxil  $\cdot OOH$  (taula 2).

Però, els RLL també es produeixen en grans quantitats quan ens exposem a factors externs com les infeccions microbianes, el contacte amb tòxics, amb el fum del tabac, l'alcohol, les radiacions UV, els pesticides o l'ozó, entre d'altres.

Durant la respiració mitocondrial es generen altres productes a banda dels RLL de l'oxigen; són productes intermedis denominats **espècies reactives de l'oxigen (ERO)**. Les ERO engloben tant els RLL d'oxigen com altres molècules no radicals, molècules que no tenen cap electró desaparellat, però que són formes electrònicament excitades, la qual cosa els atorga més contingut energètic i, per tant, més capacitat reactiva (Barry Halliwell & Gutteridge, 1999). És a dir, tots els RLL de l'oxigen són ERO però no totes les ERO son radicals d'oxigen (Barry Halliwell & Whiteman, 2004).

Una de les ERO més conegudes és el peròxid d'hidrogen  $H_2O_2$  (taula 2).

Aquestes ERO són imprescindibles per a la supervivència dels organismes vius, ja que les seves funcions estan associades amb processos fisiològics com la senyalització cel·lular, la migració, proliferació, senescència i mort programada de les cèl·lules i la regulació redox (Sardina, López-Ruano, Sánchez-Sánchez, Llanillo, & Hernández-Hernández, 2012).

Ara bé, l'excés d'aquestes molècules pot esdevenir estrès oxidatiu.

Per aquest motiu, l'organisme disposa de sistemes o mecanismes de defensa contra l'excés de producció d'ERO; aquests són els sistemes antioxidants (taula 2).

**Taula 2: Espècies reactives de l'oxigen i sistemes antioxidants**

EROs		Sistemes antioxidants endògens		Sistemes antioxidants exògens
Radicals lliures	EROs no radicals	Enzimàtics	No enzimàtics	
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	SOD GPx	GSH	Ac. Ascòrbic (vit.C)
OH <sup>-</sup>	ROOH	CAT GR	Ac. Úric	Tocoferol (vit.E)
·OOH				Polifenols

O<sub>2</sub><sup>·-</sup>: Ió superòxid; OH<sup>-</sup>: radical hidroxil; ·OOH: radical peroxil; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peròxid d'hidrogen;

SOD: Superòxid dismutasa, CAT: catalasa, GPx, Glutatió peroxidasa, GR: Glutatió reductasa GSH: Glutatió

### 3.2 ESTRÈS OXIDATIU I SISTEMES ANTIOXIDANTS

L'**estrès oxidatiu (EO)** es defineix com un desequilibri entre la producció d'RLL i altres espècies reactives i els sistemes de defensa antioxidants (B Halliwell, 2007).

Aquesta pertorbació en el balanç prooxidant i antioxidant condueix a un dany potencial que s'ha anomenat dany oxidatiu.

El **dany oxidatiu** ha estat definit com el dany biomolecular causat per l'atac d'RLL i d'espècies reactives sobre constituents dels organismes vius (lípid, proteïnes i àcids nucleics). (Barry Halliwell & Whiteman, 2004.) El dany pot desencadenar canvis en l'estructura d'aquests biocomponents, i pot arribar a afectar la seva funcionalitat.

Que es produeixi o no es produeixi el dany dependrà del tipus de substància oxidant a la qual s'exposi l'organisme, del lloc i de la intensitat de la seva producció, de la composició i funcionalitat dels sistemes antioxidants i de la capacitat dels sistemes de reparació (Duracková, 2010).

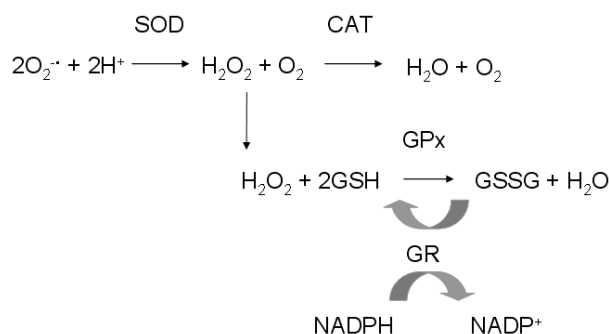
De la prevenció d'aquest dany oxidatiu se n'encarreguen els antioxidants.

**Un antioxidant** és qualsevol substància o acció que evita, retarda o prevé el dany oxidatiu en una diana biològica (B Halliwell, 2007).

De manera general, els antioxidants poden ser endògens i exògens. Pel que fa als sistemes antioxidants exògens, són les substàncies provinents de la dieta com l'àcid ascòrbic (vitamina C), el tocoferol (vitamina E) o els polifenols (Goodyear-Bruch & Pierce, 2002).(Taula 2.)

Els antioxidants endògens es classifiquen, segons la seva natura, en antioxidants enzimàtics (superòxid dismutasa, catalasa, glutatió peroxidasa, glutatió reductasa) i antioxidants no enzimàtics (glutatió i àcid úric, entre d'altres). (Taula 2.)

**Figura 11: Sistemes antioxidants endògens**



L'enzim intracel·lular **SOD**, descobert per McCord i Fridovich el 1969, catalitza la conversió de l'ió superòxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) i aigua accelerant la reacció unes 10.000 vegades. L' $H_2O_2$  format és reduït o bé per l'enzim CAT o bé per l'enzim GPx (figura 11).



**CAT** és un enzim propi dels peroxisomes, l'activitat del qual és la que fa més temps que es coneix. Catalitza la inactivació del peròxid d'hidrogen i el converteix en oxigen i aigua en la membrana de la cèl·lula.

L'enzim **GPx** és un enzim depenent de seleni que es troba en el citoplasma de la cèl·lula i del mitocondri. També catalitza la reducció de l' $H_2O_2$ , però ho fa a través del poder reductor de la molècula de glutatió (GSH).

El **GSH** és una de les molècules més importants en el manteniment del sistema redox de les cèl·lules. Es tracta d'un tripèptid soluble (Glu- Cys- Gly) amb un grup tiol lliure (-SH), el qual també pot reaccionar directament amb els RLL, fent que sigui una molècula antioxidant. Quan el glutatió es troba en estat reduït (GSH), el grup SH es troba en forma lliure; però quan s'oxida aquests grups SH perden els H i es forma un enllaç disulfur, en aquest cas el glutatió passa a ser glutatió oxidat (GSSG).

El GSSG, format per la reducció d' $H_2O_2$ , pot ser regenerat gràcies a l'enzim glutatió reductasa (GR). L'enzim **GR** utilitza el poder reductor del nucleòtid NADPH per tornar a reduir les molècules de GSSG i permet que la molècula de GSH pugui ser utilitzada un cop i un altre (figura 11).

### **3.3. L'ESTRÈS OXIDATIU I LA SEVA DETERMINACIÓ AL LABORATORI**

La determinació de l'EO és rellevant des del punt de vista clínic, ja que s'ha vist que l'EO és un fenomen associat a mecanismes patològics de nombroses malalties, les quals inclouen aterosclerosi, malalties neurodegeneratives, càncer, diabetis mellitus, malalties inflamatòries, etc.

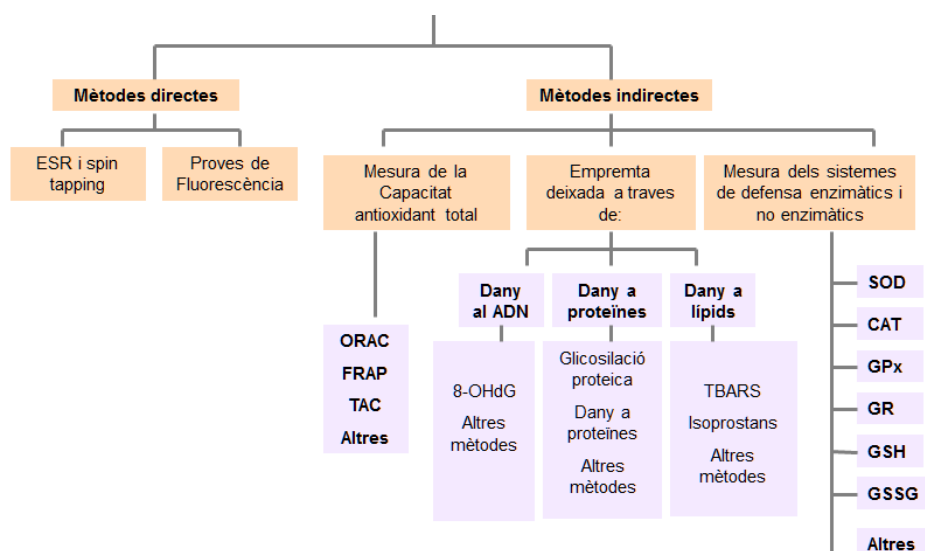
Està demostrat que l'EO està involucrat en més de cent malalties; és o bé la causa o bé la conseqüència (Poljsak, Suput, & Milisav, 2013).

Ara bé, els RLL tenen una mitjana de vida molt curta, fet que fa que siguin de difícil detecció al laboratori mitjançant mètodes directes. Però existeixen mètodes indirectes (figura 12). Alguns s'han utilitzat en aquest treball de tesi i s'expliquen detalladament en l'apartat "Material i mètodes".

L'EO no dona lloc a símptomes específics, i molt menys durant els estats primerencs del desequilibri entre ERO i defenses antioxidants. Per tant, no ens adonem de l'EO en un organisme fins que no hi ha dany oxidatiu important. Així, la mesura de diferents marcadors de reducció o d'oxidació es considera fonamental per tenir una visió de l'estrès oxidatiu que pateix un organisme. Existeixen diferents indicadors de l'estat redox in vivo, els quals inclouen ràtios de GSH/GSSG, NADPH/NADP<sup>-</sup> i NADH/NAD<sup>-</sup>. La ràtio GSH/GSSG és una de les més importants (Duracková, 2010).

La ràtio GSH/GSSG ha de ser elevada, ja que si la quantitat de GSH és menor que la quantitat de GSSG, vol dir que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> s'està acumulant.

Figura 12. Mètodes per a la detecció d'RLL i altres espècies reactives



CAT: Catalasa; ERS: Ressonància d'espín electrònic; FRAP: Capacitat de reducció fèrrica del plasma; ORAC: Capacitat antioxidant total; GSH: Glutatió reduït; GSSG: Glutatió oxidat; GPx: Glutatió peroxidasa; GR: glutatió reductasa; SOD: Superòxid dismutasa; TAC: Capacitat antioxidant total 8-OHdG: 8-deoxiguanosina. TBARS: Substàncies reactives a l'àcid tiobarbitúric.

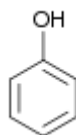
Esquema adaptat de Poljsak [et al.] (2013).

## 4. POLIFENOLS

### 4.1 DEFINICIÓ I CLASSIFICACIÓ DELS POLIFENOLS

Els polifenols són metabòlits secundaris de les plantes que es troben en grans quantitats en aliments com les fruites i els vegetals.

S'anomenen polifenols perquè en la seva estructura molecular disposen de més d'un grup fenòlic o fenol:



*Grup Fenol*

En aquest grup heterogeni de compostos format per milers de compostos diferents, existeix una classificació general segons la seva estructura química, que els separa en tres grups bàsics:

Els àcids hidrogenoics (ex.: ac. salicílic, ac. gàl·lic, etc.), els àcids hidrocínàmics (ex.: ac. ferúlic i ac. cafeic) i els flavonoides.

Aquest últim subgrup, els flavonoides, és el més ampli dels tres i se subclassifica en sis tipus de compostos diferents depenent també de la seva estructura química:

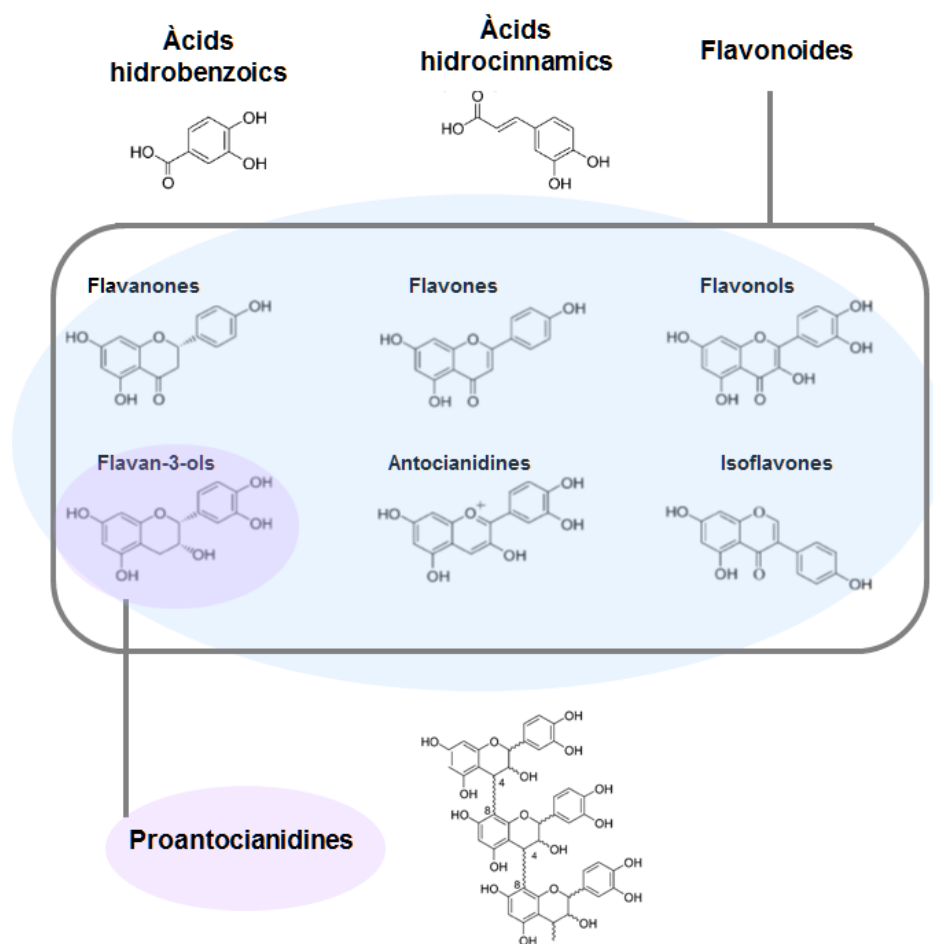
Flavanones, flavones, flavonols, flavan-3-ols, antocianidines i isoflavones (figura 13). (Fraga & Oteiza, 2011; Hollman [*et al.*], 2011; Kumar & Pandey, 2013.)

Les proantocianidines són sinònim de tanins condensats i són els segons compostos fenòlics més abundants a la natura. Són les responsables del caràcter astringent d'algunes fruites i begudes i de la xocolata.

Estructuralment, les proantocianidines són oligòmers o polímers de flavan-3-ols, units principalment per un enllaç C4→C8 (figura 13).

La importància de la classificació segons l'estructura química recau que la determinació dels efectes fisiològics o saludables que puguin tenir els polifenols, dependrà d'aquests canvis estructurals, i fa que diferents estructures tinguin diferents propietats biològiques.

Figura 13: Compostos fenòlics



## 4.2 EFECTES SOBRE LA SALUT

Quasi tots els flavonoides tenen diverses funcions biològiques i químiques comunes en les plantes:

- Activitat antioxidant (*scavengers*)
- Capacitat d'inactivar les espècies reactives de l'oxigen

- Poder d'eliminació dels electròfils
- Habilitat d'inhibir la nitrosació
- Capacitat de quelar metalls
- Capacitat de modular certes activitats enzimàtiques cel·lulars (Pietta, 2000)

En éssers humans, les propietats biològiques que s'han atribuït als polifenols i, concretament, a les proantocianidines són diverses: efectes antioxidants, antibacterians, anticarcinogènics, antiinflamatoris i vasodilatadors, i també d'inhibició de la peroxidació lipídica, l'agregació plaquetària i la permeabilitat i fragilitat capil·lar.

Ara bé, gairebé tota la literatura recalca que tot i els estudis epidemiològics, els mecanismes fisiològics i moleculars exactes pels quals es donen aquests efectes, no estan descrits, i que, per tant, calen més estudis en aquest nivell (Hollman [*et al.*], 2011).

### **4.3 INGESTA I BIODISPONIBILITAT DELS POLIFENOLS**

En els diferents antioxidants exògens, el grup dels polifenols és el grup més consumit amb la dieta i arriba a nivells deu vegades superiors a la ingesta de vitamines.

L'absorció dels diferents polifenols alliberats dels aliments depèn de les seves propietats fisicoquímiques (lipofília, solubilitat), del seu pes molecular i de la seva configuració química.

La capacitat d'absorció des del punt de vista dels nutrients del colon és molt menor que la capacitat d'absorció de l'intestí prim; però en el cas dels

polifenols, hi ha una excepció. De manera general, els polifenols es poden absorbir tant en l'intestí prim com en el gros. El colon participa activament en l'absorció tant dels compostos fenòlics que s'han mantingut al llarg del tracte digestiu, com dels seus metabòlits derivats de la degradació microbiana, duta a terme per la microbiota del colon. Així doncs, s'han de considerar les dues absorcions per poder valorar els efectes dels polifenols sobre l'organisme, ja que tant uns com els altres poden tenir funcionalitat biològica. (Del Rio, Costa, Lean, & Crozier, 2010). (Figura 14.)

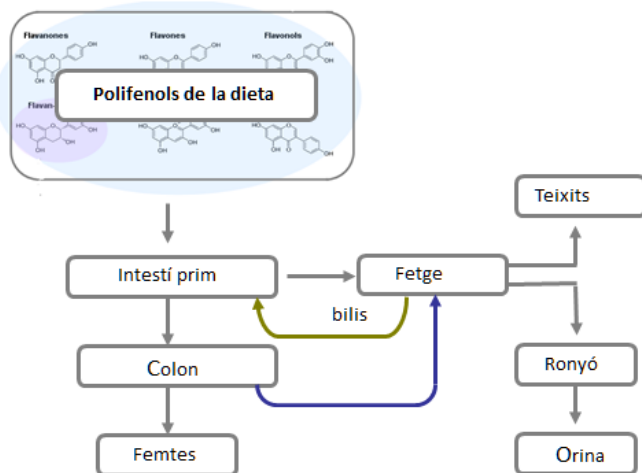
Els polifenols, després de ser absorbits, són conjugats en el fetge per glucuronidació, sulfatació o metilació; o bé són metabolitzats a compostos fenòlics més petits. Existeixen metabòlits secundaris actius dels polifenols; però s'ha vist que la dimerització redueix la biodisponibilitat. (Kumar & Pandey, 2013).

En el cas concret de les proantocianidines, estudis en éssers humans han demostrat que aquestes es mantenen estables al llarg del tracte digestiu, fet que permet la seva presència en l'intestí a elevades concentracions. Aquestes elevades concentracions sembla que persisteixen durant unes quantes hores després de la ingestió d'un àpat ric en flavan-3-ols.

Per tant, l'evidència demostra que, in vivo, les proantocianidines no són despolimeritzades o metabolitzades al llarg del procés de digestió, fet que les fa més biodisponibles i que permet la participació en reaccions químiques de rellevància biològica (Fraga & Oteiza, 2011).



**Figura 14: Absorció i distribució de polifenols**



Esquema adaptat de Kumar & Pandey (2013).

Tot i així, s'han de tenir en compte els diferents factors que fan poc precisa la mesura de la ingesta dels polifenols.

D'una banda, els polifenols dels aliments estan en forma d'heteròsids, és a dir, units a residus de glúcids o esterificats, i aquests compostos poden disminuir la seva biodisponibilitat (Hollman [et al.], 2011). Es tracta d'un grup de substàncies tan ampli que fa que les estructures químiques difereixin moltíssim entre unes i altres.

D'altra banda, la determinació en el laboratori és encara controvertida, no existeixen mètodes estandarditzats d'anàlisi, fet que fa que els resultats variïn molt entre publicacions (Kumar & Pandey, 2013).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015



***Introducció***

***Capítol II: Interrelacions***



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

## 1. AGPI OMEGA-3 I SÍNDROME METABÒLICA

Durant els últims anys nombroses evidències han suggerit que el tipus de greix consumit és més important que no pas la quantitat. També s'ha incrementat la importància del consum d'olis de peix amb relació a l'SM (Abete, Goyenechea, Zulet, & Martínez, 2011; Lluís [*et al.*], 2013a).

Els estudis inicials que van permetre demostrar aquesta relació van sorgir de l'observació de poblacions grans consumidores de peix i d'oli de peix com els esquimals o els japonesos, els quals tenien molt baixa incidència d'SM i malaltia cardiovascular (MCV). A partir d'aquí s'ha anat demostrant al llarg dels anys com el consum d'AGPI omega-3 d'origen marí pot millorar certs trets característics de l'SM i, per tant, reduir el risc de patir MCV (Abete [*et al.*], 2011).

Estudis més recents han intentat relacionar els AGPI omega-3 amb cadascun dels criteris diagnòstics de l'SM (obesitat, hipertrigliceridèmia, hipertensió arterial i resistència a la insulina) i també els seus efectes en òrgans com el fetge i l'endoteli vascular, afectats també en l'SM.

### 1.1. AGPI OMEGA-3 I OBESITAT

Pel que fa als mecanismes d'acció, s'ha vist que els AGPI omega-3 es poden relacionar amb l'obesitat i la quantitat de greix total que actua sobre diverses dianes:

Tant l'EPA com el DHA són lligands directes (activadors) dels receptors nuclears PPAR- $\alpha$  i PPAR- $\gamma$ . L'activació dels PPAR- $\alpha$  en rosegadors ha demostrat una disminució de la quantitat total de teixit adipós, amb la transcripció de gens relacionats amb la  $\beta$ -oxidació del greix per a

l'obtenció d'energia. En rosegadors la manca total de PPAR- $\gamma$  s'ha relacionat amb una obesitat extrema desencadenada per l'emmagatzematge d'AG en el teixit adipós (Kim, Li & Watkins, 2013).

En rates i ratolins alimentats amb AGPI omega-3 d'origen marí s'ha observat l'augment de la carnitinacetyltransferasa, la qual també promou la  $\beta$ -oxidació del greix amb el transport dels AG al mitocondri (Celi & Shuldiner, 2002).

Finalment, altres estudis també demostren que els AGPI d'origen marí són capaços d'inhibir la síntesi del malonil-CoA, un dels principals moduladors en el control de la sacietat (Celi & Shuldiner, 2002; Kim [et al.], 2013).

Ara bé, diverses metanàlisis acaben conclouent que hi ha una manca d'evidència científica per establir aquesta relació. Els diferents estudis presenten diferències molt marcades en els dissenys experimentals; durada i tipus d'intervenció, característiques de la població d'estudi, dosis d'AGPI omega-3 administrades, ràtios d'EPA/DHA molt diferents, i també la inclusió o no inclusió de variables importants com l'exercici físic o la ingesta energètica total (Lorente-Cebrián [et al.], 2013; Martínez-Victoria & Yago, 2012).

La revisió sistemàtica d'estudis clínics intervencionals sobre els efectes dels AGPI omega-3 sobre l'augment de pes corporal en adults, realitzada l'any 2012 per Martínez-Victoria E. i Yago M., conclou que tots els estudis realitzats, excepte un, **no mostren relació entre el canvi de pes corporal i el consum d'AGPI omega-3** en individus adults (Martínez-Victoria & Yago, 2012).

## 1.2. AGPI OMEGA-3 I RESISTÈNCIA A LA INSULINA

**Els resultats sobre** els efectes dels AGPI omega-3 sobre l'homeòstasi de la glucosa i la **resistència a la insulina** dels estudis realitzats tant en rosegadors com en éssers humans **són inconsistents**. No es tenen clars els mecanismes d'acció dels omega-3 sobre el metabolisme de glucosa ni des del punt de vista sistèmic ni en teixits, i el fetge és l'òrgan diana més desconegut (Flachs, Rossmeisl & Kopecky, 2014; Mori, 2014; Poudyal, Panchal, Diwan & Brown, 2011).

Tot i aquests resultats negatius en els estudis clínics, estudis observacionals i de cohorts demostren com tant l'EPA com el DHA es troben relacionats amb la millora de la DM tipus 2 i la prevenció de les MCV i l'SM (Mori, 2014; Poudyal [et al.], 2011).

## 1.3. AGPI OMEGA-3 I HIPERTRIGLICERIDÈMIA

**Els AGPI omega-3 redueixen els triglicèrids (TG) plasmàtics en un 20-30%** aproximadament; però sembla que tenen poc efecte sobre el colesterol total (Mori, 2014).

Aquests efectes dels AGPI sobre els TG plasmàtics estan lligats a la **millora del NAFLD**, que és una de les manifestacions hepàtiques de l'SM.



La disminució dels TG plasmàtics s'associa amb l'activació del factor de transcripció hepàtic *Sterol Regulatory Element Binding-Protein* (SREPB-1), el qual estimula la síntesi de diferents enzims lipogènics.

Els AGPI omega-3 tenen un efecte directe sobre l'enzim diacil glicerol acil transferasa (DGAT) i inhibeixen el pas dels diacilglicerols a nous TG (Tejerina & Civeira, 2013). Aquestes dues accions es resumeixen en la disminució en la secreció hepàtica de VLDL, que són les lipoproteïnes que porten els TG a la sang.

D'altra banda, els AGPI omega-3, amb l'activació dels receptors nuclears de la família PPAR, augmenten el catabolisme dels TG i de les VLDL, i en milloren l'aclariment plasmàtic.

En individus amb sobrepès o amb dislipèmia també incrementen el colesterol HDL (HDLc). Aquests efectes, juntament amb la disminució dels TG plasmàtics, són dosi-depenent segons diversos autors (Jump, Depner & Tripathy, 2012; Mozaffarian & Wu, 2011).

En el fetge, els AGPI omega-3 eviten l'evolució de NAFLD a NASH, gràcies al seu paper antiinflamatori (figura 3), i eviten també la possible fibrosi hepàtica (figura 8).

Des del punt de vista histopatològic, un estudi del nostre grup demostrà com la intervenció amb EPA:DHA 1:1 evitava la inflamació hepàtica en rates sanes respecte a altres grups amb diferents ratios d'omega-3 (Taltavull [et al.], 2014).

## 2.4 AGPI OMEGA-3 I HIPERTENSIÓ ARTERIAL

Els AGPI omega-3 redueixen la pressió arterial (PA) d'una manera clínicament rellevant en individus amb hipertensió arterial (HTA) no tractats (Cabo, Alonso, & Mata, 2012).

Actuen com antagonistes dels receptors d'angiotensina II en els vasos sanguinis; per tant, milloren la relaxació vascular i disminueixen la PA (Mori, 2014).

També tenen un efecte supressor sobre l'aldosterona, de manera que inhibeixen el sistema renina-angiotensina-aldosterona, i disminueixen la vasoconstricció i, per tant, la PA (Cabo [et al.], 2012).

Indirectament els AGPI omega-3 també disminueixen la PA per altres vies: millora del perfil lipídic plasmàtic, disminució del ritme cardíac i millora de la composició i funció de l'endoteli vascular (Mori, 2014).

La funció endotelial va ser estudiada des del punt de vista histopatològic pel nostre grup (Taltavull [et al.], 2014). En aquest estudi es va veure com la intervenció amb AGPI omega-3 millorava la funció endotelial en models animals amb SM. Es va observar un augment de densitat i de les arrugues de les capes elàstiques de l'aorta, en el grup tractat amb EPA:DHA 1:1. Aquests canvis morfològics en la paret vascular indiquen una funcionalitat més gran del vas.

## 2. SÍNDROME METABÒLICA I ESTRÈS OXIDATIU

L'obesitat indueix un EO sistèmic per mitjà d'una producció irregular de citocines provinents dels adipòcits, les quals contribueixen al desenvolupament de l'SM i a l'augment de la producció d'ERO. A més, l'obesitat incrementa la càrrega metabòlica i augmenta el consum d'oxigen i, per tant, també la producció d'ERO per part de la cadena respiratòria mitocondrial.

Quan l'obesitat persisteix durant un període llarg de temps, les defenses antioxidants endògenes poden patir una depleció, i disminueixen l'activitat d'enzims com SOD, CAT o GPx. S'ha vist que l'activitat de la SOD i la GPx en individus obesos és significativament menor que en individus sans (Fernández-Sánchez [*et al.*], 2011; Ho, Karimi Galougahi, Liu, Bhindi, & Figtree, 2013).

També s'ha vist que diferents biomarcadors d'estrès oxidatiu, per exemple l'activitat augmentada de l'enzim SOD en eritròcits, estan més elevats en individus obesos i que es correlacionen directament amb l'índex de massa corporal (IMC), el percentatge de greix corporal, l'oxidació de les LDL i els nivells de TG a la sang (Fernández-Sánchez [*et al.*], 2011; Yubero-Serrano [*et al.*], 2013).

Sembla que la formació de compostos oxidants és secundària al procés patològic previ, en aquest cas l'obesitat i la inflamació. Ara bé, en el cas de l'SM, les ERO tenen una contribució addicional en la progressió d'altres determinants de l'SM, com ara el procés d'aterosclerosi o la resistència a la insulina.

En aquest sentit, diferents estudis demostren com un tractament antioxidant o inhibidor d'ERO pot millorar el procés ateroscleròtic i regular la hipersecreció d'adipocines, de la mateixa manera que pot disminuir la resistència a la insulina i les complicacions que se'n deriven (Fernández-Sánchez [et al.], 2011; Furukawa [et al.], 2004).

### **3. L'ESTRÈS OXIDATIU I ELS AGPI OMEGA-3**

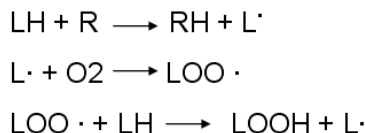
Els AGPI omega-3 d'origen marí es relacionen també amb la millora de l'EO, augmenten les activitats de la SOD i la GPx. Aquests efectes poden explicar l'augment de la capacitat antioxidant total del plasma determinada mitjançant el mètode ORAC (Lluís [et al.], 2013a).

D'altra banda, aquest mateix estudi demostra que els AGPI omega-3 augmenten la lipoperoxidació de les LDL en comparació amb altres AG vegetals.

#### **3.1. LA PEROXIDACIÓ LIPÍDICA: LA LIMITACIÓ DELS AGPI OMEGA-3**

En general, quan els greixos insaturats s'exposen a l'oxigen canvien les seves propietats organolèptiques i, per tant, químicoestructurals. Aquest procés és degut que els àtoms d'hidrogen dels grups funcionals (CH<sub>2</sub>) que es troben units per dobles enllaços, són especialment susceptibles a unir-se a les ERO. La pèrdua de l'hidrogen converteix l'AGPI en un nou RLL, el qual pot reaccionar amb l'oxigen i desencadenar una reacció en cadena que es coneix amb el nom de peroxidació lipídica (Venarucci [et al.], 1999).

### Figura 15: Peroxidació lipídica



La lipoperoxidació es divideix en tres etapes : iniciació, propagació i terminació (figura 15).

a) La primera és causada generalment per l'atac d'un RLL als AGPI dels fosfolípids de membrana. En termes químics es tracta d'una reacció de reducció en què l'RLL extreu un àtom d'hidrogen d'un metilè (-CH<sub>2</sub>-) i dóna lloc a un radical d'àcid gras que en la figura està representat com a L·.

b) Aquest L· reacciona ràpidament amb l'oxigen i es produeix un radical peroxil (LO<sub>2</sub>·). Aquest radical té la capacitat de reaccionar amb un altre lípid insaturat pròxim, i continuar amb la reacció sostraint-li un àtom d'hidrogen i formant un nou LO<sub>2</sub>· més un hidroperòxid LOOH.

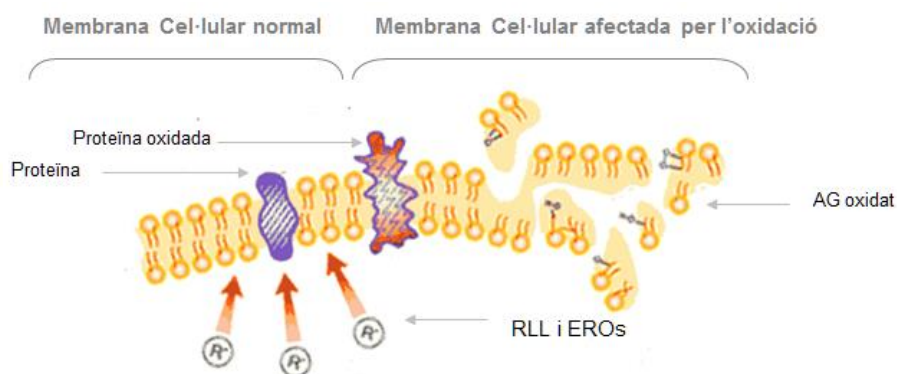
Així doncs, sempre hi haurà un radical peroxil per continuar la cadena, fins a arribar a la destrucció total de la membrana.

c) La tercera fase es la terminació que es dóna quan dos radicals peroxils reaccionen entre si i formen un compost no radical.

Per tant, el grau d'insaturació dels AG no influeix únicament en la fluïdesa i la capacitat de transport de la membrana, sinó que també es relaciona amb la seva facilitat d'oxidació. A més nombre de dobles enllaços, més fàcil és la peroxidació lipídica.

Els AGPI són oxidables més fàcilment que la resta d'AG, de manera que poden peroxidar-se compromentent la integritat de la membrana i les seves funcions corresponents (figura 16).

**Figura 16: Peroxidació lipídica de les membranes**



Un exemple clar de la pèrdua de funcionalitat i d'implicació clínica de la peroxidació lipídica és l'oxidació de les lipoproteïnes LDL. L'oxidació d'aquestes lipoproteïnes contribueix a la formació de la placa d'ateroma. Per tant, augmenta el risc de patir MCV, com hem explicat en la figura 9.

## 4. L'ESTRÈS OXIDATIU, ELS AGPI I ELS POLIFENOLS

Diferents estudis han classificat els antioxidants d'origen fenòlic com els antioxidants externs que disposen de més afinitat per a les membranes, i així resulten els antioxidants més eficaços per disminuir l'oxidació de les membranes riques en AGPI (Maestre, Micol, Funes, & Medina, 2010; Pazos, Lois, Torres, & Medina, 2006).

La capacitat d'aquests antioxidants per frenar la lipoperoxidació es dona per diferents vies, les quals inclouen la quelació de metalls o la captació dels radicals lliures. Totes aquestes vies donen lloc a la disminució de l'EO.

Es creu que els captadors de radicals, en anglès *free radical scavengers* (FRS), actuen principalment sobre els radicals peròxids, a causa que tenen baixa energia i més temps de vida. L'acció dels FRS sobre radicals d'elevada energia, com el radical hidroxil, és menys probable perquè aquest radical és molt reactiu sobre molècules properes de tota mena. Ara bé, també s'ha vist que els polifenols, més concretament les procianidines, augmenten el metabolisme del glutatió; per tant, indirectament també milloren la defensa antioxidant no enzimàtica de l'organisme (Puiggròs [et al.], 2005).

Totes les classes fenòliques presenten els requisits estructurals dels FRS, tot i que la seva activitat varia molt entre si.

En el cas concret de les proantocianidines, diferents estudis han demostrat que no només actuen com a FRS sinó que també estan

implicades en l'expressió de gens que afecten el sistema redox de l'organisme (Puiggròs [et al.], 2005).

Això les relaciona directament amb la protecció del dany oxidatiu produït a les cèl·lules en situació d'EO. Tot i així, encara es necessiten estudis per determinar en quines vies metabòliques concretes intervenen (Puiggròs [et al.], 2005).

## 5. ELS POLIFENOLS I LA SÍNDROME METABÒLICA

Apart de la seva capacitat antioxidant, els polifenols s'han relacionat amb alguns trets de l'SM, com ara la inflamació associada a la obesitat, la hipertensió i la dislipèmia (Martinez-Micaelo [et al.], 2012; Osakabe, 2013).

Amb relació a la inflamació, els polifenols modulen els mediadors inflamatoris provinents de l'AA (AGPI omega-6) amb la consegüent disminució de la secreció de citocines i molècules d'adhesió (Martinez-Micaelo [et al.], 2012).

Quan a la hipertensió, els polifenols afavoreixen la vasodilatació per inducció de l'enzim òxid nítric sintasa (NOS), i pel que fa a la dislipèmia sembla que els polifenols indueixen l'oxidació dels AG per part del mitocondri per la via de les MAP cinases (MAPK). (Osakabe, 2013.)

Així doncs, si els polifenols tenen efectes directes sobre l'SM, a banda dels seus efectes protectors enfront l'oxidació dels AGPI omega-3. La possible acció sinèrgica d'aquests mecanismes fa pensar que els polifenols són bons compostos en la prevenció o tractament de l'SM i l'EO que s'hi associa.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME

METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

## INTRODUCCIÓ: *Capítol II*

---



## *Hipòtesis i objectius*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

Els àcids grassos poliinsaturats omega-3, especialment d'origen marí, tenen efectes positius sobre les diferents variables que componen la síndrome metabòlica (SM).

L'SM és una entitat clínica controvertida que apareix, amb àmplies variacions fenotípiques, en persones amb una predisposició endògena determinada genèticament i fortament condicionada per factors ambientals com una dieta inadequada. La seva importància recau en el fet que patir SM incrementa el risc de patir alguna malaltia cardiovascular.

Per diagnosticar-la s'han de donar com a mínim tres dels cinc següents factors de risc de malaltia cardiovascular: obesitat, trigliceridèmia, nivells de colesterol HDL disminuïts, hipertensió arterial i resistència a la insulina.

Els AGPI omega-3 tenen efectes beneficiosos sobre gairebé totes aquestes variables; però presenten un handicap important, el seu elevat grau de peroxidació. L'SM es relaciona amb l'estrès oxidatiu i, en presència de radicals lliures, els AGPI omega-3 de les membranes pateixen peroxidació lipídica i arriben a causar la mort cel·lular.

Diferents estudis han classificat els antioxidants d'origen fenòlic com els antioxidants externs que disposen de més afinitat per a les membranes, així resulten els antioxidants més eficaços per disminuir l'oxidació de les membranes riques en AGPI.

Davant d'aquestes evidències i la relació entre els diferents processos, la nostra hipòtesi de treball suposa que:

**Una dieta enriquida en AGPI omega-3, amb la relació adequada, prevé la síndrome metabòlica i l'estrès oxidatiu associat. Aquesta prevenció o millora dels paràmetres alterats en l'SM, es veu incrementada amb l'administració dietètica de polifenols.**

### **Objectiu principal**

- Avaluar l'efecte d'una dieta rica en AGPI omega-3 i compostos fenòlics, en rates alimentades amb una dieta *high fat/ high sucrose*, la qual indueix l'SM.

## Objectius secundaris:

- Definir l'entitat SM en les rates intervingudes.
- Mesurar els diferents biomarcadors d'estrès oxidatiu relacionats amb l'SM.
- Relacionar l'SM i l'EO amb les ingestes d'AGPI omega-3, polifenols o la barreja dels dos.
- Definir el perfil lipídic hepàtic.
- Relacionar les diferents espècies lipídiques hepàtiques amb l'entitat clínica SM.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015



## *Material i mètodes*





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

## 1. DISSENY DE L'EXPERIMENT

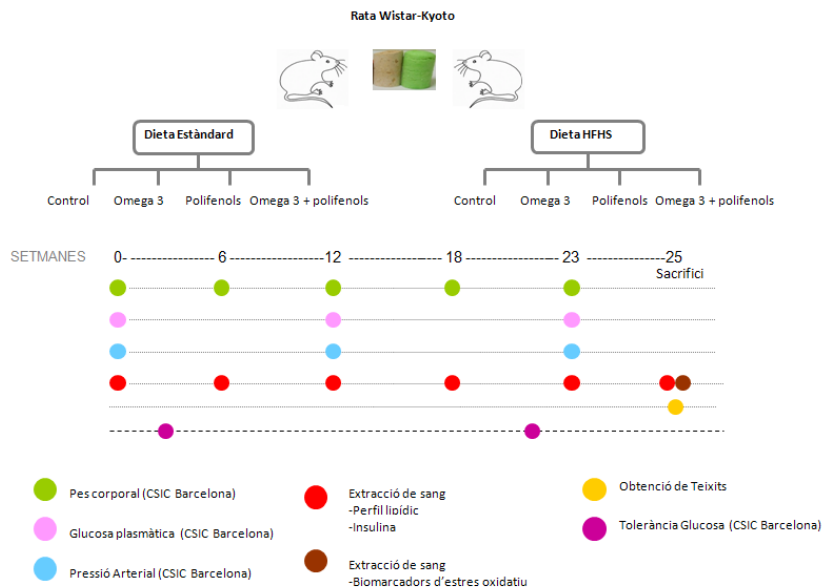
Per dur a terme els objectius descrits vam dissenyar el següent experiment.

Quatre grups de rates alimentades amb una dieta estàndard com a controls i quatre grups de rates alimentades amb una dieta *high fat / high sucrose* (HFHS), van ser suplementades amb AGPI n-3 , amb polifenols i amb la barreja dels dos, per poder valorar-ne l'efecte.

El disseny de l'experiment junt amb la seva cronologia apareix detallada en la figura 17.

Les rates van ser alimentades durant sis mesos.

**Figura 17. Disseny i cronologia de l'experiment**



## 1.1. MODEL ANIMAL

Els animals utilitzats en aquest estudi van ser rates Wistar Kyoto femelles de 4 a 6 setmanes de vida (Charles River Laboratories Wilmington, Massachusetts, EUA). Aquestes rates es van tractar seguint els protocols establerts pel Comitè Ètic d'Animals d'Experimentació del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC-Madrid).

Vint-i-vuit rates Wistar Kyoto van ser aleatoritzades com a grup per alimentar amb dieta estàndard. A l'hora aquest grup es va continuar aleatoritzant en quatre subgrups diferents segons el suplement afegit a la dieta base (estàndard), així es van formar 4 subgrups de 7 rates cadascun: tractament control sense suplement (tractament control), tractament complementat amb AGPI omega-3 (tractament omega-3), tractament complementat amb polifenols (tractament polifenols) o tractament complementat amb d'AGPI n-3 i polifenols (tractament mixt).

Els animals es van mantenir estabulats a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQA-CSIC) de Barcelona sota les següents condicions:

- Cicle de 12 hores llum/obscuritat.
- Humitat relativa del  $50 \pm 10\%$ .
- Temperatura adequada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- Període d'aclimatació de 8 dies abans d'iniciar-se l'estudi.
- Aigua del Montseny (Aigua de Ribes, Barcelona, Espanya).
- Dietes segons el grup experimental (especificades al punt 1.2.).

## 1.2. DIETES

Es van utilitzar dos tipus de **dietes base** per dur a terme l'experiment:

**Dieta estàndard (ESTD):** les 28 rates d'aquest grup van ser alimentades amb pinso comercial Teklad Global diet® de Harlan Laboratories.INC. Dissenyat per al manteniment del pes corporal en rosegadors. El seu contingut calòric és de 2,9 Kcal/g de pinso.

Aquest pinso es va enriquir amb diferents suplementes en funció del grup de tractament i va donar lloc a quatre pinsos diferents basats en la dieta estàndard. Els suplementes afegits (omega-3, soja i polifenols) es van calcular en funció de la quantitat de pinso que menjava cada grup de rates, estàndard i HFHS, perquè tots els animals ingerissin la mateixa quantitat de suplementes.

La quantitat exacta dels ingredients per a cada subtipus de pinso estàndard apareix reflectida en la taula 3.

- **Tractament ESTD control:** pinso comercial Teklad Global diet® de Harlan Laboratories.INC sense cap suplement.
- **Tractament ESTD omega-3:** pinso comercial Teklad Global diet® de Harlan Laboratories.INC enriquit amb olis de peix n6/n3 (2:1) i en el cas dels n3, amb la relació EPA/DHA (1:1), determinada com a òptima en un experiment previ (tesi doctoral: Laura Lluís, "Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados de origen marino sobre el estrés oxidativo en ratas con síndrome metabólico", 2012). (Lluís [et al.], 2013a; Molinar-toribio [et al.], 2015; Taltavull [et al.], 2014.)

Els olis de peix van ser proporcionats per l'Institut d'Investigacions Marines- CSIC de Vigo.

- **Tractament ESTD polifenols:** pinso comercial Teklad Global diet® de Harlan Laboratories.INC enriquit amb polifenols. 95% proantocianidines, provinents de llavors de raïm de la marca comercial Grajfnol® de la casa JF-Natural Products, China (*ref.* 002-1109018-23).
- **Tractament ESTD mixt:** pinso comercial Teklad Global diet® de Harlan Laboratories.INC enriquit tant amb AGPI omega-3 com amb polifenols.

-Fórmula original:

1.500 g pinso comercial liofilitzat Teklad Global diet® + 2250 mL aigua + 37.5 g de gelatina + els ingredients per afegir en cada cas [omega-3, polifenols o la barreja dels dos]) + lecitina de soja com emulsionant + TBHQ (Tetra-butilhidroquinona) com a antioxidant.

**Taula 3. Composició del pinso estàndard i dels diferents tractaments**

DIETA ESTÀNDARD								
Tractament	Pinso comercial Teklad Global diet (g)	Greix afegit (mL)	TBQH (mg)	Polifenols (mg)	Lecitina (g)	Gelatina (g)	Aigua (mL)	Colorant (mg)
ESTD control	1500	28,5 (soja)	60		9	37,5	2250	
ESTD omega-3	1500	28,5 (AGPI n-3)	60		9	37,5	2250	800(Verd)
ESTD polifenols	1500	28,5 (soja)	60	1320	9	37,5	2250	800(Vermell)
ESTD mixt	1500	28,5 (AGPI n-3)	60	1320	9	37,5	2250	800(Blau)

Es va considerar la puresa dels olis del 100%, la *densitat* de referència va ser la de l'oli d'oliva  $d=0.918$  g/mL.

**Dieta high fat/high sucrose (HFHS):** les 28 rates d'aquest grup van ser alimentades amb pinso comercial Basal Mix for HFD® de Harlan Laboratories.INC. Dissenyat per induir o accelerar característiques lligades al excessiu consum de greix en animals de laboratori. El seu contingut calòric és de 4,6 Kcal/g de pinso.

Aquest pinso es va enriquir amb diferents suplementes en funció del grup de tractament i va donar lloc a quatre pinsos diferents basats en la dieta HFHS. Els suplementes afegits (omega-3, soja i polifenols) es van calcular en funció de la quantitat de pinso que menjava cada grup de rates, estàndard i HFHS, perquè tots els animals ingerissin la mateixa quantitat de suplementes.

La quantitat exacta dels ingredients per a cada subtipus de pinso HFHS apareix reflectida en la taula 4.

- **Tractament HFHS control:** pinso comercial Basal Mix for HFD® de Harlan Laboratories.INC sense cap suplement.
- **Tractament HFHS Omega-3:** pinso comercial Basal Mix for HFD® de Harlan Laboratories.INC enriquit amb olis de peix de les mateixes condicions anteriors.
- **Tractament HFHS polifenols:** pinso comercial Basal Mix for HFD® de Harlan Laboratories.INC enriquit amb proantocianidines amb les mateixes condicions anteriors.
- **Tractament HFHS mixt.**

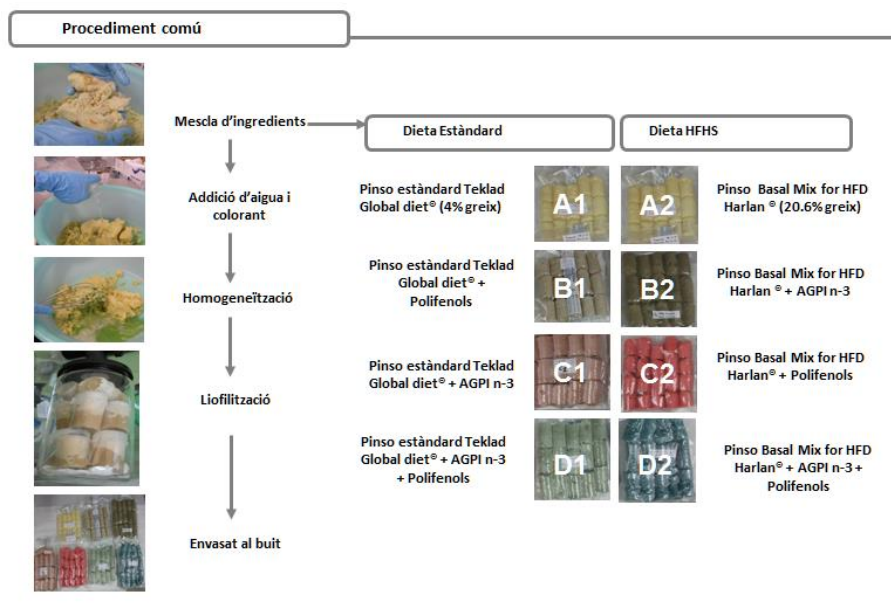
- Fórmula original:

1.500 g pinso comercial liofilitzat Basal Mix for HFD, Harlan® (20.6%) + 375 mL aigua + 37.5 de gelatina + els ingredients per afegir en cada cas [omega-3, polifenols o la barreja dels dos] + lecitina de soja com emulsionant + TBHQ (tetra-butilhidroquinona) com a antioxidant.

**Taula 4. Composició del pinso HFHS i dels diferents tractaments**

DIETA HFHS								
Tractament	Pinso comercial Basal mix for HFD (g)	Greix afegit (mL)	TBQH (mg)	Polifenols (mg)	Lecitina (g)	Gelatina (g)	Aigua (mL)	Colorant (mg)
HFHS control	1500	36 (soja)	60		33	37,5	375	
HFHS omega-3	1500	36 (AGPI n-3)	60		33	37,5	375	800(Verd)
HFHS polifenols	1500	36 (soja)	60	1635	33	37,5	375	800(Vermell)
HFHS mixt	1500	36 (AGPI n-3)	60	1635	33	37,5	375	800(Blau)

Els dos tipus de dietes es van preparar al CSIC de Barcelona seguint el diagrama de flux de la figura 18.

**Figura 18. Elaboració i composició dels pinsos**

## 2. OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Després del tractament, tots els animals van ser sacrificats prèvia anestèsia amb ketamina/xilacina (ketamina: Imalgene 1.000, Merial Laboratoris SA, Barcelona, Espanya), (xilacina: Rompun 2%, Química Farmacèutica SA, Barcelona, Espanya) a les concentracions de 80 mg/kg i 10 mg/kg respectivament per via intraperitoneal.

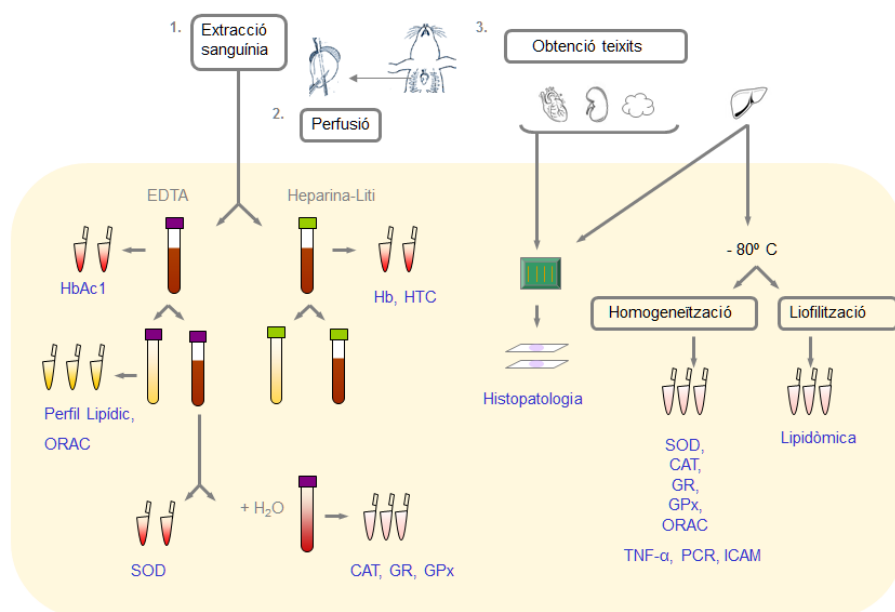
El sacrifici es va dur a terme mitjançant exsanguinació per punció cardíaca (xeringues de 5mL Bs-05s Terumo). Aquesta tècnica va permetre l'obtenció del màxim volum de sang. Un cop extreta la sang, es va recollir en tubs anticoagulants amb EDTA i heparina-liti. (BD Vacutainer, ref. 367864 i ref. 368884 respectivament.)



Abans de l'obtenció dels teixits es va realitzar una perfusió cardíaca (equip per la infusió de solucions per gravetat Intrafix®, ref.4062957E) amb sèrum fisiològic (vitulia 0.9% , ref.99979.5) per tal d'evitar l'acumulació de sang en teixits esponjosos com el fetge o els ronyons.

A la figura 19 mostrem un esquema de l'obtenció de les mostres.

**Figura 19. Resum de l'obtenció de les mostres**



## 2.1. MOSTRES DE SANG TOTAL

Abans de separar el plasma dels eritròcits, es va reservar una alíquota de sang total del tub d'EDTA per a la determinació de l'hemoglobina glicosil·lada (HbA1c), i dues alíquotes del tub d'heparina-liti per a la quantificació de l'hemoglobina total (Hb) i l'hematòcrit (HTC).

## 2.2. MOSTRES D'ERITRÒCITS

Els eritròcits es van separar del plasma per centrifugació dels tubs de sang durant 15 minuts a 850 xg a una temperatura de 4°C.

Els eritròcits es van rentar dues vegades amb sèrum fisiològic (NaCl 9%) amb dues centrifugacions de 5 minuts de durada a 1300 xg a una temperatura de 4°C. Els eritròcits provinents del tub d'heparina-liti es van aliquotar i reservar a -80°C. Els eritròcits provinents del tub d'EDTA es van processar de la següent manera depenent de les determinacions que calia realitzar:

-Eritròcits per analitzar els enzims antioxidants CAT, GR i GPx: els eritròcits es van diluir 1:10 amb aigua bidestil·lada freda en tubs de 10 ml, fet que provocà la lisi dels eritròcits. Aquest hemolitzat es va guardar en alíquotes a -80°C, fins a la seva determinació.

-Eritròcits per analitzar l'enzim antioxidant SOD: els eritròcits es van congelar i descongelar en tubs de 10 ml de vidre *pyrex*, a -20°C. Un cop descongelats s'afegí aigua bidestil·lada freda per assegurar-ne la lisi. Tot seguit es va afegir una mescla d'etanol: cloroform (6,25:3,75) per poder extreure'n l'hemoglobina; després es van centrifugar 5 minuts a 1900 xg a 4°C. La fase del sobrenadat que contenia la SOD es va guardar en alíquotes a -20°C fins a la seva determinació.

### 2.3. MOSTRES DE PLASMA

El plasma obtingut dels dos tipus de tubs es va guardar en tubs d'Eppendorf a  $-80^{\circ}\text{C}$  aliquotat de manera adient a les determinacions previstes.

En el plasma del tub d'EDTA es va determinar el perfil lipídic: colesterol total, colesterol HDL (HDL-C), colesterol LDL (LDL-C), triglicèrids (TG) i la capacitat antioxidant total del plasma (ORAC).

### 2.4. MOSTRES DE TEIXITS

Les mostres de teixit adipós, fetge, aorta i ronyó es van rentar amb sèrum fisiològic; immediatament després es van fixar en formol ( $\text{CH}_2\text{O}$  ref. 141328.1211 Panreac) diluït al 10% i posteriorment es van incloure en parafina.

Part de la mostra de fetge també es va congelar directament a  $-80^{\circ}\text{C}$ , per a l'estudi dels paràmetres relacionats amb l'EO, la inflamació i per a les determinacions de composició lipídica mitjançant lipidòmica.

Els blocs de parafina i les preparacions dels talls dels teixits van ser realitzats per l'empresa Eldine Laboratory, Tarragona. Les seccions dels blocs es van realitzar amb el micròtom (Microm HN 355 s) i van esdevenir talls de 3 micres de gruix, que, un cop fixats en el portaobjectes, es van tenyir amb la tinció clàssica hematoxilina-eosina.

## **3. ESTUDI DELS PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'SM**

### **3.1. PES CORPORAL**

Com mostra la figura 17, el pes corporal es va mesurar cada sis setmanes al llarg de l'experiment. Es va mesurar amb la balança Shimadzu model EB-2800M, al CSIC de Barcelona.

### **3.2. PRESSIÓ ARTERIAL**

Es va mesurar la pressió arterial a l'inici de l'experiment, i en les setmanes 12 i 23, sempre entre les 10:00h del matí i les 15:00 h de la tarda per evitar variacions degudes al cicle circadià.

Els animals eren col·locats en un cep de manera individual que els deixava la cua lliure. Un cop immobilitzat, se'ls escalfava la cua amb una làmpada d'infrarojos (Phillips® de 250w) per dilatar la vena cabdal des d'on es mesurava la pressió amb un mesurador de pressió arterial no invasiu per a rosegadors (Panlab Harvard Apparatus®). (Figura 22 A.)

El mesurador de la pressió estava acoblat a un transductor de pols per a rata.

### **3.3. GLUCOSA**

Per a la determinació de glucosa, es van rasurar les cames posteriors dels animals i es van deixar en dejú durant 24 h.

En el moment de la determinació es va localitzar la vena safena situada per sobre del moviment de flexió del genoll de la pota posterior de l'animal. Un cop localitzada s'hi va accedir mitjançant una agulla 23G, de manera que es produís una gota de sang.

Aquesta gota es va posar en contacte amb l'extrem de la tira reactiva d'un glucòmetre Ascenia ELITE XL (Bayer Consumer care AG, Basel, Swizerland).(Figura 20 B.)

**Figura 20. Mesura de la pressió i la glucosa**



A: Mesura de la pressió arterial.

B: Procediment per a la mesura de la glucosa plasmàtica.

### 3.4. INSULINA

La determinació de la insulina es va portar a terme mitjançant un equip ELISA de la casa comercial Millipore corporation, Billerica, MA, EUA.

La tècnica ELISA va requerir del següent procediment:

Es van repartir 10 $\mu$ L de plasma en cada pouet de la placa, els quals es trobaven recoberts d'anticossos (Ac) monoclonals d'insulina antirata. Es va deixar incubant 1 hora per permetre la captura de molècules d'insulina. Després de la incubació, es van afegir 80  $\mu$ L de la solució d'anticòs policlonal conjugat amb biotina, el qual es va unir a la insulina capturada, i es va tornar a incubar una altra hora. Després de realitzar

un procés de rentat dels reactius en excés, es van afegir 100 µL de la solució de peroxidasa de rave picant conjugada amb avidina (avidina-HRP), la qual es va unir als anticossos amb biotina. I es va incubar 30 minuts. Es va tornar a realitzar un procés de rentat dels reactius en excés. Finalment es va afegir el substrat 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) que es va unir a l'avidina-HRP. Es va incubar la placa de 5 a 20 minuts fins que es va veure d'un color blau intens.

L'activitat enzimàtica es va mesurar espectrofotomètricament per l'augment de l'absorbància a 450 nm en un lector de plaques (SpectraMax M5). La concentració de la insulina es va determinar comparant la densitat òptica (DO) de les mostres amb la corba estàndard mesurada en la mateixa placa. Els resultats es van expressar en ng/ml.

### **3.5. HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)**

Per a la determinació quantitativa de l'HbA1c, es va utilitzar un assaig de turbidimetria en làtex de la casa Spinreact (ref. 43091) en sang total. L'assaig mesura la inhibició de l'aglutinació de les partícules de làtex de la següent manera:

La molècula d'Hb s'allibera dels eritròcits per acció d'una proteasa. Les partícules de làtex estan recobertes per un Ac monoclonal anti-HbA1c que s'aglutinen en presència d'un reactiu constituït per partícules de polímer sensibilitzades amb haptens d'HbA1c. Els derivats resultants es transformen en hematina alcalina que presenta una absorció a 600 nm. L'HbA1c present a la mostra es fixa als anticossos de les partícules de làtex competeixin inhibint-ne l'aglutinació. Així el grau d'aglutinació és indirectament proporcional a la concentració d'HbA1c de la mostra i es

pot quantificar per comparació amb un calibrador de concentració coneguda de la casa Spinreact (ref. 43096).

La concentració de l'HbA1c s'expressa com a percentatge respecte l'hemoglobina total (THb) de la mostra.

## 3.6 PERFIL LIPÍDIC

### 3.6.1. Colesterol total (TCOL)

Per a la determinació quantitativa del TCOL, es va utilitzar un assaig colorimètric de determinació en plasma de la casa Spinreact (ref. 41020).

En aquest assaig, el plasma provinent del tub d'EDTA diluït 1:2 amb sèrum fisiològic s'incuba amb l'enzim colesterolesterasa (CHE), el qual separa el colesterol dels AG. Aquest colesterol lliure, juntament amb l'oxigen i per l'acció de l'enzim colesterol oxidasa (CHOD), esdevé 4-colestenona i  $H_2O_2$ .

Finalment, el peròxid d'hidrogen reacciona amb 4-aminofenazona (4-AF) i p-clofenol, en una reacció catalitzada per la peroxidasa, que dóna lloc a una coloració vermella que es pot llegir a una longitud d'ona de 500 nm (Young DS,2001).

La intensitat del color format és proporcional a la concentració de colesterol present en la mostra i es va mesurar amb l'autoanalitzador COBAS MIRA.

A banda del calibrador inclòs en l'assaig, la determinació del TCOL, igual que en l'assaig dels TG i les colesterols HDL i LDL, també requereix dos controls de qualitat, que s'analitzen juntament amb les mostres,

SPINTROL H Normal i SPINTROL H patològic (ref. 1002120 i 1002210 respectivament).

Els resultats es van expressar en mmol/L.

### 3.6.2. Triglicèrids (TG)

Per a la determinació quantitativa dels TG, es va utilitzar un assaig colorimètric de determinació en plasma de la casa Spinreact (ref. 41033).

En aquest assaig, el plasma provinent del tub d'EDTA diluït 1:2 amb sèrum fisiològic s'incuba amb l'enzim lipoproteïnlipasa (LPL), el qual separa els TG en glicerol i AG lliures. El glicerol és fosforilat per glicerolfosfatdeshidrogenasa (GPO) gràcies a l'ATP i a l'activitat de l'enzim glicerol quinasa (GK), per produir glicerol-3-fosfat (G3P) i adenosina-5-difosfat (ADP). El G3P llavors és convertit a dihidroxiacetona fosfat (DAP) i peròxid d'hidrogen ( $H_2O_2$ ) gràcies a l'acció de l'enzim GPO.

Finalment, el peròxid d'hidrogen reacciona amb 4-aminofenazona (4-AF) i p-clofenol, en una reacció catalitzada per la peroxidasa, que dona lloc a una coloració vermella que es pot llegir per espectrofotometria a una longitud d'ona de 500 nm (Buccolo G, [et al.] 1973 i Young DS, 2001).

La intensitat del color format és proporcional a la concentració de TG presents en la mostra i es va mesurar amb l'autoanalitzador COBAS MIRA.

Els dos controls de qualitat van ser els mateixos que els utilitzats en la determinació del colesterol

SPINTROL H Normal i SPINTROL H patològic (ref. 1002120 i 1002210 respectivament).



Els resultats es van expressar en mmol/L.

### 3.6.3. Colesterol HDL (HDL-C)

Per a la determinació quantitativa del HDL-C, es va utilitzar un assaig colorimètric de determinació en plasma de la casa Spinreact (ref. 1001096).

Aquest equip permet la determinació directa de HDL sense la necessitat de pretractar o centrifugar la mostra.

El mètode es basa en les propietats d'un detergent que solubilitza només la fracció HDL, de manera que el colesterol HDL s'allibera reaccionant amb la CHE, la CHOD i els cromògens. La resta de lipoproteïnes i els quilomicrons són inhibits a causa de l'adsorció del detergent en les seves superfícies i les fan resistents a l'enzim. La mostra va ser el plasma provinent del tub d'EDTA diluït 1:2 amb sèrum fisiològic.

La determinació es realitza en dos passos:

1. Eliminació de lipoproteïna no HDL: la colesterol esterasa (CHE) desfà els esters de colesterol en colesterol lliure i AG. El colesterol lliure reacciona amb l'oxigen i amb la colesterol oxidasa (CHOD) i produeix 2  $H_2O_2$ . La catalasa és l'enzim que degrada aquest peròxid a  $H_2O$  i oxigen molecular.
2. Mesura de la HDL-C: la CHE allibera el colesterol que reacciona amb l'oxigen i la CHOD i produeix  $H_2O_2$ , el qual gràcies a l'acció de les peroxidases produeix un cromòfor que es llegeix per espectrofotometria a 600 nm.

La intensitat del color format és proporcional a la concentració d'HDL-C present en la mostra.

Igual que en l'assaig dels TG i del TCOL, la determinació del C-HDL també requereix dos controls de qualitat, que s'analitzen juntament amb les mostres, SPINTROL H Normal i SPINTROL H patològic (ref. 1002120 i 1002210 respectivament).

Els resultats es van expressar en mmol/L.

#### **3.6.4. Colesterol LDL (LDL-C)**

Per a la determinació quantitativa del LDL-C, es va utilitzar un assaig colorimètric de determinació en plasma de la casa Spinreact (ref. 41023). Amb el mateix fonament i procediment realitzat per a la determinació del HDL-C, però en aquest cas amb els reactius específics per la determinació de LDL-C

La mostra també va ser plasma provinent del tub d'EDTA diluït 1:2 amb sèrum fisiològic. Els resultats es van expressar en mmol/L.

## **4. ESTUDI DELS PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'ESTRÈS OXIDATIU**

### **4.1. MOSTRES DE SANG**

#### **4.1.1. DETERMINACIONS PRÈVIES**

La determinació de l'hemoglobina (Hb) i l'hematòcrit (HTC) és una determinació prèvia necessària en l'estudi dels paràmetres relacionats amb l'EO i determinats a la sang, ja que les unitats d'alguns dels quals estan expressades amb relació als g d'Hb.

#### **4.1.1.1 Hemoglobina (Hb)**

La quantitat d'Hb continguda en sang total es va determinar mitjançant la reacció Drabkin (QCA ref. 994933) a partir de sang total provinent del tub d'heparina-liti.

El ferro ferrós ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de l'hemoglobina, oxihemoglobina i carboxihemoglobina, s'oxida a ferro fèrric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a causa de la presència del ferricianur i dóna lloc a la metahemoglobina, la qual, en presència del ió cianur, origina cianometahemoglobina, que es mesura a 540 nm en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 25 (Drabkin & Austin, 1935).

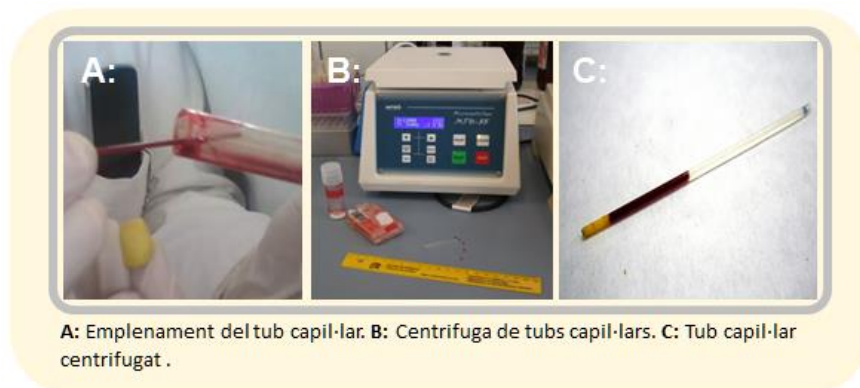
Els resultats es van expressar en g d'Hb per cada 100 ml de sang. La concentració es va determinar per comparació amb una recta patró, realitzada a partir del l'estàndard d'Hb (QCA ref. 999523)

#### **4.1.1.2 Hematòcrit (HTC)**

Per la determinació de l'HTC, es va introduir un capil·lar (Hirschann-Laborgerate ref. 9100270) en el tub de sang amb heparina-liti que es va omplir per capil·laritat i es va taponar amb plastilina. El capil·lar es va centrifugar a la centrífuga de capil·lars (Microcentrífuga MPW-55) a 8064 x g durant 3 minuts per separar plasma i eritròcits (figura 21).

Es va calcular el percentatge d'eritròcits presents en la mostra mitjançant la fórmula següent: % eritròcits = (cm eritròcits/cm totals) x 100.

**Figura 21. Determinació de l'hematòcrit**



## 4.1.2. SISTEMES ANTIOXIDANTS ENZIMÀTICS

### 4.1.2.1 Superòxid dismutasa (SOD)

L'activitat enzimàtica de la SOD es va mesurar seguint el mètode (Mirsa H P. and Fridovich I, 1972).

Aquest mètode es fonamenta en el fet que l'epinefrina s'oxida a pH bàsic. Durant aquesta oxidació es formen radicals superòxids que actuen sobre la mateixa epinefrina i formen un adrenocrom detectable per espectrofotometria a 480 nm. Si en la cubeta on produeix l'oxidació s'afegeix una mostra que contingui l'enzim SOD, els radicals superòxids són captats per aquest enzim i disminueix la producció d'adrenocrom.

Les mostres utilitzades van ser les extraccions de SOD eritrocitàries, realitzades anteriorment (veure punt 2.2. de "Material i mètodes").

Els reactius utilitzats van ser els següents:

Epinefrina (Sigma ref. E-4375) 6 mM a la concentració de 19,9 mg/10 mL d'àcid clorhídric 1 mM i Tampó carbonatat 50 mM, pH 10,2 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  Merck ref.6392;  $\text{NaHCO}_3$  Probus ref. 2030) amb  $\text{EDTA Na}^{2+}$  0,1 mM (Merck ref. 1.08418.0100).

Primer es va avaluar la corba d'autooxidació de l'epinefrina durant 15 minuts i posteriorment es va repetir amb diferents dilucions de mostra (1:50; 1:25; 3:50 i 2:25) per aconseguir determinar la  $I_{50}$  (concentració d'enzim a la qual s'inhibeix la formació del adrenocrom un 50%).

Les lectures es van realitzar en un espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 25. Els resultats es van expressar en unitats/gHb. En aquest cas, una unitat és la quantitat de mostra que inhibeix en un 50% la transformació de l'adrenalina a adrenocrom a pH bàsic.

#### **4.1.2.2 Catalasa (CAT)**

L'activitat enzimàtica de la CAT es va mesurar seguint el mètode (Cohen G. Dembeic D. and Marcus J., 1970), el qual està fonamentat en l'activitat fisiològica de l'enzim catalasa. Aquest enzim converteix el peròxid d'hidrogen en oxigen i aigua, i intervé, per tant, en la destoxicació de la cèl·lula. Aquest mètode mesura el grau de desaparició o decrement del peròxid d'hidrogen els 30 primers segons d'entrar en contacte amb la mostra, amb una lectura espectrofomètrica a 240 nm.

Les mostres utilitzades van ser els hemolitzats d'eritròcits provinents del tub EDTA (vegeu punt 2.2. de "Material i mètodes").

Els reactius utilitzats van ser els següents:

Tampó fosfat potàssic 100 mM de pH 7,5 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Panreac ref.121509.1210;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  Panreac ref. 141512.1210) i tampó fosfat potàssic amb  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck ref. 8599) 17%.

Les mostres es van llegir durant 1 minut en l'espectrofotòmetre Perkin Elmer Lambda 25. Els resultats es van expressar en mmol  $\text{H}_2\text{O}_2$ /minut/gHb (fent referència als mmols d' $\text{H}_2\text{O}_2$  transformats).

#### 4.1.2.3. Glutatió reductasa (GR)

L'activitat enzimàtica de la GR es va mesurar seguint el mètode descrit (Wheeler, Salzman, Elsayed, Omaye, & Korte, 1990).

El mètode està fonamentat en l'activitat fisiològica de la GR que redueix el GSSG a GSH en presència de NADPH, que li cedeix l'hidrogen i es converteix en  $\text{NADP}^+$ . Aquest mètode mesura la formació de  $\text{NADP}^+$  amb la lectura espectrofotomètrica a 340 nm en l'autoanalitzador COBAS MIRA.

Les mostres utilitzades van ser els hemolitzats d'eritròcits provinents del tub EDTA (vegeu punt 2.2. de "Material i mètodes") diluïdes 1:5 en tampó fosfat.

Els reactius utilitzats van ser el següents:

Tampó fosfat 0,25 M 2 mM EDTA pH 7.4 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  Panreac ref.121509.1210;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  Panreac ref. 121509.1210).GSSG (glutatió oxidat) 20 mM (Sigma ref. G45501). NADPH 2 mM (Sigma ref. N7550)

Els resultats es van expressar en  $\mu\text{mol}/\text{minut}/\text{gHb}$  (fent referència als  $\mu\text{mols}$  de  $\text{NADP}^+$  formats).

#### 4.1.2.4. Glutatió peroxidasa(GPx)

Igual que en el cas de la GR, l'activitat enzimàtica de la GPx es va mesurar seguint el mètode descrit per Wheeler [et al.] (1990).

La GPx és un enzim que depèn de seleni que catalitza la reducció del peròxid d'hidrogen i dels hidroperòxids fins a H<sub>2</sub>O en presència de GSH. La seva eficàcia va molt lligada a la GR, necessària per regenerar el GSH i, en conseqüència al NADPH.

Els reactius utilitzats van ser els següents:

Tampó fosfat 100 mM (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Panreac ref.121509.1210; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Panreac ref. 121509.1210) amb EDTA 1 mM, pH 7. NADPH 2,25 mM (Sigma ref.N7505).

GR 25 U/0,25 mL. (Sigma ref. G3664) GSH 11,5 g/L (Sigma ref.64251106045K0693). Tert-Butil hidroperòxid 15 mM (Sigma ref. 458139).

La lectura es va realitzar en un COBAS MIRA a 340 nm. Els resultats es van expressar en µmol/minut/g Hb (fent referència als µmols de NADPH desapareguts en la reacció).

#### 4.1.3. CAPACITAT ANTIOXIDANT TOTAL DEL PLASMA (ORAC)

Les sigles ORAC provenen de l'anglès *oxygen radical absorption capacity*. És una tècnica que proporciona una mesura directa de la capacitat que té la mostra d'absorbir radicals peroxils (ROO<sup>·</sup>). (Ou, Hampsch-woodill, Prior, Laboratories, & Lane, 2001.)

Els reactius utilitzats van ser els següents:

Dihidroclore de 2,2'-azobis, 2-amidinopropà, un generador de ROO<sup>·</sup> (AAPH ref. Aldrich 44091). Fluoresceïna sòdica (FL) (Aldrich 16630-8). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic àcid) (Sigma-Aldrich ref.238813), tampó fosfat potàssic 75 mM pH 7,4 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Panreac ref.141512.1210 i 121509.1210 respectivament).

La fluoresceïna és un marcador de fluorescència que quan és danyada pels RLL, perd la capacitat d'emetre fluorescència. Així, com més capacitat antioxidant de la mostra, més es manté la fluorescència en el temps. Trolox és un antioxidant similar a la vitamina E, que ens serveix per establir la recta patró i basar-nos en una concentració coneguda d'antioxidant.

Durant l'assaig es mesura la fluorescència de l'FL 48nM en mostres de plasma a una longitud d'ona d'excitació de 485 nm i d'emissió de 538 nm, cada minut durant dos hores, en el fluorímetre Fluoroskan Ascent Labsystems.

Junt amb les mostres, es mesuren també el blanc i la recta patró. El blanc, que es compon d'FL, AAPH i tampó, ens permet establir la pèrdua màxima de fluorescència, i la recta patró ens proporciona les concentracions conegudes d'antioxidant per poder extrapolar les concentracions a les mostres

Els resultats es van expressar en μmols de TE (equivalents de Trolox)/ml de plasma.

## 4.2. MOSTRES DE FETGE

### 4.2.1. Obtenció de la fracció soluble



Per a l'obtenció de la fracció soluble es van descongelar els fetges i es van homogeneïtzar 1:20 amb tampó fosfat sòdic 200 mM pH 6,25 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Panreac 121677.1210 i 131679.1211).

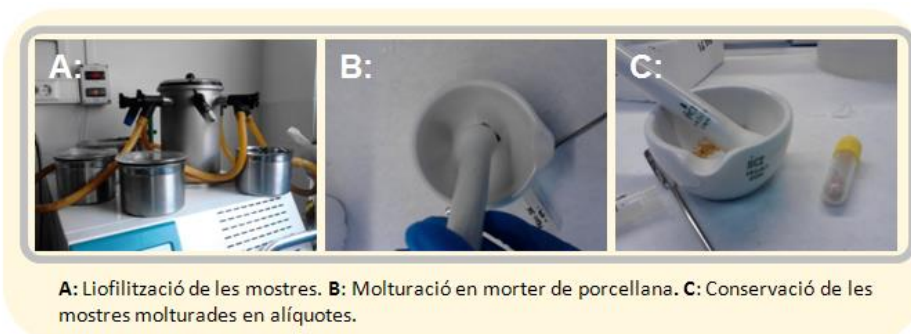
L'homogenat resultant es va centrifugar durant una hora a 4°C a una velocitat de 129000 xg. Un cop centrifugat es va recuperar el sobrenedant i es va guardar en alíquotes a -20°C.

#### 4.2.2. Obtenció del liofilitzat per lipidòmica

Per als assajos de lipidòmica, les mostres de fetge guardades a -80°C van ser liofilitzades directament amb el liofilitzador Cryodos-80 de la marca IMA-Telstar i molturades un morter de porcellana (figura 22).

Un cop recollides en les seves corresponents alíquotes es van congelar a -20°C fins a la seva determinació.

**Figura 22. Obtenció de les mostres per lipidòmica**



#### 4.2.3.DETERMINACIONS PRÈVIES

#### **4.2.3.1 Proteïnes**

La determinació de proteïnes es necessària per referenciar els resultats d'alguns biomarcadors.

Les proteïnes es van determinar pel mètode (Bradford, 1976) que es basa en la formació d'un complex entre el blau brillant G i les proteïnes de la mostra a partir de la utilització del reactiu de Bradford (Sigma B6016). La lectura de la formació del complex es fa a l'espectrofotòmetre a 595 nm, i és directament proporcional a la concentració de proteïnes.

Els resultats es van expressar en mg de proteïna/mL de fracció soluble, referenciats a una recta patró d'albumina de concentració coneguda.

#### **4.2.4. SISTEMES ANTIOXIDANTS ENZIMÀTICS**

Els diferents enzims determinats al fetge van seguir el mateix procediment que els enzims determinats a la sang (vegeu punt 4.1.2 de "Material i mètodes").

En el cas del fetge es van determinar: SOD, CAT, GR i GPx.

Les dilucions necessàries en el cas del fetge apareixen reflectides en la taula 5.

**Taula 5. Dilucions necessàries en el cas del fetge**

DETERMINACIÓ	Dilució de l'Homogenat	Dilució de la tècnica
		1:30
		1:15
SOD	1:20	1:10
		1:7,5
		1:6
CAT	1:20	Sense diluir
GR	1:20	1:5
GPx	1:20	1:5

#### 4.2.5. SISTEMES ANTIOXIDANTS NO ENZIMÀTICS, SISTEMA GLUTATIÓ

A la fracció soluble de fetge destinada a la determinació del sistema glutatió se li va afegir àcid tricloracètic (TCA Panreac 131067.1609) al 70% per evitar l'oxidació del GSH i precipitar les proteïnes. Després d'una incubació a 4°C durant 20 min, es van centrifugar les mostres a 850 xg, durant 10 min a 4°C.

Amb aquest sobrenedant, es van determinar el GSH i el GSSG segons el mètode de Hissin i Hilf (1976), el qual es fonamenta amb la capacitat que tenen aquestes dues molècules de reaccionar amb l'o-ftalaldehid (OPT) (Merck ref.11452).

El GSH reacciona amb l'OPT a pH 8, i el GSSG reacciona amb l'OPT a pH 12. Per aquest motiu, les mostres en les quals s'ha de determinar el GSSG s'incuben amb N-etilmaleïmida (NEM) 5 mg/mL, durant 30 min per tal d'augmentar el pH.

La lectura es fa per fluorimetria, en un espectrofluorímetre Perkin Elmer LS50B a la longitud d'ona d'excitació de 350 nm i la longitud d'ona d'emissió de 420 nm.

Els resultats es van expressar en nmol/mg de proteïna, gràcies a les respectives rectes patró de GSH i GSSG.

#### **4.2.6. MARCADORS D'INFLAMACIÓ**

Els marcadors d'inflamació determinats en fetge van ser PCR, TNF- $\alpha$  i ICAM.

PCR i TNF- $\alpha$  es van determinar per l'equip ELISA de la casa comercial USCN Life Science Inc. (ref. E 90821Ra, E 90133Ra, respectivament).

ICAM per equip ELISA de la casa comercial Biorbyt (ref. Orb50029).

La tècnica ELISA per als tres equips va requerir del següent procediment:

Es van pipetejar 100 $\mu$ L de fracció soluble de fetge a cada pouet dels respectius equips, els quals es trobaven recoberts d'anticossos (Ac) monoclonals antirata de PCR, TNF- $\alpha$  i ICAM. Es van incubar 90 minuts a 37 $^{\circ}$ C, per permetre la captura de les molècules d'inflamació per part dels Ac. Després del primer període d'incubació es van afegir 100  $\mu$ L de la solució d'un anticòs policlonal conjugat amb biotina, el qual es va unir a les molècules capturades, i es va tornar a incubar durant 1 hora. Es va realitzar un procés de rentat dels reactius en excés i es va deixar reposar un minut. Seguidament es van afegir 100  $\mu$ L de la solució de peroxidasa de rave picant conjugada amb avidina (avidina-HRP), la qual es va unir als anticossos amb biotina, i es va incubar 30 minuts més. Després de repetir el procés de rentat dels reactius en excés, es va afegir el substrat

3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que es va unir a l'avidina-HRP. Finalment es va incubar la placa de 16 a 20 minuts fins que es va veure d'un color blau intens.

Les lectures es van realitzar en un espectrofotòmetre lector de plaques Biotek Power Wave XS2 a 450 nm. La concentració de cada un dels biomarcadors es va determinar mitjançant corbes estàndard. Els resultats es van expressar en mg/ml.

#### **4.2.7. CONTINGUT LIPÍDIC - LIPIDÒMICA**

L'anàlisi del contingut lipídic amb lipidòmica va ser realitzada pel Centre de Ciències Òmiques (COS) de Reus. La determinació de les diferents espècies lipídiques es va dur a terme mitjançant l'anàlisi per espectrometria de masses en tàndem (MS/MS).

Es va dur a terme una quantificació relativa de diacilglicerols (DAG) i ceramides (Cer), aquest mètode va permetre identificar triacilglicerols (TAG) i monoacilglicreols (MAG).

Els reactius utilitzats van ser els següents: metanol (MeOH) i acetonitril (ACN) (ref. 34966 i ref.34967, LC-MS Cromasolv®, Fluka).

Cloroform >99% i 2-Propanol (CHCl<sub>3</sub> 34854 i 2-PrOH ref.34863, LC-MS Cromasolv®, Sigma Aldrich). Àcid fòrmic >96% (HCOOH) (ref. 695076, Sigma Aldrich) i aigua MilliQ.

L'extracció es va realitzar segons el mètode (Bligh & Dyer 1959), segons el qual de 2 mg de mostra liofilitzada i molturada es dissol amb una barreja de CHCl<sub>3</sub>: MeOH 1:2 (v/v).

Després de l'agitació en un bany d'ultrasons, la fase aquosa es trenca per l'addició de 125  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$  de i 125  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Després se centrifuga la mostra a temperatura ambient i se separa la fase orgànica.

#### 4.2.7.1. ANÀLISIS DE DIACILGLICEROLS

Una alíquota de l'extracte es va injectar a un sistema de cromatografia líquida d'alta eficàcia 1290 Infinity UHPLC acoblat a un analitzador qTOF 6545 i a espectròmetre de masses (Agilent Thecnologies).

La columna cromatogràfica va ser C8 BEH 150x2,1mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters, Milford), les fases mòbils injectades en aquesta columna van ser 0,1% HCOOH aquós (fase A) i 0,1% HCOOH ACN:2-PrOH 60:40 (v/v) (fase B). Es va injectar un volum de 2  $\mu\text{L}$  de cada una de les fases a un flux de 0,2 mL/min i amb un gradient de fase mòbil de 0-1 min 40% fase B, 1-10 min 100% fase B i 19-20 min 40% fase B. També es va aplicar un *post-run* de 5 minuts.

La ionització es va realitzar amb electroesprai aplicant gas a 250°C temperatura i amb 11mL/min. de flux. La pressió de nebulitzat de 45 psi (de l'anglès *pounds-force per square inch*), el voltatge per capil·lar de 3000 V i el voltatge de fragmentació a través del filtre de 150 V.

La calibració interna de la relació massa/càrrega (m/z) es va realitzar durant la lectura amb les següents referències de masses 112,9855 m/z i 1033,9881 m/z.

La quantificació relativa de DAG va ser duta a terme per l'anàlisi en mode MS, aplicant una energia de col·lisió de 10, 20 i 40V, i gravant el producte

de l'espectre iònic en un rang comprès entre 50 i 800 m/z, en un rang d'escàner de 5 espècies/segon.

La identificació dels compostos es va establir segons les bases de la massa exacta dels ions moleculars  $[M+NH_4]^+$  i  $[M+Na]^+$  en l'anàlisi d'MS i segons els productes iònics  $[M-R_1COOH+H]^+$ ,  $[M-R_2COOH+H]^+$ ,  $[R_1COO+C_3H_5O+H]^+$ ,  $[R_2COO+C_3H_5O+H]^+$ ,  $[R_1CO]^+$  and  $[R_2CO]^+$  en l'anàlisi MS/MS dirigida. Es van considerar les normes de fragmentació per a aquests tipus de compostos.

La quantificació relativa dels DAG es va realitzar comparant l'àrea sota el pic cromatogràfic corresponent a  $[M+NH_4]^+$  (Lee, Kim, Ha, Shim, & Park, 2013).

#### 4.2.7.2. ANÀLISIS DE CERAMIDES

Una alíquota de l'extracte es va injectar al mateix equip que el que es va utilitzar en la determinació dels DAG i amb les mateixes condicions cromatogràfiques descrites anteriorment. En aquest cas l'analitzador acoblat a l'espectrofotòmetre de masses va ser de triple quàdruple (qQq) 6490 (Agilent Technologies).

La ionització es va realitzar amb electroesprai aplicant gas a 150°C temperatura i amb 11mL/min. de flux. La pressió de nebulitzat de 20 psi, el voltatge per capil·lar de 3000 V i el voltatge de fragmentació amb el filtre de 1.000 V.

La quantificació relativa de Cer va ser duta a terme per l'anàlisi en mode "precursos ion mode", sota un rang de d'escaneig que anava des de 300 m/z a 700 m/z en el primer quàdruple a un temps d'escaneig de

200mseg, així es van monitorar els ions producte de les Cer a 282 i 264 m/z en el segon quàdruple. L'energia de col·lisió va ser de 30V per les dues transicions.

Finalment, la identificació dels compostos es va establir observant les transicions dels ions  $[M+H]^+$  i  $[M-H_2O+H]^+$  i es van quantificar relativament per comparació de l'àrea sota el pic cromatogràfic el qual corresponia a  $[M+H]^+ > 264$  transició (Han, 2002; Kasumov [*et al.*], 2010).

Totes les espècies lipídiques relativament quantificades es van expressar en àrees sota el pic. Aquesta mesura és una mesura adimensional, per tant, els resultats apareixen sense cap tipus d'unitat.

Cal remarcar, també, que alguns compostos es van haver d'agrupar, ja que o bé no van aparèixer cromatogràficament prou definits o bé van donar lloc a un sol pic amb mescla de diferents compostos; aquestes agrupacions apareixen especificades en l'apartat de resultats.

### 4.3. MOSTRES DE PINSOS

#### 4.3.1. DETERMINACIONS PRÈVIES

##### 4.3.1.1 Extracció de la fracció lipòfila dels pinsos

Per extreure la fracció lipòfila dels pinsos es van barrejar 0,5 g de cada pinso, prèviament triturat, amb 11 mL d'una mescla d'hexà 95% (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> ref. Panreac 133242.1611) i diclormetà (ref. Merck 106050.2500) (1:1).



Els matraus rodons que contenien aquest barreja es van posar a l'agitador (JP-Selecta Vibromatic) durant 20 minuts a una velocitat de 500 unitats/minut.

Posteriorment, els matrassos destapats es van deixar reposar sota la campana per sedimentar la fracció sòlida. Es va recuperar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur i es va portar a evaporar en un evaporador de nitrogen de la casa Liebisch®) fins a sequedat (unes dues hores). Un cop evaporats els dissolvents, les mostres es van congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva determinació (figura23).

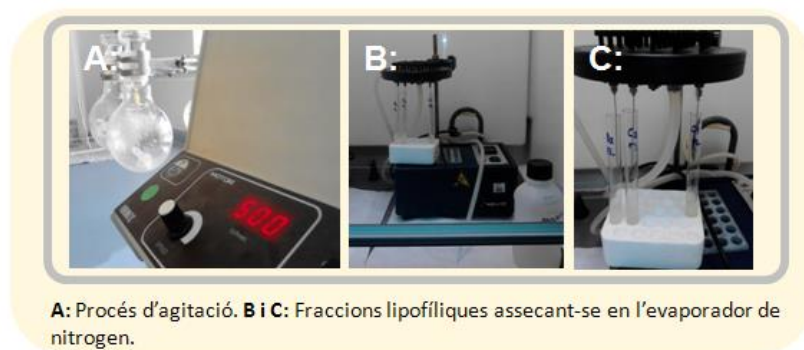
#### **4.3.1.2 Extracció de la fracció hidrofílica dels pinsos**

Per extreure els components hidrofílics dels pinsos es va barrejar 0,5 g de cada pinso, prèviament triturat, amb 11 mL d'una mescla d'Acetona (ref. Sigma 179124), àcid acètic glacial (ref. 45726 Fluka) i aigua (70:29,5:0,5).

Els matrassos rodons que contenien aquest barreja es van posar a l'agitador durant 20 minuts a una velocitat de 500 unitats/minut (figura 23).

Un cop passats els 20 minuts, van deixar reposar els matrassos destapats sota la campana, amb la intenció de deixar sedimentar la mostra. Un cop sedimentada, es va recuperar el sobrenedant amb una pipeta Pasteur i es va congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a la seva determinació.

**Figura 23. Extracció dels pinsos per a l'anàlisi de la capacitat antioxidant**



### 4.3.2. CAPACITAT ANTIOXIDANT TOTAL

Per determinar la capacitat antioxidant total dels pinsos (vegeu apartat 1.2 de "Material i mètodes") es va utilitzar el mètode ORAC. Els reactius i el procediment van ser els mateixos que els explicats anteriorment (vegeu punt 4.1.3 de "Material i mètodes").

La fracció lipòfila, es va resuspendre amb 1 mL d'acetona. Un cop dissoltes totes les mostres, es va realitzar una dilució 1:50 amb tampó fosfat potàssic 75 mM pH 7,4 tant de la part lipòfila com de la part hidrofílica de cada pinso.

Els resultats es van expressar en mols de TE (equivalents de Trolox)/mg de pinso.

## 5. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC

Es van estudiar les mostres d' aorta, fetge, ronyó, i teixit adipós.

L'estudi de totes es va dur a terme valorant el tall en tota la seva extensió, amb el microscopi Nikon eclipse TE2000-U, en el qual tres observadors diferents van valorar les variables categòriques establertes segons la bibliografia (taula 6). Els resultats obtinguts en els tres casos es van posar en comú, i van ser discutits els casos que ho van requerir.



## 6. ANÀLISI ESTADÍSTICA

L'anàlisi estadística de les dades va utilitzar el programa estadístic SPSS IBM 20.

Les variables quantitatives es van expressar amb la mitjana  $\pm$  desviació estàndard.

La distribució de les variables es va comprovar amb el test de Kolmogorov-Smirnov.

Es van comparar els diferents grups per mitjà d'ANOVA amb el test *post hoc* Scheffé quan la seva distribució era normal. Les variables que van resultar no paramètriques es van comparar utilitzant la U de Mann-Whitney.

En el cas de l'anàlisi de les dades d'anatomia patològica, es pot dividir en dos grans grups:

Variabels quantitatives: van ser comparades utilitzant ANOVA amb el test *post hoc* Scheffé quan la seva distribució era normal i utilitzant U-Mann-Whitney, quan la seva distribució era no normal.

Variabels qualitatives: es van expressar en freqüències (%) en funció del nombre d'animals que presentaven o no presentaven la variable en qüestió. Les dades es van comparar estadísticament amb taules de contingència utilitzant Chi-quadrat.

Pel que fa a les dades de lipidòmica, a banda dels testos estadístics explicats, es va utilitzar l'anàlisi de component principal (de l'anglès *principal component analysis*).

En tots els casos es va considerar com a estadísticament significatiu el p-valor  $<0,05$ .

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015



## *Resultats i discussió*





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

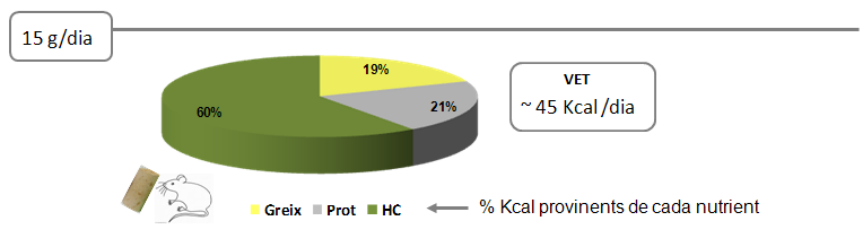
# 1. INGESTA CALÒRICA I COMPOSICIÓ NUTRICIONAL

## 1.1. INGESTA I COMPOSICIÓ DE LA DIETA ESTÀNDARD

Les rates dels grups alimentats amb dieta estàndard van tenir una ingesta mitjana de 15g/dia de la fórmula original liofilitzada (vegeu apartat 1.2 de “Material i mètodes”).

La composició nutricional relativa a aquesta ingesta apareix a la figura 24.

**Figura 24: Composició nutricional de la dieta estàndard**



**Composició nutricional de la dieta estàndard:** El gràfic mostra la distribució dels principis immediats en relació a la ingesta energètica total per 15 g de fórmula original liofilitzada. VET: valor energètic total; Prot: proteïnes, HC: Hidrats de Carboni

### - AGPI omega-3 total en els grups estàndard:

En el cas del grups de tractament suplementats amb AGPI omega-3, es van incorporar 26,16 g d'AGPI omega-3 per cada 1546,5 g de pinso (1500 g pinso comercial Teklad Global diet® + 9 g llecitina + 37,5 g gelatina). Això representa un 1,66% d'omega-3. Tenint en compte que els animals alimentats amb dieta estàndard consumeixen 15 g de pinso/dia:

Les rates van tenir un consum mitjà de **0,24 g d'AGPI omega-3 /dia**, el pes mitjà per rata era de 150 g, així la quantitat per dia i kilogram de pes ingerida

**-Dosis equivalents en humans, DHE (de l'anglès *dose human equivalent*):**

Si es transformen els 1.600 mg/kg/dia a dosis equivalents humanes, amb la conversió basada en l'àrea de superfície corporal (Reagan-Shaw [*et al.*] 2003), multiplicant pel factor 6/37, obtenim una quantitat de 259 mg d'omega-3/kg/dia.

L'EFSA recomana 250 mg AGPI omega 3/dia per a individus estàndard de 70 kg, és a dir, 3,57 mg/kg de pes /dia, així doncs:

**DHE= 259 mg d'AGPI omega-3 /kg de pes/dia equival a 72,5 vegades la dosi d'AGPI omega-3 recomanada per l'EFSA**

**- Relació EPA:DHA en els grups estàndard:**

La quantitat d'EPA i DHA en cada grup de tractament, mantenint la relació 1:1 en els grups suplementats amb AGPI omega-3, va ser:

**Per als grups Omega-3 i Mixt: 25,69 mols EPA i 24,31 mols DHA**

**Per als grups Control i Polifenols: 0,65 mols EPA i 0,98 mols DHA**

**- Polifenols totals en el grup estàndard:**

En el cas dels grups de tractament ESTD-polifenols i ESTD-mixt la quantitat de polifenols afegida va ser de 1.320 mg per cada 1.572,6 g de

pinso final (vegeu apartat 1.2 de “Material i mètodes”). Això representa un 0,083% de polifenols. Tenint en compte que aquestes rates consumien 15 g de pinso/dia:

Les rates van consumir **12 mg polifenols/dia**, quantitat que equival a 80 mg polifenols/kg de pes/dia

**-Dosis equivalents en humans, DHE (de l'anglès *human equivalent dose*):**

Fent la mateixa transformació realitzada pels omega-3, aquesta quantitat de 80 mg/kg/dia es converteix en 13 mg polifenols/kg/dia en dosis equivalents humanes.

Les ingestes recomanades de polifenols no estan encara establertes, tot i que la bibliografia recomana aproximadament 1g polifenols/dia en persones de 70 kg (14,3 mg/kg/dia) per poder observar efectes beneficiosos sobre la salut (Scalbert A, Williamson, 2000). Cal remarcar que les proantocianidines provinents de les llavors de raïm poden produir toxicitat a dosis elevades; per tant, se solen recomanar dosis al voltant de 25-50 mg proantocianidines/kg /dia (Caimari A,2013; Montagut G,2010). Així doncs, es va considerar la dosi de 13 mg/Kg/dia de polifenols correcta.

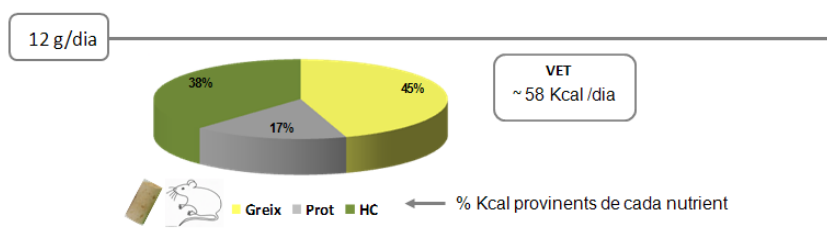
**DHE= 13 mg polifenols / kg de pes/ dia en rates ESTD**

## 1.2. INGESTA I COMPOSICIÓ DE LA DIETA HFHS

Les rates dels grups alimentats amb dieta HFHS van tenir una ingesta de 12 g/dia de la fórmula original liofilitzada (vegeu apartat 1.2 de “Material i mètodes”).

La composició relativa a aquesta ingesta apareix en la figura 25.

**Figura 25: Composició nutricional de la dieta *high fat / high sucrose*:**



**Composició nutricional de la dieta HFHS:** El gràfic mostra la distribució dels principis immediats en relació a la ingesta energètica total per 12 g de fórmula original liofilitzada. VET: valor energètic total; Prot: proteïnes, HC: Hidrats de Carboni

### - AGPI omega-3 total en els grup HFHS:

En el cas del grups de tractament suplementats amb AGPI omega-3, es van incorporar 33 g d'AGPI omega-3 per cada 1.570,5 g de pinso (1.500 g pinso comercial Harlan diet Basal Mix for HFD® + 33 g lecitina + 37,5 g gelatina). Això representa un 2,05% d'omega-3. Tot i ser un percentatge superior als omega-3 de la dieta estàndard, s'ha de tenir en compte que els grups que consumeixen aquesta dieta menjaven menys que els animals de la dieta estàndard, en concret consumeixen 12 g de pinso/dia; de manera que al final la quantitat d'omega-3 consumida era la mateixa pels 8 grups.

Les rates van tenir un consum mitjà de **0,24 g d'AGPI omega-3 /dia**, el pes mitjà per rata era de 150 g, així, així així ditat per dia i kilogram de pes ingerida va ser de **1,6 mg / kg de pes/ dia**. Igual que en els grups

**-Dosis equivalents en humans, DHE (de l'anglès *dose human equivalent*):**

**DHE= 259 mg d'AGPI omega-3 / kg de pes/dia equival a 72,5 vegades la dosi d'AGPI omega-3 recomanada per l'EFSA, igual que en els grups**

**amb dieta estàndard**

**- Relació EPA:DHA en els grups HFHS:**

**La relació EPA:DHA 1:1** la proporció en mols de cadascun dels AG van ser igual que en la dieta estàndard.

**Per als grups Omega-3 i Mixt: 25,69 mols EPA i 24,31 mols DHA**

**Per als grups Control i Polifenols: 0,65 mols EPA i 0,98 mols DHA**

**- Polifenols totals en el grup HFHS:**

En el cas dels grups de tractament HFHS-polifenols i HFHS-mixt la quantitat de polifenols afegida va ser de 1.635 mg per cada 1.603 g de pinso final (vegeu apartat 1.2 de "Material i mètodes"). Això representa un 0,1% de polifenols. Tenint en compte que aquestes rates consumien 12 g de pinso/dia:

Les rates de grup HFHS van consumir **12 mg polifenols/dia**, quantitat que equival a 80 mg polifenols/kg de pes/dia, igual que en els grups corresponents

**-Dosis equivalents en humans, DHE (de l'anglès *human equivalent dose*):**

**DHE= 13 mg polifenols / kg de pes/ dia en rates HFHS, igual que en els grups corresponents alimentats amb dieta ESTD**

### 1.3. INGESTA ENERGÈTICA TOTAL

Els resultats de la ingesta energètica total apareixen en la taula 7. En cada pinso, *a* representa diferències respecte al tractament control; *b* diferències respecte a tractament omega-3, i *c* diferències respecte al tractament polifenols. A la tercera fila de la taula, apareixen els valors de significació *p* corresponents a la comparació entre el pinso ESTD i el pinso HFHS, en cada grup de tractament.

Les rates alimentades amb la dieta ESTD van consumir una mitjana de 15 g de pinso/dia, i les rates alimentades amb HFHS una mitjana de 12 g/dia. Tot i així, des del punt de vista calòric es va observar una diferència significativa entre les dues dietes ( $p < 0,001$ , en tots els tractaments), i les

rates alimentades amb dieta HFHS són les que van consumir més quantitat de Kcal/ dia (taula 7).

- Comparant entre tractaments en la dieta ESTD també es van observar diferències estadísticament significatives: el grup de tractament ESTD-omega-3 va consumir menys Kcal/dia que la resta de grups ( $p < 0,001$  respecte ESTD-control;  $p = 0,006$  respecte ESTD-polifenols i  $p = 0,002$  respecte ESTD-mixt).
- Comparant entre tractaments dintre de la dieta HFHS, el grup de tractament amb menys consum energètic va ser el grup HFHS-polifenols amb diferències significatives respecte la resta:  $p = 0,005$  respecte al grup HFHS-control,  $p = 0,032$  respecte al grup HFHS omega 3 i  $p = 0,032$  respecte al grup HFHS mixt.

**Taula 7: Kcal/dia**

VARIABLE	Tractament								
	Control		Omega3		Polifenols		Mixt		
	Mitjana DE		Mitjana DE	<i>p</i>	Mitjana DE	<i>p</i>	Mitjana DE	<i>p</i>	<i>p total</i>
ESTD	Kcal /dia	45,57 ± 2	39,58 ± 2	a	44,33 ± 2	b	45,08 ± 2	b	<0,001
HFHS	Kcal /dia	55,38 ± 2	54,5 ± 2		51,05 ± 3	a b	54,32 ± 1	c	0,003
ESTD-HFHS		<0,001	<0,001		<0,001		<0,001		

**Kcal/dia:** La taula mostra els resultats de la ingesta energètica total expressada en mitjanes ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins una mateixa dieta i els colors les diferències estadísticament significatives entre dietes. (Kcal) kilocalories.

L'augment del valor total energètic en la dieta HFHS respecte a la dieta ESTD és atribuïble a la distribució dels principis immediats (figura 24 i figura 25). Ara bé, les diferències entre tractaments en una mateixa dieta fan pensar en funcions dels biocomponents afegits, en aquest sentit alguns estudis han mostrat com tant els



AGPI omega-3 com els polifenols provinents de la llavor del raïm, tenen efecte sobre la ingesta energètica total (Harden [et al.], 2014; Parra [et al.], 2008; Vogels, Nijs, & Westerterp-Plantenga, 2004).

Pel que fa als AGPI omega-3, el 2008 Parra [et al.] van comprovar un increment de la sacietat i, per tant, menys consum energètic en dones que van consumir altes dosis d'AGPI omega-3 respecte a les que van consumir baixes dosis (Parra [et al.], 2008).

Estudis més recents, com el de Harlen [et al.], han demostrat amb assajos clínics com l'administració diària d'AGPI omega-3 durant 12 setmanes redueix la ingesta energètica total en dones (Harden [et al.], 2014). Els mecanismes que proposen els autors fan referència en part a l'acció dels omega-3 sobre l'alliberament d'hormones intestinals saciants i en part a l'acció d'aquests àcids grassos sobre les vies mesolímbiques i endocannabinoides, les quals es relacionen amb la ingesta.

Amb relació als polifenols, Voguels [et al.] (2004), també per mitjà d'assaig clínic, conclouen que els polifenols provinents de la llavor del raïm redueixen la ingesta energètica en humans (Voguels [et al.], 2004). El mecanisme atribuït a aquesta disminució de la ingesta és bàsicament l'increment de la lipòlisi. L'augment de la lipòlisi postpandrial produeix un increment de l'oxidació de greixos al fetge i augmenta així la sacietat.

Pel que fa a les hormones relacionades amb la sacietat, sembla que les procianidines tenen efecte sobre l'adiponectina però no pas sobre altres hormones com la leptina o la grehelina. Això concorda amb els

mecanismes descrits en el paràgraf anterior, ja que els nivells d'adiponectina correlacionen negativament amb la lipòlisi (Parra [*et al.*], 2008).

Així doncs, i amb relació als nostres resultats, en una dieta ESTD els biocomponents amb més efecte sobre la sacietat són els AGPI omega-3; però en una dieta HFHS són els polifenols els que tenen un pes més gran en la sacietat que no pas els AGPI omega-3. Aquesta diferència podria estar deguda als mecanismes d'acció descrits en la bibliografia, explicats anteriorment.

## 1.4 CAPACITAT ANTIOXIDANT DELS PINSOS INGERITS

La capacitat antioxidant total del pinsos que es van administrar apareix a la taula 8.

En cada pinso, *a* representa diferències respecte al tractament control i *b* diferències respecte al tractament omega-3. A la tercera fila de la taula, hi ha els valors de significació estadística *p* corresponents a la comparació entre el pinso ESTD i el pinso HFHS, en cada grup de tractament.

**Taula 8: ORAC mmol TE /mg mostra sòlida**

VARIABLE	Tractament									
	Control		Omega3		Polifenols		Mixt			
	Mitjana DE		Mitjana DE	<i>p</i>	Mitjana DE	<i>p</i>	Mitjana DE	<i>p</i>	<i>p total</i>	
ESTD	ORAC µmol TE/ mg mostra sòlida	69,8 ± 14		91,58 ± 23	a	95,71 ± 18	a	103,52 ± 15	a	<0,001
HFHS	ORAC µmol TE/ mg mostra sòlida	45,98 ± 22		66,06 ± 15	a	87,33 ± 14	a b	89,71 ± 15	a b	<0,001
ESTD-HFHS		<0,001		<0,001		0,103		0,006		

ORAC mmol TE/mg mostra sòlida: (ORAC) *Oxygen Radical Absorbance Capacity*; (TE) *Trolox Equivalents*. Els resultats s'expressen en mitjanes ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins una mateixa dieta i els colors les diferències estadísticament significatives entre dietes.

- Comparant les dues dietes, ESTD i HFHS, es va veure una disminució significativa de la capacitat antioxidant en la dieta a HFHS respecte la dieta ESTD en tots els tractaments excepte en el tractament polifenols.
- Comparant els diferents tractaments en la dieta ESTD es va observar que tots els pinsos suplementats tenien més capacitat antioxidant que el control, amb diferències significatives (tractament ESTD-omega-3  $p < 0,001$ ; tractament ESTD-polifenols  $p < 0,001$  i tractament ESTD-mixt  $p = 0,003$ ).
- En els grups amb dieta HFHS es va observar el mateix que en el cas anterior: tots els pinsos amb suplementes tenien valors més alts d'ORAC amb diferències respecte al tractament HFHS-control (tractament HFHS-omega-3  $p = 0,037$ ; tractament HFHS-polifenols  $p < 0,001$  i tractament HFHS-mixt  $p < 0,001$ ). A més, els dos pinsos suplementats amb polifenols (HFHS-polifenols i HFHS-mixt) van presentar valors més elevats de capacitat antioxidant total, segons el mètode ORAC, que el pinso HFHS-omega-3 ( $p < 0,001$  ambdós casos).

En resum, el tractament que va presentar més capacitat antioxidant, segons el mètode ORAC, va ser el pinso ESTD-mixt mentre que l'HFHS-control va presentar els valors més baixos.

Aquests resultats sembla que coincideixen amb l'efecte antioxidant descrit per les proantocianidines (Hollman [et al.], 2011; Pietta, 2000) i reforcen la nostre hipòtesi en el sentit que la capacitat antioxidant total

es troba augmentada en el tractament mixt, que inclou els dos biocomponents AGPI omega-3 i polifenols.

## 2. PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'SM

Els resultats dels paràmetres analitzats amb relació a l'SM apareixen resumits a la taula 9, en què *a* representa diferències respecte al tractament control, *b* diferències respecte al tractament omega-3 i *c* diferències respecte al tractament polifenols. Els p-valors comparant les dues dietes, ESTD i HFHS, apareixen en l'apartat final de la taula, i en groc es destaquen les diferències estadísticament significatives.

### 2.1. PES CORPORAL

Abans d'iniciar l'estudi, el pes mitjà de les rates tractades amb ESTD era de 144 g i el de les rates tractades amb HFHS de 149 g, sense diferències significatives entre els dos grups.

Els dos grups de rates van augmentar de pes al llarg de l'experiment, a l'inici els dos grups de rates es van mantenir dins dels rangs de normalitat per la soca i l'edat. A partir de la setmana 7 (en les HFHS) i la setmana 15 (en les ESTD els dos grups de rates van superar el llindar de normalitat establert per rates Wistar Kyoto (<[www.criver.com](http://www.criver.com)>, n.d.).

- Al llarg de l'estudi, les rates alimentades amb dieta HFHS van augmentar més de pes que no pas les alimentades amb pinso ESTD. Comparant les dues dietes, ESTD i HFHS, es veu un increment de pes en les rates alimentades amb la dieta HFHS

respecte a la dieta ESTD en tots els tractaments excepte en el tractament mixt.

- Comparant els diferents tractaments amb els seus controls en una mateixa dieta, no es van veure diferències en cap de les dues dietes, ESTD o HFHS.

En resum, la dieta HFHS va provocar un increment de pes en tots els tipus de tractaments a excepció del grup de tractament HFHS-mixt.





Taula 9: PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'SM (continuació)

VARIABLE	Tractament					
	Control		Omega3		Polifenols	
ESTD-HFHS	p		p		p	p
<b>Obesitat</b>						
PES	0,005		0,023		0,013	0,172
GREIX CORPORAL	0,009		0,035		0,225	0,949
<b>Perfil lipídic</b>						
COL TOTAL	0,066		<0,001		0,001	0,007
TG	0,151		0,401		0,060	0,573
HDL-col	0,089		0,003		0,020	0,014
LDL-col	0,268		0,027		<0,001	0,008
HDL/LDL	0,482		0,565		0,004	0,167
TG/HDL	0,691		0,176		0,014	0,220
<b>Pressió arterial</b>						
PA SISTÒLICA	0,838		0,960		0,194	0,665
PA DIASTÒLICA	0,339		0,843		0,974	0,975
<b>Metabolisme de la glucosa</b>						
GLUCOSA	0,335		0,073		0,096	0,366
INSULINA	0,004		0,085		0,013	0,655
HbA1c	0,949		0,749		0,749	0,003
Índex HOMA	0,004		0,249		0,009	0,701

**Paràmetres relacionats amb l'SM:** La taula mostra els resultats dels diferents paràmetres relacionats amb la (SM) Síndrome Metabòlica estudiats. Tots els expressats en mitjanes  $\pm$  (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins una mateixa dieta i els colors les diferències estadísticament significatives entre dietes. (COL) Colesterol; (TG) Triglicèrids; (HDL-col) Colesterol associat a lipoproteïna d'alta densitat; (LDL-col) Colesterol associat a lipoproteïna de baixa densitat; (PA) Pressió Arterial; (HbA1c) Hemoglobina glicosil·lada; (HOMA) Homeostasis Model Assessment.



## 2.2 GREIX CORPORAL

- Comparant dietes, ESTD i HFHS, la quantitat de greix corporal va ser més alta en els grups de tractament HFHS-control i HFHS-omega-3.

Els grups de tractament polifenols i mixt van presentar la mateixa quantitat de greix independentment de la dieta ingerida.

- Pel que fa a diferències entre tractaments en una mateixa dieta, es van trobar només en la dieta ESTD, en què els tractaments ESTD-polifenols i ESTD-mixt van presentar nivells de greix corporal significativament més alts que el tractament ESTD-control ( $p= 0,001$  i  $0,013$  respectivament).

En resum, podem observar com la dieta HFHS va augmentar el contingut de greix corporal en comparació amb la dieta ESTD en els grups control i en els grups tractats amb AGPI omega-3, mentre que en els grups tractats amb polifenols (tant el grup HFHS-polifenols com el grup HFHS-mixt) van disminuir lleugerament.

El tractament HFHS-mixt donà lloc a un cúmul de greix corporal inferior i va proporcionar els valors més baixos de greix corporal en aquesta dieta.

En la bibliografia disponible fins ara es conclou que, tot i que aquests AG no tinguin efectes sobre el pes corporal o no disminueixin l'augment de pes en una dieta HFHS, sembla que sí que disminueixen el contingut de greix corporal (Kim [*et al.*], 2013; Martínez-Victoria & Yago, 2012). Els nostres resultats no donen suport a aquestes afirmacions a no ser que aquests AGPI omega-3 es combinin amb els polifenols en una dieta HFHS.

Amb relació a l'efecte de les procianidines, diversos mecanismes d'acció han relacionat les procianidines de la llavor de raïm amb una disminució del contingut de greix corporal (Caimari, del Bas, Crescenti, & Arola, 2012). En aquest sentit, els nostres resultats també mostren que aquests biocomponents poden tenir un efecte protector en front a l'adipositat induïda per una dieta HFHS. Fins i tot eviten l'augment de pes quan es combinen polifenols amb AGPI omega-3.

## 2.3. PERFIL LIPÍDIC

### 2.3.1. Colesterol total

- Els grups suplementats amb omega-3, polifenols i mixt van presentar valors de colesterol més baixos que els seus respectius grups ESTD ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,001$  i  $p = 0,007$  respectivament). Els valors més baixos els van proporcionar els dos grups de tractament amb AGPI omega-3.
- Comparant els diferents tractaments en la dieta ESTD es va observar que els grups tractats amb AGPI omega-3, tant el grup ESTD-omega-3 com el grup ESTD-mixt, van presentar menors valors de colesterol total respecte al grup de tractament ESTD-control, tot i que no es van observar diferències estadísticament significatives.
- Comparant els diferents tractaments en la dieta HFHS es van observar diferències: els grups tractats amb AGPI omega-3 van tornar a ser els grups que van presentar menors valors de colesterol respecte al grup de tractament HFHS-control (HFHS-

omega-3  $p=0,002$  i HFHS-mixt  $p=0,009$ ) i respecte al grup amb polifenols (HFHS-omega-3  $p<0,001$ ; HFHS-mixt  $p=0,001$ ).

En resum, qualsevol dels tractaments millora els valors de colesterol total en seguir una dieta HFHS. Els valors més baixos, en una dieta HFHS, es van donar en els grups de tractament que contenien AGPI omega-3. Aquests resultats seguien la mateixa tendència en una dieta estàndard; però no es van observar diferències significatives.

Aquests resultats difereixen dels d'una revisió recent en què es conclou que no es va trobar un efecte dels AGPI omega-3 sobre la disminució del colesterol total (Mori, 2014). També difereixen de la metaanàlisi realitzada per Lorente-Cebrian [*et al.*] (2013) en què es conclou que tot i que els AGPI omega-3 tinguin efectes sobre diferents components del perfil lipídic, per exemple en la disminució dels TG, no s'han demostrat efectes significatius amb relació a la disminució dels nivells de colesterol total. Segons la literatura (Lorente-Cebrián [*et al.*], 2013), la reducció de colesterol total que s'observa en els nostres resultats podria ser deguda a un efecte indirecte d'aquests AGPI omega-3. És a dir, la reducció de colesterol total pot ser indirecta a la disminució de les lipoproteïnes VLDL, que es tradueix amb una disminució del colesterol LDL. En els tres tractaments en què es va observar una disminució del colesterol total també es va observar una disminució del colesterol LDL (taula 9). La disminució de les lipoproteïnes VLDL per part dels AGPI omega-3 sí que està demostrada per diversos autors segons les revisions publicades (Lorente-Cebrián [*et al.*], 2013).

Pel que fa a l'efecte del polifenols provinents de la llavor de raïm, s'ha vist que disminueixen el colesterol total amb l'expressió de gens hepàtics relacionats amb la seva biosíntesi (Caimari [et al.], 2012).

Així doncs, els nostres resultats demostren que tant els AGPI com els polifenols tenen un efecte positiu sobre els nivells de colesterol en rates amb dieta HFHS. Si observem el tractament conjunt, podem veure com aquest efecte no és sumatori, ja que la disminució en el tractament mixt és similar a la disminució en el tractament AGPI omega-3, ara bé aquesta disminució és significativament superior al tractament amb polifenols sols.

### 2.3.2. Triglicèrids (TG)

- Els resultats de triglicèrids en sang no van presentar diferències significatives entre dietes.
- Tampoc es van veure diferències entre els diferents grups de tractament en la dieta ESTD.
- En la dieta HFHS es va observar que el tractament amb polifenols va presentar els nivells de trigliceridèmia més elevats ( $p < 0,001$  respecte al grup HFHS-control,  $p = 0,002$  respecte al grup HFHS-omega-3 i  $p = 0,001$  respecte al grup HFHS-mixt).

El paper dels AGPI omega-3 amb relació a la disminució de TG plasmàtics està àmpliament demostrat, com mostra la revisió (Mori, 2014). Els nostres resultats mostren que, tot i no disminuir els nivells de TG per sota del grup control, els grups que contenen AGPI omega-3 van

presentar nivells més baixos que el grup amb polifenols en els animals alimentats amb dieta HFHS.

Pel que fa als polifenols, els nostres resultats són contraris a l'estudi de Del Bas [*et al.*] (2008), en el qual demostren com les procianidines provinents de la llavor de raïm redueixen els TG en rates normolipídiques. També són contraris a S. Wang [*et al.*] (2014), una metanàlisi en què es conclou que en models animals obesos els polifenols també redueixen els nivells plasmàtics de TG.

Cal recalcar que Wang (2014) també discuteix les dosis administrades en els estudis d'intervenció, les quals són molt elevades. Per tant, el paper atribuït a aquests biocomponents és discutible a dosis més fisiològiques.

Segons el nostre experiment, el paper dels polifenols amb relació als TG a la sang (quan s'administren dosis de 80 mg/kg/dia) no és rellevant llevat que actuïn de manera conjunta amb els AGPI omega-3 en una dieta HFHS.

### 2.3.3. Colesterol HDL

- Els dos grups control van presentar valors similars. El colesterol HDL va ser significativament més baix en les rates HFHS que en les rates ESTD en els tres grups de tractament (taula 9).
- Comparant els diferents tractaments, tot i que en realitzar la comparativa semblava que sí (p-valor total en HFHS =0,026), les proves *post hoc* de les dades no van mostrar diferències entre si en cap de les dues dietes.

Des de fa anys es reconeix el paper protector de les HDL, davant de les malalties cardiovasculars (Mataix Verdu, 2009); també s'ha vist com el nivell d'aquestes lipoproteïnes esta relacionat amb la ingesta d'AG, de manera que la ingesta excessiva d'AG disminueix els nivells d'aquesta lipoproteïna (Mataix Verdu, 2009; Yanai [*et al.*], 2015). El que no està tant clar és el paper que poden tenir diferents agents de la dieta, com ara els AGPI omega-3, (Yanai, 2015), és una revisió exhaustiva de l'efecte del greix alimentari sobre el metabolisme de l'HDL, s'hi conclou que l'efecte dels omega-3 avui dia continua sense estar clar.

Els nostres resultats confirmen aquesta teoria en què els AGPI omega-3 no afecten significativament els nivells d'HDL.

Pel que fa a la bibliografia amb relació als polifenols, el 1994 es van estudiar els tanins de les llavors del raïm sobre les lipoproteïnes en rates, i van concloure com els tanins de les llavors de raïm augmentaven significativament les lipoproteïnes HDL (Tebib, Besançon, & Rouanet, 1994), les procianidines són tanins condensats, per tant, s'esperaria obtenir els mateixos efectes. El 2005 Del Bas [*et al.*] van demostrar un lleuger augment de les lipoprot HDL per part de les procianidines provinents de la llavor de raïm. Estudis més recents en rates també han observat un increment del colesterol HDL en rates després del consum de pols de pell de raïm (Mildner-Szkudlarz & Bajerska, 2013).

Tot i aquestes dades, els nostres resultats no van donar canvis significatius en el colesterol HDL en els tractament amb polifenols.

#### **2.3.4. Colesterol LDL (LDL-C)**

- Si comparem els dos tipus de dieta, el colesterol LDL segueix el mateix patró que el colesterol HDL: els dos grups control van presentar valors similars, i les rates alimentades amb dieta HFHS van presentar uns nivells de colesterol LDL més baixos en els tres grups de tractament (omega-3  $p=0,027$ ; polifenols  $p < 0,001$  i mixt  $p=0,008$ ).
- En comparar tractaments, es van observar diferències en la dieta ESTD: el tractament polifenol va ser significativament més alt que el grup ESTD-control i que el grup ESTD-omega-3  $p < 0,001$  i  $p=0,002$  respectivament. El tractament ESTD-mixt, tot i donar valors més alts que el grup control ( $p=0,005$ ), va disminuir el colesterol LDL respecte els polifenols sols ( $p=0,008$ ).
- En la dieta HFHS, tot i que en realitzar la comparativa semblava que sí ( $p$ -valor total en HFHS  $< 0,001$ ), les proves *post hoc* de les dades no van mostrar diferències estadísticament significatives en cap dels tractaments.

En aquest cas, podríem parlar d'un efecte més beneficiós dels AGPI omega-3 que dels polifenols. Com dèiem en l'apartat de colesterol total, aquests àcids grassos disminueixen la síntesi de les lipoproteïnes VLDL des del punt de vista hepàtic, les quals acaben traduïnt-se en una disminució del colesterol LDL (Lorente-Cebrián [*et al.*], 2013).

### 2.3.5. Ràtio HDL/LDL

- En comparar dietes, només el tractament HFHS-polifenols va ser diferent d'ESTD-polifenols ( $p= 0,004$ ) i va donar lloc a una ràtio HDL/LDL més elevada.

- Comparant tractaments, ambdues dietes, els tractaments control i omega-3 van presentar valors més alts que els tractaments polifenols i mixt ( $p=0,002$  en tots els casos en dieta ESTD) i en dieta HFHS ( $p=0,002$  i  $p=0,012$  respecte a HFHS-polifenols i  $p=0,002$  i  $p=0,028$  respecte a HFHS-mixt).

En resum, els millors valors en la ràtio HDL/LDL, van venir dels tractaments control i omega -3 tant en la dieta ESTD com en la dieta HFHS.

El 2008, la NCPA va recomanar la ràtio HDL/LDL com a eina estàndard de mesura del risc cardiovascular (Fernandez & Webb, 2008); ara bé, el nostre estudi és un exemple clar de com molts cops un paràmetre sol no ens pot indicar un estat de risc.

En els nostres resultats, el tractament polifenols va augmentar aquesta ràtio en rates HFHS respecte a ESTD, tot i així cal veure com aquesta ràtio va augmentar per la disminució tant de l'HDL com de l'LDL.

Per això, calen altres indicadors de risc cardiovascular i un exemple recent és la ràtio TG/HDL.

### 2.3.6. Ràtio TG/HDL

En els últims anys la relació TG/colesterol HDL ha estat estudiada com a marcador o indicador de risc cardiometabòlic (Bailey, Savory, Denton, Davies, & Kerr, 2014; Belén [et al.], 2014). S'ha establert en la literatura que un índex de TG/HDL  $\geq 3$  es correlaciona amb augment del risc cardiometabòlic. Aquest índex és correlaciona positivament amb factors com: rigidesa de les parets aòrtiques, signes preclínics al fetge, augment



del greix visceral, augment del colesterol i disminució dels nivells d'adiponectina (Bailey [et al.], 2014).

Segons diversos autors, aquest quocient també permet distingir els individus amb partícules LDL més petites i denses, fet que ha estat relacionat amb un augment més gran de risc cardiometabòlic (Bailey [et al.], 2014; Belén [et al.], 2014).

En el nostre experiment, aquest índex no va superar en cap cas el límit. Ara bé, si observem els resultats de la taula 9:

- Comparant dietes, el grup de tractament polifenols va augmentar significativament la ràtio TG/HDL ( $p=0,014$ ) en la dieta HFHS.
- En la dieta ESTD no es van observar diferències entre tractaments.
- Però en la dieta HFHS, tots els tractaments van augmentar la ràtio TG/HDL respecte el control (HFHS-omega-3  $p=0,016$ ; HFHS-polifenols  $p=0,002$  i HFHS-mixt  $p=0,040$ ). El grup HFHS-mixt va donar una ràtio més baixa que el grup de tractament HFHS-polifenols ( $p=0,017$ ).

## 2.4. PRESSIÓ ARTERIAL (PA)

- No es van trobar diferències significatives entre els dos tipus de dietes pel que fa als nivells de pressió arterial, ni sistòlica ni diastòlica.
- Comparant els tractaments en la dieta ESTD, es van observar diferències en la PA sistòlica: el tractament ESTD-polifenols donà

uns nivells de pressió sistòlica significament més baixos que el tractament ESTD-omega-3 ( $p=0,034$ ).

- Comparant tractaments en la dieta HFHS també es va veure com el tractament HFHS-polifenols donava lloc a uns nivells de PA sistòlica més baixos que el tractament HFHS-omega-3 ( $p=0,044$ ).

En resum, només el tractament polifenols va disminuir la PA sistòlica independentment de la dieta consumida.

Segons la bibliografia, tant els AGPI omega-3 com els polifenols tenen efectes sobre la disminució de la PA en rates alimentades amb dietes de cafeteria (Cabo [*et al.*], 2012; Pons [*et al.*], 2014).

Aquestes evidències s'han estudiat en individus i models animals d'HTA.

En el nostre cas, cap dels grups es pot classificar com a hipertens.

## 2.5. METABOLISME DE LA GLUCOSA

### 2.5.1. Glucèmia

- Pel que fa a la glucosa plasmàtica, no es van observar diferències significatives entre les dues dietes.
- Entre tractaments en la dieta ESTD es va observar un augment de la glucèmia en el grup alimentat amb omega-3 respecte al grup ESTD-control i al grup ESTD-polifenols ( $p= 0,017$  i  $p=0,001$  respectivament).
- Entre tractaments dintre de la dieta HFHS no es van observar diferències.

Segons els nostres resultats, sembla que els polifenols podrien tenir un paper protector més gran que no pas els AGPI omega-3, pel que fa a la regulació de glucèmia en dietes ESTD. Cal remarcar el fet que, tot i no donar diferències estadísticament significatives, el grup ESTD-mixt donà valors de glucèmia similars al grup ESTD-control.

Aquests fets concorden amb la literatura, mentre l'efecte dels AGPI omega-3 sobre els nivells de glucosa i la IR en general continuen sent controvertits (Lorente-Cebrián [*et al.*], 2013), l'efecte de les procianidines provinents de les llavors de raïm està ben documentat. Chis IC [*et al.*], 2009 i Hwang IK [*et al.*] (2009) van demostrar que els extractes de llavors de raïm disminuïen la concentració de glucosa plasmàtica en models animals de DM. Segons aquests autors, el mecanisme pel qual les procianidines podrien tenir aquest efecte sobre els nivells de glucèmia és pel seu paper antioxidant. Segons els autors, una glucèmia elevada indueix EO a les cèl·lules amb la formació de ROS. Així doncs, les procianidines redueixen l'EO i milloren els nivells de glucèmia (Chis [*et al.*], 2009; Hwang [*et al.*], 2009).

Altres estudis descriuen altres mecanismes d'acció, per exemple en l'article de Montagut G [*et al.*] (2010), en el qual es conclou que les procianidines provinents de la llavor de raïm estimulen la captació de glucosa en adipòcits insulinoresistents (Montagut [*et al.*], 2010).

Estudis més recents (González-Abuín [*et al.*], 2014) demostren que ambdós mecanismes continuen vigents per explicar la disminució de la glucèmia, però, a més, s'inclou la modulació dels nivells d'un pèptid

similar al glucagó-1 (GLP-1), la qual podria explicar en part l'efecte hipoglucèmic d'aquests components.

### 2.5.2. Insulina

- Comparant en dietes els nivells d'insulinèmia, van ser més elevats en rates alimentades amb dieta HFHS en els dos grups de tractament sense omega-3 (taula 9). És a dir, en aquest cas, els omega-3 protegeixen de l'IR.
- Comparant tractaments, no es van trobar diferències en cap de les dues dietes; però en la dieta HFHS, es va poder observar que el grup HFHS mixt va reduir la insulina una quarta part si es compara amb el grup de tractament HFHS control.

La relació de les procianidines provinents del raïm i la millora de la insulinèmia està ben descrita (Castell-Auví [et al.], 2012), tot i que els nostres resultats no coincideixen amb publicacions d'aquests autors.

Encara que la relació dels AGPI omega-3 amb la millora dels nivells d'insulina és controvertida pel que fa als mecanismes d'acció (Flachs [et al.], 2014; Mori, 2014), altres estudis estableixen una relació positiva entre els AGPI i la disminució de la insulinèmia com en el nostre cas, Poudyal H. (2011) fa una revisió de la relació entre els omega-3 i la insulina entre d'altres paràmetres de l'SM (Poudyal [et al.], 2011).

### 2.5.3. Hemoglobina glicosilada (HbA1c)

- En el nostre estudi, només el tractament mixt va donar un percentatge significativament més baix en comparar dietes ( $p=0,003$ ).
- No es van veure diferències entre tractaments en cap de les dues dietes.

Tot i les variacions en els valors d'insulinèmia, els valors de HbA1c tant entre dietes com entre tractaments van ser similars. Tots es podien classificar en els valors de normalitat en individus no-diabètics. En el cas de les rates de soca Wistar kyoto, aquest valor es considera dins de la normalitat fins al 4,6% (Figuerola, Pérez, & Mejía, 2013).

#### 2.5.4. Índex HOMA

En estudis epidemiològics, la resistència a la insulina es quantifica amb l'Índex HOMA (de l'anglès *Homeostatis Model Assesment*), de manera que aquest índex correlaciona perfectament amb la resistència a la insulina. Un estudi recent ha demostrat com alhora aquest índex de resistència a la insulina es troba significativament associat a l'SM (Vonbank, Saely, Rein, & Drexel, 2013).

Els nostres resultats concorden amb els resultats d'insulinèmia, ja que en comparar dietes es van observar diferències en els grups control ( $p=0,004$ ) i en els grups tractats amb polifenols ( $p=0,009$ ). En aquests dos grups l'índex HOMA fou més alt en rates alimentades amb HFHS que en rates alimentades amb dieta ESTD.

## 2.6. VALORACIÓ GLOBAL

Taula 10: VALORACIÓ GLOBAL DE LA SM

DIETA	VARIABLE	Tractament							
		Control		Omega3		Polifenols		Mixt	
		HFHS-ESTD	IC	HFHS-ESTD	IC	HFHS-ESTD	IC	HFHS-ESTD	IC
<b>Obesitat</b>									
	PES (g)	36,043	↑	45,914	↑	24,086	↑	17,400	
	GREIX CORPORAL (g)	14,701	↑	8,966	↑	-0,908		-0,570	
<b>Perfil lipídic</b>									
	COL TOTAL (mmol/L)	-0,821		-1,114	↓	-0,660	↓	-0,682	↓
	TG (mmol/L)	-0,276		-0,173		0,283		-0,101	
	HDL-col (mmol/L)	-0,230		-0,404	↓	-0,194	↓	-0,322	↓
	LDL-col (mmol/L)	-0,061		-0,123	↓	-0,194	↓	-0,187	↓
	HDL/LDL	0,060		-0,014		0,467	↑	0,442	
	TG/HDL	-0,029		0,229		0,400	↑	0,181	
<b>Pressió arterial</b>									
	PA SISTÒLICA (mm Hg)	0,857		-0,286		8,571		2,286	
	PA DIASTÒLICA (mmHg)	6,286		2,300		0,300		-0,143	
<b>Metabolisme de la glucosa</b>									
	GLUCOSA (mg/dL)	1,286		-6,857		4,429		2,143	
	INSULINA (ng/mL)	1,079	↑	0,794		1,393	↑	-0,001	
	HbA1c (%)	0,005		-0,012		-0,135		-0,659	↓
	Index HOMA	3,314	↑	2,514		5,286	↑	0,214	

**Valoració global de la SM:** La taula mostra les diferències dels paràmetres relacionats amb la (SM) Síndrome Metabòlica entre dieta HFHS i dieta ESTD. Les diferències estadísticament significatives apareixen marcades en groc. (IC): Importància Clínica; (↓) Disminució amb IC negativa; (↑) Augment amb IC negativa; (↓) Disminució amb IC positiva; (↑) Augment amb IC positiva. (COL) Colesterol; (TG) Triglicèrids; (HDL-col) Colesterol associat a lipoproteïna d'elevada densitat; (LDL-col) Colesterol associat a lipoproteïna de baixa densitat; (PA) Pressió Arterial; (HbA1c) Hemoglobina glicosil·lada; (HOMA) *Homeostasis Model Assessment*.

A manera de resum, la taula 10 expressa les diferències quantitatives entre dietes de cada un dels paràmetres analitzats. Els paràmetres significativament afectats apareixen marcats en groc. Al costat, el sentit de les fletxes, ascendent o descendent, representa l'augment o la disminució respectiva dels valors dels grups HFHS respecte els grups ESTD, i el color de les fletxes la importància clínica (vermell=negatiu; verd=positiu).

El tractament control va mostrar afectació dels paràmetres relacionats amb l'obesitat i afectació de dos paràmetres del metabolisme de glucosa, Insulina i índex HOMA, i va augmentar en els quatre casos.

El tractament omega-3 també va presentar alteració negativa en els paràmetres d'obesitat, ja que va augmentar pes i greix corporal i en el

perfil lipídic va disminuir el colesterol HDL. En el perfil lipídic van millorar dos paràmetres, ja que van disminuir colesterol total i ràtio HDL/LDL.

En el cas dels polifenols també hi va haver afectació del pes, el perfil lipídic va presentar canvis en gairebé tots els paràmetres, en dos de manera negativa, disminució de colesterol HDL i augment de la ràtio TG/HDL, i en tres de manera positiva, disminució del colesterol total i del colesterol LDL i augment de la ràtio HDL/LDL). En el metabolisme de la glucosa igual que en el tractament control es van afectar negativament insulina i índex HOMA, els valors dels quals van augmentar.

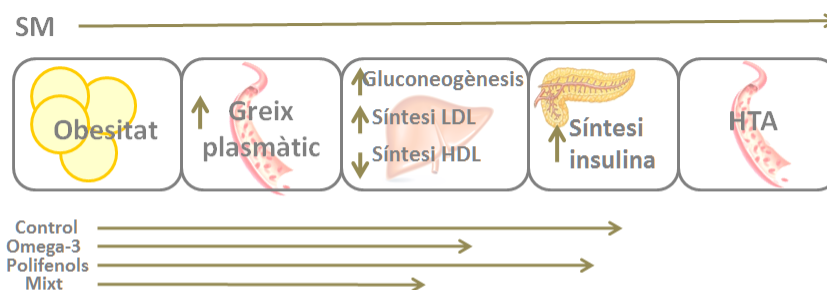
Finalment, pel que fa al tractament mixt, aquest tractament només va presentar alteracions negatives en un paràmetre del perfil lipídic, disminució del colesterol HDL. Alhora dos paràmetres més del perfil lipídic i un del metabolisme de la glucosa van canviar positivament, disminució del colesterol total, del colesterol LDL i de la HbA1c).

Valorant tots els paràmetres relacionats amb l'SM i segons la definició establerta pels diferents organismes oficials (taula 1), no es va induir l'SM en cap dels grups de tractament, ja que és necessària l'afectació d'un mínim de tres dels cinc paràmetres descrits. Tot i així, en desglossar aquests cinc paràmetres generals es va poder concloure que el grup de rates alimentades amb dieta HFHS es trobava davant d'una SM incipient o primerenca.

Com comentem en el capítol I de l'apartat "Introducció" (vegeu punt 2.2), la fisiologia de l'SM s'explica amb una sèrie d'afectacions encadenades entre si (figura 26). Com s'observa a la figura, el primer graó de la cadena és l'obesitat i l'últim la hipertensió arterial. En aquest

sentit, els nostres resultats demostren la tendència al desenvolupament de l'SM i com els diferents tractaments ocupen diferent lloc en aquesta tendència (figura 26).

**Figura 26. Estadi en la progressió de l'SM**



**Estadi en la progressió de la SM:** La figura representa on es situa cada grup de tractament en la evolució de la SM. Amb l'obesitat els (AG) àcids grassos lliures augmenten en plasma. En el fetge la major oferta d'AG augmenta la gluconeogènesis i la producció de apolipoproteïnes LDL i fa disminuir la producció de les HDL. En resposta a l'augment de la gluconeogènesis el pàncrees incrementa la producció d'insulina. La hiperinsulinèmia intensifica la reabsorció d'aigua i sodi i augmenta la vasoconstricció provocant (HTA) hipertensió arterial. La suma d'aquests estats esdevé l'entitat clínica SM ( *Albornoz-López, 2012 ; Eckel, et al., 2005*)



### 3. PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'ESTRÈS OXIDATIU A LA SANG

Els resultats dels paràmetres analitzats amb relació a l'EO a la sang apareixen resumits en la taula 11, en la qual *a* representa diferències respecte al tractament control; *b* diferències respecte al tractament omega-3, i *c* diferències respecte al tractament polifenols. Els valors de significació estadística *p* comparant les dues dietes, ESTD i HFHS, apareixen en l'apartat final de la taula, i en groc es destaquen les diferències estadísticament significatives. El sentit de les fletxes, ascendent o descendent, representa l'augment o la disminució respectiva dels valors dels grups HFHS respecte als grups ESTD.

**Taula 11: ESTRÈS OXIDATIU EN SANG**

DIETA	VARIABLE	Tractament										<i>p</i>	<i>p total</i>
		Control		Omega3		Polifenols		Mixt		<i>p</i>			
		Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE				
ESTD	<b>Eritròcits</b>												
	SOD U/g Hb	3698 ± 512		3277 ± 395		3033 ± 274		2285 ± 1083		a		0,004	
	CAT mmol/min/ g Hb	78,11 ± 14,15		61,25 ± 6,98		65,55 ± 6,60		78,73 ± 12,95		b		0,010	
	GR µmol/ min/ g Hb	0,35 ± 0,05		0,59 ± 0,15		0,42 ± 0,10		0,35 ± 0,08		b		0,002	
	GPx µmol/ min/ g Hb	0,35 ± 0,11		1,18 ± 0,68		6,10 ± 0,48		19,24 ± 3,01		a b c		<0,001	
	<b>Plasma</b>												
ORAC µmol TE/ mL plasma	17,62 ± 8,30		18,84 ± 4,43		16,66 ± 5,09		22,07 ± 2,90					0,308	
HFHS	<b>Eritròcits</b>												
	SOD U/g Hb	4688 ± 1344		3856 ± 689		2619 ± 1338		2787 ± 1462		a		0,016	
	CAT mmol/min/ g Hb	90,16 ± 5,94		68,67 ± 10,29		70,64 ± 6,64		78,29 ± 13,65		a		0,002	
	GR µmol/ min/ g Hb	0,41 ± 0,10		0,45 ± 0,10		0,43 ± 0,12		0,32 ± 0,14				0,273	
	GPx µmol/ min/ g Hb	0,43 ± 0,04		3,81 ± 0,94		13,42 ± 1,90		36,70 ± 8,51		a b c		<0,001	
	<b>Plasma</b>												
ORAC µmol TE/ mL plasma	17,70 ± 7,89		10,66 ± 5,73		19,25 ± 4,97		23,96 ± 3,48		b			0,004	
dif E-HF	<b>Eritròcits</b>												
	SOD	0,094		0,078		0,451		0,492					
	CAT	0,060	↑	0,140		0,194		0,953					
	GR	0,290		0,069		0,861		0,654					
	GPx	0,013	↑	0,002	↑	0,002	↑	0,003	↑				
	<b>Plasma</b>												
	ORAC	0,985		0,011	↓	0,355		0,309					

**Estrès oxidatiu en sang:** La taula mostra els resultats dels biomarcadors d'estrès oxidatiu, tots ells expressats en mitjanes ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins una mateixa dieta i els colors les diferències estadísticament significatives entre dietes. (SOD) Superòxid dismutasa; (CAT) Catalasa; (GR) Glutatió reductasa; (GPx) Glutatió peroxidasa; (ORAC) Oxygen radical absorbance capacity.

## 3.1 SISTEMES ANTIOXIDANTS ENZIMÀTICS EN ERITRÒCITS

### 3.1.1 SOD ERITROCITÀRIA

- Comparant dietes, tots els grups van presentar valors elevats de SOD, per sobre de 2000 U/g Hb i en la majoria de grups per sobre de 3000 U/g Hb; però cap va presentar diferències estadísticament significatives.
- Comparant tractaments en la dieta ESTD es van observar valors de SOD significativament més baixos que el grup ESTD-control en el tractament ESTD-mixt ( $p=0,005$ ). Tot i no presentar diferències amb cap altre grup de tractament, el grup ESTD-control va presentar els nivells de SOD més elevats, va indicar una capacitat antioxidant més gran.
- Comparant tractaments en la dieta HFHS, es van observar valors de SOD significativament més baixos en el grup HFHS-polifenols que en el grup HFHS-control ( $p=0,039$ ). Igual que en la dieta ESTD, el grup control va presentar els nivells de SOD més elevats.

### 3.1.2. CAT

- Comparant dietes, l'enzim CAT en eritròcits va ser significativament més alta en el grup HFHS-control que en ESTD-control. En la resta de grups de tractament no es van veure diferències entre dietes.

- En comparar tractaments en la dieta ESTD, el grup de tractament ESTD mixt va presentar valors de CAT més alts que el grup de tractament ESTD omega-3 ( $p=0,046$ ).
- En la dieta HFHS el tractament HFHS-control va presentar uns valors de CAT significativament més elevats que els tractaments HFHS-omega-3 i HFHS-polifenols ( $p=0,004$ ;  $p=0,013$  respectivament). En aquesta dieta, el tractament mixt, tot i no presentar diferències significatives respecte la resta de tractament, va mantenir els valors de CAT similars als valors de la dieta ESTD.

### 3.1.3 GR i GPx

- Pel que fa als enzims del sistema glutatió, tots els grups de tractament de la dieta HFHS van presentar més activitat de l'enzim GPx que els respectius grups amb dieta ETD (Taula 11). Ara bé, aquestes diferències no es van trobar en l'activitat de l'enzim GR.
- En la dieta ESTD es va veure que la GR era superior en el grup amb omega-3 que en el control ( $p=0,007$ ) i que el mixt ( $p=0,012$ ). Aquest últim va presentar valors similars al tractament control. L'enzim GPx va presentar molta més activitat en els dos tractaments que contenien polifenols, sobretot en el grup mixt que va presentar la GPx més alta. Ambdós grups de tractament van ser diferents de la resta i entre si ( $p<0,001$  en tots els casos).
- En la dieta HFHS no es van veure diferències en l'activitat de l'enzim GR. L'activitat de l'enzim GPx va seguir el mateix patró

que en la dieta ESTD, en què els dos tractaments suplementats amb polifenols es van diferenciar de la resta ( $p < 0,001$  en tots els casos, excepte entre HFHS-polifenols i HFHS-omega-3  $p = 0,003$ ).

### 3.2 CAPACITAT ANTIOXIDANT TOTAL DEL PLASMA (ORAC)

- Els omega-3 disminueixen l'ORAC plasmàtic en una dieta HFHS respecte una dieta ESTD (taula 11). Els diferents suplementos no modifiquen la capacitat antioxidant dels grups alimentats amb dieta ESTD, encara que el tractament ESTD-mixt va donar els valors més alts.
- En els grups amb dieta HFHS, el tractament HFHS-mixt va augmentar l'ORAC respecte al grup amb omega-3 sols ( $p = 0,005$ ).

### 3.3 VALORACIÓ GLOBAL

Els nostres resultats d'estrès oxidatiu no coincideixen amb la bibliografia que relaciona l'SM amb l'EO, ja que segons diferents estudis realitzats els individus que presenten obesitat persistent en el temps o SM, presenten una activitat dels enzims antioxidants SOD, CAT i GPx més petita en comparació amb individus sans (Fernández-Sánchez [*et al.*], 2011; Yen [*et al.*], 2008). Els nostres resultats, per contra, mostren un increment de l'activitat dels tres enzims en la dieta HFHS, encara que la significació estadística es presentés en només en GPx i en un sol tractament en el cas de l'enzim CAT.

L'estrès oxidatiu derivat de l'obesitat s'ha associat al desenvolupament de diferents estats patològics, entre els quals el més important l'SM (Fernández-Sánchez [et al.], 2011).

Per aquest motiu, diversos autors recalquen la importància dels biomarcadors d'estrès oxidatiu com a eina pel pronòstic d'SM (Fernández-Sánchez [et al.], 2011; Ho [et al.], 2013).

En aquest sentit, segons Yubero-Serrano [et al.] 2013, l'enzim SOD podria ser el marcador d'estrès oxidatiu més rellevant en casos d'SM, de manera que es podria tenir en compte com a eina per determinar el grau d'afectació en aquesta entitat clínica. Segons aquest estudi, com més components de SM tenen els individus, més activitat de la SOD (Yubero-Serrano [et al.], 2013).

En el nostre treball els diferents graus d'SM primerenca (figura 26) haurien de mostrar valors de SOD més elevats en funció de com més avançada estigués la síndrome. Els nostres resultats no van mostrar aquesta relació, en el sentit que, tot i que el tractament amb la síndrome més avançada (tractament control) l'activitat SOD va ser més alta, en el tractament amb la síndrome menys avançada (tractament mixt) l'activitat SOD no va ser la més baixa.

Pel que fa a la capacitat antioxidant total del plasma, segons la bibliografia s'esperava trobar un augment en els tractaments suplementats, ja que tant omega-3 com polifenols tenen capacitat antioxidant en si mateixos i, per tant, poden augmentar la capacitat antioxidant de l'organisme (Lluís [et al.], 2013a; Puiggròs [et al.], 2005).

S'esperava trobar un increment de la capacitat antioxidant en els tractaments suplementats, especialment el suplementat amb la mescla de polifenols i AGPI omega-3; per contra, només el tractament omega-3 va mostrar diferències. El tractament omega-3 va disminuir els valors d'ORAC en rates alimentades amb dieta HFHS en haver estat comparades amb rates alimentades amb dieta ESTD.

Una possible explicació podria ser l'estadi primerenc. Els sistemes antioxidants són una defensa natural de l'organisme; el seu desequilibri, és a dir, l'estrès oxidatiu, es deu a una sobrecàrrega del sistema en què els sistemes antioxidants esdevenen superats per les ERO (B Halliwell, 2007). Els biomarcadors d'estrès oxidatiu són les molècules que responen o pateixen canvis en resposta a l'estrès oxidatiu (Ho [*et al.*], 2013). És a dir, aquests biomarcadors tenen rang o marge abans de trobar-se afectats per la producció d'ERO.

En aquest sentit, tenint en compte la fase inicial de l'SM, potser els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu no són el millor biomarcador en estadis primerencs, a causa que els sistemes antioxidants endògens encara són capaços de mantenir l'equilibri i evitar l'estrès oxidatiu, fent que els biomarcadors romanguin encara inalterats.

## 4. PARÀMETRES RELACIONATS AMB L'ESTRÈS OXIDATIU AL FETGE

Els resultats d'estrès oxidatiu al fetge apareixen descrits en la taula 12, en la qual *a* representa diferències respecte al tractament control; *b* diferències respecte al tractament omega-3, i *c* diferències respecte al tractament polifenols. Els p-valors, comparant les dues dietes, ESTD i HFHS, apareixen a l'apartat final de la taula, i en groc es destaquen les diferències estadísticament significatives.

**Taula 12. ESTRÈS OXIDATIU EN FETGE**

DIETA	VARIABLE	Tractament										p total
		Control		Omega3		p	Polifenols		Mixt		p	
		Mitjana	DE	Mitjana	DE		Mitjana	DE	Mitjana	DE		
ESTD	<b>Enzims</b>											
	SOD U/ mg proteïna	147 ± 59		139 ± 27			122 ± 47		118 ± 33		0,452	
	CAT mmol/min/ mg	2,28 ± 1,01		3,82 ± 1,40			2,69 ± 0,85		2,80 ± 0,53		0,052	
	<b>Sistema glutatió</b>											
	GSH nmol/mg proteïna	172,34 ± 178,5		258,68 ± 83,1			245,51 ± 123,4		330,91 ± 88,5		0,155	
	GSSG nmol/ mg proteïna	313,51 ± 47,5		262,85 ± 48,1			308,20 ± 108,8		248,97 ± 63,8		0,260	
	GSSG/GSH	4,5 ± 3,8		1,1 ± 0,5			1,9 ± 2,0		0,8 ± 0,3	<i>a</i>	0,017	
	<b>Dany oxidatiu</b>											
TBARS nmol/mg proteïna	1,26 ± 0,47		9,41 ± 6,80		<i>a</i>	7,19 ± 3,76		8,38 ± 2,86	<i>a</i>	0,005		
HFHS	<b>Enzims</b>											
	SOD U/ mg proteïna	132 ± 18		122 ± 71			139 ± 20		135 ± 29		0,619	
	CAT mmol/min/ mg	2,94 ± 1,48		3,50 ± 0,99			2,94 ± 0,46		3,39 ± 0,74		0,607	
	<b>Sistema glutatió</b>											
	GSH nmol/mg proteïna	105,47 ± 76,8		154,65 ± 79,2			244,27 ± 115,8		243,44 ± 159		0,084	
	GSSG nmol/ mg proteïna	308,61 ± 68,0		293,21 ± 92,4			254,13 ± 48,9		284,31 ± 76,8		0,569	
	GSSG/GSH	5,4 ± 4,9		2,9 ± 3,2			0,9 ± 0,3		1,7 ± 1,1		0,064	
	<b>Dany oxidatiu</b>											
TBARS nmol/mg proteïna	0,92 ± 0,32		4,39 ± 1,67			6,77 ± 3,02	<i>a</i>	6,38 ± 3,83	<i>a</i>	0,001		
ESTD-HFHS		<i>p</i>		<i>p</i>			<i>p</i>		<i>p</i>			
	<b>Enzims</b>											
	SOD	0,949		0,253			0,406		0,142			
	CAT	0,351		0,636			0,516		0,118			
	<b>Sistema glutatió</b>											
	GSH	0,381		0,042			0,985		0,228			
	GSSG	0,878		0,456			0,254		0,368			
	GSSG/GSH	0,705		0,169			0,255		0,058			
	<b>Dany oxidatiu</b>											
	TBARS	0,180		0,153			0,848		0,277			

**Estrès oxidatiu en fetge:** La taula mostra els resultats dels biomarcadors d'estrès oxidatiu, tots ells expressats en mitjanes ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins una mateixa dieta i els colors les diferències estadísticament significatives entre dietes. (SOD) Superòxid dismutasa; (CAT) Catalasa; (GSH) Glutatió reduït; (GSSG) Glutatió oxidat; (TBARS) *Thiobarbituric acid reactive substances*.

## 4.1 SISTEMES ANTIOXIDANTS ENZIMÀTICS

Els enzims antioxidants determinats al fetge no es van veure afectats, no es van observar diferències ni en comparar dietes ni en comparar tractaments en cada dieta.

## 4.2 SISTEMES ANTIOXIDANTS NO ENZIMÀTICS

### 4.2.1 GSH

- Comparant dietes, només les rates tractades amb AGPI omega-3 en la dieta HFHS van presentar el GSH disminuït respecte a les rates alimentades amb dieta estàndard ( $p=0,042$ ). La resta de tractaments no va presentar diferències entre dietes; però els grups alimentats amb HFHS tendeixen a tenir menor GSH, excepte el grup amb polifenols.

- No es van observar diferències entre tractaments en les dietes.

### 4.2.2 GSSG

- No es van trobar diferències ni entre dietes ni entre tractaments.

### 4.2.3 GSSG/GSH

- Els valors de la ràtio GSSG/GSH van ser superiors en la dieta HFHS que no pas en la dieta ESTD en tots els grups de tractament excepte en el grup polifenols, en el qual van ser més baixos. No es van observar diferències entre dietes.

- Comparant tractaments en la dieta ESTD, la ràtio va ser significativament menor en el tractament ESTD-mixt respecte al



tractament ESTD-control. La resta de tractaments no va mostrar diferències.

- En la dieta HFHS no es van observar diferències entre tractaments; però els polifenols van mostrar tendència a disminuir la ràtio.

Pel que fa al sistema glutatió, un estudi recent (Fernández-Iglesias [*et al.*], 2014) que valora l'efecte conjunt entre AGPI omega-3 i proantocianidines dels raïm sobre el sistema glutatió al fetge, demostra que el tractament conjunt disminueix el GSH, augmenta GSSG en rates Wistar després de 14 hores d'administració per sonda de la mescla d'oli de peix i d'extracte de procianidines.

Els nostres resultats demostren com a llarg termini amb l'administració via oral aquest efecte no es dóna.

Sí que es va veure com entre dietes el tractament AGPI omega-3 va mostrar una disminució significativa del GSH, però segurament aquest canvi és degut a la composició greixosa de la dieta i no pas pel component afegit, ja que en una mateixa dieta els AGPI omega-3 no van mostrar aquest efecte.

De fet, en comparar dietes, en el tractament polifenols els nivells de GSH es van mantenir i els GSSG van disminuir probablement pel seu efecte antioxidant. En el cas del tractament mixt si que va disminuir el GSH però el GSSG es va mantenir. Així doncs, es podria dir que en una dieta HFHS comparada amb una dieta estàndard, els polifenols milloren el perfil glutatió hepàtic, mentre que els AGPI omega-3, ja siguin administrats sols

o juntament amb polifenols tenen tendència a disminuir el GSH i augmentar el GSSG.

## 4.3 DANY OXIDATIU

### 4.3.1 TBARS

No es van trobar diferències entre dietes pel que fa a dany oxidatiu pel mètode TBARS.

- Entre tractaments en la dieta estàndard, el tractament ESTD control va ser el que va presentar els valors més baixos. Totes les suplementacions en aquesta dieta van fer augmentar el valor dels TBARS amb diferències respecte al control dels grups omega-3 i mixt ( $p=0,013$  i  $p=0,026$  respectivament).
- En la dieta HFHS es va observar el mateix patró: els suplementes van augmentar els TBARS amb diferències dels grups polifenols i mixt respecte el control ( $p=0,003$  i  $p=0,006$  respectivament).

Diferents estudis demostren com la determinació de MDA després de la reacció amb les TBARS, determinen d'una manera genèrica o global diverses modificacions lipídiques. Així doncs, per determinar el dany oxidatiu a lípids, aquestes substàncies mostren poca especificitat. Per tot això, la validesa d'aquestes substàncies com a biomarcador d'estrès oxidatiu ha estat àmpliament discutida (HF Moselhy, RG Reid, S Yousef, 2013). Ara bé, recentment s'ha vist com les TBARS aporten una gran homogeneïtat de resultats quan la seva mesura és duu a terme amb espectrometria de masses en lloc de tècniques cromatogràfiques o fluorimètriques (Mateos, Lecumberri, Ramos, Goya, & Bravo, 2005; Neri

[*et al.*], 2015), fent que no es descarti el paper d'aquestes substàncies com a biomarcadors de dany oxidatiu.

## 5. PARÀMETRES D'INFLAMACIÓ AL FETGE

Els biomarcadors estudiats al fetge per determinar la inflamació apareixen resumits en la taula 13, en què *a* representa diferències respecte al tractament control; *b* diferències respecte al tractament omega-3 i *c* diferències respecte al tractament polifenols. Els p-valors comparant les dues dietes, ESTD i HFHS, apareixen en l'apartat final de la taula.

DIETA		VARIABLE		Tractament									
				Control		Omega3		Polifenols			Mixt		
				Mitjana	DE	Mitjana	DE	<i>p</i>	Mitjana	DE	<i>p</i>	Mitjana	DE
ESTD		PCR mg/mL	91,43 ± 21,6	45,35 ± 15,7	a	49,68 ± 7,9	a	56,07 ± 26,5	a	0,008			
		TNFa mg/mL	116,03 ± 72,5	63,84 ± 26,3	a	73,13 ± 66,7	a	62,62 ± 47,6	a	0,054			
		ICAM-1 mg/mL	5,06 ± 0,89	4,10 ± 0,81		3,67 ± 1,43		3,21 ± 1,00	a	0,021			
HFHS		PCR mg/mL	93,91 ± 53,7	64,29 ± 18,9		76,68 ± 41,7		60,29 ± 46,9		0,146			
		TNFa mg/mL	91,51 ± 47,8	55,16 ± 49,3	a	85,23 ± 59,5		54,52 ± 65,4	a	0,040			
		ICAM-1 mg/mL	4,66 ± 0,85	3,70 ± 0,68		3,06 ± 0,56		3,47 ± 2,17		0,132			
ESTD-HFHS			<i>p</i>	<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>					
		PCR	0,180	0,064		0,180		0,749					
		TNFa	0,253	0,153		0,475		0,116					
		ICAM-1	0,406	0,335		0,324		0,774					

**Inflamació en fetge:** La taula mostra els resultats dels biomarcadors d'inflamació, tots ells expressats en mitjanes ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins una mateixa dieta. (PCR) Proteïna C reactiva; (TNFa) Factor de necrosi tumoral alfa; (ICAM-1) Factor d'adhesió intercel·lular 1.

## 5.1 PCR

- Comparant dietes no es van observar diferències estadísticament significatives.
- Comparant els diferents tractaments en la dieta ESTD es va observar com els tres tractaments redueixen les concentracions hepàtiques de PCR respecte al tractament ESTD-control (ESTD-omega-3  $p=0,002$ , ESTD-polifenols  $p=0,002$  i ESTD-mixt  $p=0,048$ ).
- En la dieta HFHS no es van observar diferències significatives. Tot i així, el tractament que va donar els valors més baixos de PCR va ser el tractament HFHS-mixt.

Els nostres resultats coincideixen amb l'estudi de Terra [*et al.*] (2011), en què els polifenols, concretament les procianidines, disminueixen la PCR hepàtica, i amb el treball de Burlamaqui [*et al.*] (2011), en què els nivells de PCR hepàtica també disminueixen gràcies a la suplementació dels AGPI omega-3 en rates alimentades amb una dieta amb elevat contingut lipídic (Burlamaqui [*et al.*], 2011; Terra [*et al.*], 2011).

Segons la revisió sobre els efectes de diferents components bioactius en els paràmetres d'inflamació (Rosa [*et al.*], 2012), els flavanols en general, entre els quals les procianidines, no sembla que tinguin efectes sobre els marcadors d'inflamació en éssers humans. Encara que alguns autors afirmen que els nivells plasmàtics de PCR no són un bon indicador d'inflamació (Terra [*et al.*], 2011), altres recalquen que, des del punt de vista hepàtic, els nivells de PCR aporten una informació addicional al pronòstic de l'aparició d'SM i, per tant, de MCV (Kerner [*et al.*], 2005).

Bakker [*et al.*] (2010) van estudiar una mescla dietètica de biocomponents relacionats amb les malalties cardiovasculars i l'SM, els quals inclouen AGPI omega-3 i alguns compostos antioxidants. Els seus resultats, com els nostres, van demostrar que la combinació d'AGPI omega-3 i polifenols resulta la millor opció de tractament en rates alimentades amb dieta HFHS, en el cas concret de la PCR hepàtica (Bakker [*et al.*], 2010).

## 5.2 TNF $\alpha$

- Comparant dietes no es van observar diferències estadísticament significatives.
- Comparant els diferents grups en la dieta ESTD es va observar com els tres tractaments reduïen les concentracions hepàtiques de TNF $\alpha$  respecte al tractament ESTD-control (ESTD-omega-3  $p=0,037$ , ESTD-polifenols  $p=0,037$  i ESTD-mixt  $p=0,022$ ).
- En la dieta HFHS els tractaments HFHS-omega3 i HFHS-mixt van donar valors significativament més baixos que els grup HFHS-control ( $p=0,035$  i  $p=0,032$  respectivament).

Els nostres resultats coincideixen amb la bibliografia en què els AGPI omega-3 disminueixen els nivells hepàtics de TNF $\alpha$  (Rueda [*et al.*], 2011).

Els polifenols redueixen l'expressió gènica de TNF $\alpha$  i tenen un efecte protector sobre la inflamació hepàtica amb la inhibició de l'expressió de citocines (Chen [*et al.*], 2012), els nostres resultats demostren aquest efecte dels polifenols en una dieta ESTD; però no vam arribar a trobar

diferències en una dieta HFHS, encara que la tendència a la disminució existeix.

### 5.3 ICAM-1

- No es van observar diferències entre estàndard i HFHS en cap grup de tractament.
- Comparant els tractaments en una mateixa dieta, només es van trobar diferències en el grup ESTD-mixt respecte al grup ESTD-control en la dieta ESTD ( $p=0,029$ ).

Tot i que l'ICAM-1 està considerat un dels millors marcadors d'inflamació al fetge (Miller, Ferguson, & Dillon, 2011), els nostres resultats no són gaire conclouents, ja que no s'han observat diferències estadísticament significatives.

### 5.4 VALORACIÓ GLOBAL

Tot i no haver-hi diferències estadísticament significatives, els diferents biomarcadors d'inflamació hepàtics, els tres van ser més elevats en la dieta HFHS que no pas en la dieta ESTD. En les dues dietes tots els grups amb suplementes van tenir valors més baixos de biomarcadors d'inflamació que el grup control; per tant, un millor estat inflamatori que els tractaments control.

El tractament ESTD-mixt va ser l'únic tractament que va presentar valors significativament més baixos de els tres biomarcadors respecte al tractament ESTD-control.

## 6. LIPIDÒMICA

De manera general, els resultats de perfil lipídic del fetge analitzats per lipidòmica apareixen en les taules 14 per dieta ESTD i 15 per dieta HFHS: *a* representa diferències respecte al tractament control; *b* diferències respecte al tractament omega-3, i *c* diferències respecte al tractament polifenols. Les diferents espècies lipídiques identificades apareixen en la primera columna de la taula i estan separades amb línies verdes segons els tipus d'espècie (TAG, DAG, MAG o Cer) i amb línies negres segons el nombre de dobles enllaços en una mateixa categoria.





**Taula 14. PERFIL LIPÍDIC HEPÀTIC EN RATES ESTÀNDAR**

LIPID	Tractament											
	Control			Omega3			Polifenols			Mixt		
	Mitjana	DE	p	Mitjana	DE	p	Mitjana	DE	p	Mitjana	DE	p
12:0,16:0,16:1-TAG	105891 ± 14769	96165 ± 9250	135314 ± 93823	84152 ± 11123	0,308							
14:0,16:0,16:0-TAG	200019 ± 28802	200281 ± 44933	453359 ± 661992	165147 ± 40255	0,411							
14:0,16:0,18:0-TAG	606528 ± 182203	615210 ± 145260	1681669 ± 2769705	408203 ± 108619	0,383							
16:0,16:0,18:0-TAG	853058 ± 157939	822067 ± 106673	993664 ± 717807	515260 ± 84728	0,197							
14:0,14:0,16:1-TAG	60767 ± 15877	57854 ± 9362	85524 ± 64679	54048 ± 16608	0,381							
16:0,16:1,16:1-TAG	493429 ± 684873	328824 ± 269418	1139802 ± 1981830	172446 ± 95287	0,405							
14:0,14:0,18:1-TAG	165821 ± 77498	155301 ± 51860	320611 ± 398519	135722 ± 39268	0,380							
14:0,16:0,18:1-TAG	538883 ± 490737	506006 ± 331743	1414606 ± 2292624	323516 ± 143683	0,387							
18:1,16:0,16:0-TAG	2607639 ± 1983633	2038621 ± 1050392	5044646 ± 6432443	1164932 ± 398506	0,247							
16:0,18:0,18:1-TAG	504934 ± 385762	433720 ± 209890	1262240 ± 1995217	267760 ± 93401	0,347							
16:0,18:1,20:4-TAG	1693035 ± 1199160	387170 ± 103202	1820924 ± 736758	240800 ± 129187	0,000							
16:0,16:1,18:1-TAG	5553682 ± 4119223	4287281 ± 1827760	8106224 ± 7515967	2402918 ± 687570	0,167							
18:1,18:1,18:1-TAG	2116491 ± 1854560	1255242 ± 612641	4273238 ± 6224405	686295 ± 231837	0,254							
16:0,18:1,18:1-TAG	9319491 ± 7250451	4982475 ± 2117371	11620356 ± 8573873	2875626 ± 989695	0,048							
18:0,18:1,18:1-TAG	433514 ± 361484	326900 ± 153584	1140670 ± 1917743	194046 ± 67733	0,346							
16:0,16:0-DAG	1063125 ± 76108	1079272 ± 99549	926258 ± 149398	1013343 ± 129062	0,101							
16:0,16:0-DAG (II)	1205962 ± 149571	1259899 ± 167067	1063415 ± 123704	992383 ± 157463	0,014							
16:0,18:0-DAG	4472211 ± 243060	4313939 ± 579691	4331604 ± 524850	4554894 ± 583675	0,802							
16:0,18:0-DAG(II)	1883048 ± 206808	1825151 ± 194973	1568656 ± 128671	1705435 ± 104203	0,011							
18:0,18:0-DAG	3951514 ± 248214	3769522 ± 479891	3896945 ± 457009	4102633 ± 467709	0,580							
16:0,16:1-DAG	26014 ± 19174	18321 ± 3492	28470 ± 23845	12455 ± 10167	0,505							
16:0,18:1-DAG	224381 ± 72237	263931 ± 306257	222602 ± 53641	158799 ± 25912	0,019							
16:0,18:1-DAG(II)	1091977 ± 433094	898930 ± 136751	962858 ± 331532	702875 ± 175293	0,126							

Taula 14. PERFIL LIPÍDIC HEPÀTIC EN RATES ESTÀNDAR (continuació)

LIPID	Control			Omega3			Tractament			Mixt			
	DE	Mitjana	DE	DE	Mitjana	DE	DE	Mitjana	DE	DE	Mitjana	DE	
22:5,22:6-DAG	73244 ± 27078	137957 ± 23607	a	58936 ± 5124	b	124185 ± 54604							0,003
18:2,22:6-DAG	266841 ± 149146	651612 ± 156661	a	168699 ± 51383	b	503181 ± 195868							a c
18:2,22:5-DAG	75835 ± 8868	190532 ± 35118	a	73230 ± 15426	b	193968 ± 84949							a c
16:0,20:5 + 18:2,18:3-DAG	357799 ± 311088	204361 ± 33319		263939 ± 91601	a b	161605 ± 27909							c
18:1,20:5 + 16:0,22:6-DAG	274068 ± 103193	315976 ± 32522		203391 ± 44764	b	290943 ± 49378							a c
18:1,22:6-DAG	47384 ± 28609	112338 ± 22895	a	26500 ± 8213	b	108901 ± 38022							a c
16:0,22:5-DAG	190790 ± 56890	170661 ± 16720		196649 ± 36895		160631 ± 37416							a c
18:1,22:5-DAG	104849 ± 23438	112894 ± 14327		94189 ± 17979	b	117865 ± 28500							0,109
16:0,18:2 + 16:0,18:2-DAG	1035132 ± 467814	850849 ± 109517		1033161 ± 398154		512652 ± 460433							0,208
18:1,18:2-DAG	934599 ± 508697	535527 ± 82448	a	1018444 ± 731016	b	520583 ± 124953							a c
18:1,18:1-DAG	893673 ± 409792	637012 ± 136475		817164 ± 512738		507472 ± 118894							0,084
16:0-MAG	3274630 ± 360838	3205888 ± 190053		3097237 ± 194309		3027299 ± 251002							1,170
18:0-MAG	2000690 ± 251300	2018784 ± 147625		1969282 ± 117134		1827143 ± 148132							1,612
18:1-MAG	348986 ± 142743	243678 ± 60059	a	246754 ± 38443	a	222439 ± 58875							0,008
Cer(d18:1/16:0)	29520 ± 2097	30252 ± 7390		27841 ± 6370		22308 ± 8613							0,172
Cer(d18:1/18:0)	14634 ± 4828	12129 ± 4044		13429 ± 5057		11512 ± 6123							0,705
Cer(d18:1/20:0)	3133 ± 1266	1920 ± 1447		2806 ± 1553		2257 ± 1264							0,419
Cer(d18:1/24:1(15Z))	116040 ± 26597	135933 ± 27066		110665 ± 31240		105732 ± 27207							0,245
Cer(d18:1/22:0)	65405 ± 8397	51560 ± 10449		52967 ± 13261		45523 ± 16688							0,072
Cer(d18:1/23:0)	101346 ± 19551	94683 ± 14201		95870 ± 22041		86275 ± 24764							0,644
Cer(d18:1/24:0)	297391 ± 27575	297110 ± 52977		250865 ± 64142		256934 ± 63898							0,272
Cer(d18:1/25:0)	36833 ± 14490	26979 ± 11495		27864 ± 3595		31665 ± 16776							0,483
Cer(d18:1/18:1(9Z))	0 ± 0	89 ± 219		7 ± 9		0 ± 0							0,418

**Perfil lipídic en rates estàndard:** La taula mostra el perfil lipídic determinat en els teixits de les rates alimentades amb dieta ESTD. Els resultats apareixen expressats en àrees sota el pic ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins la mateixa dieta. (TAG) Triacilglicerols; (DAG) Diacilglicerols; (MAG) Monoacilglicerols; (Cer) Ceramides; (I) Integració de vàries espècies, al no estar suficientment resoltes cromatogràficament o al formar un sol pic amb mescla de components; (Z) posició de la isomeria.

**Taula 15. PERIL LIPÍDIC HEPÀTIC EN RATES HFHS**

LIPID	Tractament											
	Control					Omega3					Mixt	
	Mijana	DE	Mijana	DE	p	Mijana	DE	Mijana	DE	p	p total	
12:0,16:0,16:0-TAG	328804	± 493633	560900	± 458425		155822	± 109978	186840	± 86980		0,159	
14:0,16:0,16:0-TAG	797903	± 1031540	1526283	± 1324820		366693	± 253336	459367	± 194945		0,081	
14:0,16:0,18:0-TAG	1512221	± 1375900	2558223	± 2027429		834671	± 354500	956279	± 318955		0,069	
16:0,16:0,18:0-TAG	1177463	± 557486	1917805	± 1243100		843208	± 175977	884708	± 214881	b	0,030	
14:0,14:0,16:1-TAG	372400	± 683438	593986	± 390202		135573	± 136078	188867	± 108919		0,197	
16:0,16:1,16:1-TAG	2521507	± 3363272	4553339	± 3261762		1237472	± 948153	1512648	± 818621		0,083	
14:0,14:0,18:1-TAG	1140138	± 1815172	2211536	± 1889133		461383	± 408322	629051	± 387138		0,105	
14:0,16:0,18:1-TAG	3435753	± 4048217	7096124	± 5432882		1657483	± 1204248	2236523	± 1168285	b	0,039	
18:1,16:0,16:0-TAG	8738565	± 5908120	13724984	± 7382550		5805866	± 2393962	6710501	± 2147648	b	0,037	
16:0,18:0,18:1-TAG	2944530	± 2861403	6107899	± 5365267		1812636	± 961374	2148721	± 1000666		0,069	
16:0,18:1,20:4-TAG	2351772	± 1368017	2133624	± 980786		1761115	± 552604	1130545	± 454660		0,097	
16:0,16:1,18:1-TAG	10987688	± 7433790	17012662	± 7739449		7358033	± 3184021	8353343	± 2628047	b	0,026	
18:1,18:1,18:1-TAG	4853455	± 3983249	5231848	± 4465921		3368939	± 1590831	2632700	± 1040410		0,384	
16:0,18:1,18:1-TAG	25872582	± 12975626	34102695	± 11840210		21106311	± 7122265	20346033	± 6341531		0,078	
18:0,18:1,18:1-TAG	1862463	± 2137674	2943503	± 3291791		1150868	± 649218	1053235	± 485717		0,298	
16:0,16:0-DAG	980508	± 92390	1006970	± 131117		870856	± 59664	871362	± 263953		0,281	
16:0,16:0-DAG (II)	1141188	± 244737	1383106	± 333462		1101455	± 221911	674426	± 66709	ab c	0,000	
16:0,18:0-DAG	4286393	± 469447	3799698	± 406043		4087403	± 384997	4243074	± 512971		0,233	
16:0,18:0-DAG(II)	1718779	± 347485	1671014	± 339590		1517847	± 189745	1523429	± 171486		0,419	
18:0,18:0-DAG	3783685	± 417384	2622298	± 721564	a	3778937	± 432643	3514456	± 541491	b	0,002	
16:0,16:1-DAG	63477	± 30093	101963	± 64683		34566	± 10454	119095	± 72012	ab	0,003	
16:0,18:1-DAG	406653	± 148792	266174	± 42127	a	271193	± 29245	395168	± 158144	a	0,035	
16:0,18:1-DAG(II)	2004299	± 575753	1705234	± 545062		1283705	± 157851	2391651	± 1000509	a	0,024	

**Taula 15. PERFIL LIPÍDIC HEPÀTIC EN RATES HFHS (continuació)**

LIPID	Tractament												
	Control			Omega3			Polifenols			Mixt			
	Mijana	DE	p	Mijana	DE	p	Mijana	DE	p	Mijana	DE	p	p total
22:5,22:6-DAG	92335 ± 16844		a	291691 ± 195926		a	79918 ± 6451		b	454973 ± 298111		a c	0,000
18:2,22:6-DAG	109032 ± 28786		a	700984 ± 430058		a	77302 ± 14825		a b	1065847 ± 592159		a c	0,000
18:2,22:5-DAG	51512 ± 15636		a	343771 ± 273337		a	39743 ± 12427		a b	554046 ± 373968		a c	0,000
16:0,20:5 + 18:2,18:3-DAG	223201 ± 58671			295169 ± 129739			155608 ± 39141		a b	315677 ± 127844		c	0,008
18:1,20:5 + 16:0,22:6-DAG	146745 ± 21054		a	584248 ± 298270		a	95895 ± 22871		a b	802048 ± 324448		c	0,000
18:1,22:6-DAG	30399 ± 13557		a	322625 ± 195495		a	18686 ± 4971		a b	676925 ± 415256		a b c	0,000
16:0,22:5-DAG	196628 ± 55621			375326 ± 250342			158736 ± 34598		b	503394 ± 278096		a c	0,001
18:1,22:5-DAG	92957 ± 22063		a	340867 ± 230303		a	72237 ± 11016		a b	534488 ± 328374		a c	0,000
16:0,18:2 + 16:0,18:2-DAG	938975 ± 329296			1114584 ± 496812			643898 ± 83453			911401 ± 1296211			0,063
18:1,18:2-DAG	1089886 ± 491314			757909 ± 388807			700129 ± 110534		a	1519177 ± 868322		b c	0,037
18:1,18:1-DAG	1824212 ± 650677			946931 ± 356503			1043084 ± 113812		a	1554848 ± 756644			0,022
16:0-MAG	3074653 ± 324771			3094709 ± 327978			3053250 ± 149852			3116657 ± 213813			0,075
18:0-MAG	1859717 ± 207710			1981476 ± 276012			1838454 ± 131134			1931991 ± 146976			0,746
18:1-MAG	591741 ± 358570			208061 ± 24109			311941 ± 48217		a b	542725 ± 346064		b	0,004
Cer(d18:1/16:0)	40933 ± 6937			35236 ± 7759			28004 ± 2220			62096 ± 17665		a b c	0,000
Cer(d18:1/18:0)	32576 ± 8892		a	13671 ± 7589		a	22896 ± 3348			31740 ± 12519		b	0,002
Cer(d18:1/20:0)	5300 ± 1959			2115 ± 1494			2912 ± 1785			4913 ± 4943			0,176
Cer(d18:1/24:1(15Z))	97387 ± 21582		a	48247 ± 15812		a	85243 ± 12882		b	84760 ± 17028		b	0,000
Cer(d18:1/22:0)	78070 ± 16826		a	30066 ± 9390		a	70358 ± 10856		b	60680 ± 12062		b	0,000
Cer(d18:1/23:0)	118950 ± 14448		a	69052 ± 20999		a	98639 ± 15585			122762 ± 23912		b	0,000
Cer(d18:1/24:0)	272688 ± 34363		a	158876 ± 39828		a	219056 ± 22283			261237 ± 53211		b	0,000
Cer(d18:1/25:0)	17190 ± 9318			18581 ± 7333			30314 ± 8866			34216 ± 14432		a	0,013
Cer(d18:1/18:1(9Z))	741 ± 671			600 ± 674			901 ± 918			1083 ± 1062			0,761

**Perfil lipídic en rates HFHS:** La taula mostra el perfil lipídic determinat en els fetges de les rates alimentades amb dieta HFHS. Els resultats apareixen expressats en àrees sota el pic ± (DE) desviació estàndard. Les lletres representen les diferències estadísticament significatives entre tractaments dins la mateixa dieta. (TAG) Triacilglicerols; (DAG) Diacilglicerols; (MAG) Monoacilglicerols; (Cer) Ceramides; (I) Integració de varies espècies, al no estar suficientment resoltes cromatogràficament o formar un sol pic amb mescla de components; (Z) posició de la isomeria.

La taula 16 expressa els valors de significació estadística  $p$  en comparar les espècies lipídiques en els dos tipus de dietes (ESTD i HFHS), els  $p$ -valors estadísticament significatius apareixen marcats en color verd.

Taula 16. DIFERENCIES DELS PERFILS LIPÍDICS HEPÀTICS ENTRE DIETES

TAG	LIPID	Tractament				
		Control	Omega3	Polifenols	Mixt	
		p	p	p	p	
<b>saturats</b>	12:0,16:0,18:0-TAG	0,063	<b>0,003</b>	0,180	<b>0,003</b>	
	14:0,16:0,16:0-TAG	<b>0,032</b>	<b>0,003</b>	0,110	<b>0,003</b>	
	14:0,16:0,18:0-TAG	<b>0,046</b>	<b>0,003</b>	<b>0,482</b>	<b>0,003</b>	
	16:0,16:0,18:0-TAG	0,153	<b>0,004</b>	<b>0,482</b>	<b>0,004</b>	
	<b>monoinsaturats</b>	14:0,14:0,16:1-TAG	<b>0,046</b>	<b>0,003</b>	0,225	<b>0,003</b>
		16:0,16:1,16:1-TAG	0,063	<b>0,003</b>	0,085	<b>0,003</b>
		14:0,14:0,18:1-TAG	<b>0,032</b>	<b>0,003</b>	<b>0,048</b>	<b>0,003</b>
		14:0,16:0,18:1-TAG	<b>0,022</b>	<b>0,003</b>	<b>0,048</b>	<b>0,003</b>
		18:1,16:0,16:0-TAG	0,063	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>	<b>0,003</b>
		16:0,18:0,18:1-TAG	<b>0,015</b>	<b>0,003</b>	<b>0,025</b>	<b>0,003</b>
	<b>poliinsaturats</b>	16:0,18:1,20:4-TAG	0,380	<b>0,007</b>	0,866	0,001
		16:0,16:1,18:1-TAG	0,116	<b>0,003</b>	0,482	<b>0,003</b>
18:1,18:1,18:1-TAG		0,116	<b>0,004</b>	0,142	<b>0,003</b>	
16:0,18:1,18:1-TAG		<b>0,032</b>	<b>0,003</b>	<b>0,025</b>	<b>0,003</b>	
18:0,18:1,18:1-TAG		<b>0,046</b>	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>	<b>0,003</b>	
<b>DAG</b>	<b>saturats</b>	16:0,16:0-DAG	0,106	0,282	0,380	0,257
		16:0,16:0-DAG	0,585	0,438	0,699	<b>0,000</b>
		16:0,18:0-DAG	0,402	0,096	0,341	0,327
		16:0,18:0-DAG	0,153	0,568	0,406	0,086
		18:0,18:0-DAG	,560	<b>0,010</b>	0,565	0,063
	<b>monoinsaturats</b>	16:0,16:1-DAG	<b>0,016</b>	<b>0,003</b>	0,180	<b>0,003</b>
		16:0,18:1-DAG	<b>0,016</b>	<b>0,032</b>	0,064	<b>0,003</b>
		16:0,18:1-DAG	<b>0,010</b>	<b>0,003</b>	0,085	<b>0,003</b>
	<b>poliinsaturats</b>	22:5,22:6-DAG	<b>0,046</b>	<b>0,022</b>	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>
		18:2,22:6-DAG	<b>0,003</b>	0,475	<b>0,002</b>	<b>0,022</b>
		18:2,22:5-DAG	<b>0,015</b>	0,568	<b>0,006</b>	<b>0,010</b>
		16:0,20:5-DAG + 18:2,18:3-DAG	0,253	0,116	<b>0,013</b>	<b>0,004</b>
		18:1,20:5-DAG + 16:0,22:6-DAG	<b>0,003</b>	<b>0,010</b>	<b>0,003</b>	<b>0,003</b>
		18:1,22:6-DAG	0,153	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>	<b>0,003</b>
		16:0,22:5-DAG	0,775	<b>0,022</b>	<b>0,035</b>	<b>0,003</b>
		18:1,22:5-DAG	0,153	<b>0,003</b>	<b>0,035</b>	<b>0,003</b>
		16:0,18:2-DAG + 16:0,18:2-DAG	1,000	0,668	<b>0,004</b>	0,668
		18:1,18:2-DAG	0,199	0,253	0,406	0,007
18:1,18:1-DAG	<b>0,007</b>	<b>0,046</b>	<b>0,035</b>	<b>0,003</b>		
<b>MAG</b>	<b>saturats</b>	16:0-MAG	0,315	0,162	0,611	0,502
		18:0-MAG	0,291	0,762	0,073	0,228
	<b>monoinsaturats</b>	18:1-MAG	0,116	0,568	<b>0,035</b>	<b>0,046</b>
<b>Cer</b>	Cer(d18:1/16:0)	<b>0,004</b>	0,116	0,949	<b>0,003</b>	
	Cer(d18:1/18:0)	<b>0,001</b>	0,649	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	
	Cer(d18:1/20:0)	<b>0,045</b>	0,886	0,848	0,475	
	Cer(d18:1/24:1(15Z))	0,190	<b>0,000</b>	0,070	0,118	
	Cer(d16:1/22:0)	0,124	<b>0,003</b>	<b>0,020</b>	0,004	
	Cer(d18:1/23:0)	0,089	<b>0,024</b>	0,791	<b>0,021</b>	
	Cer(d18:1/24:0)	0,186	<b>0,000</b>	0,239	0,897	
	Cer(d18:1/25:0)	<b>0,046</b>	0,153	0,749	1,000	
	Cer(d18:1/18:1(9Z))	<b>0,002</b>	<b>0,019</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	

Diferències dels perfils lipídics hepàtics: La taula mostra les diferències entre els perfils lipídics hepàtics. Els resultats apareixen expressats en valors de significació estadística p. (TAG) Triacilglicerols; (DAG) Diacilglicerols; (MAG) Monoacilglicerols; (Cer) Ceramides; (I) Integració de diverses espècies, al no estar suficientment resoltes cromatogràficament o al formar un sol pic amb mescla de components; (Z) posició de la isomeria.

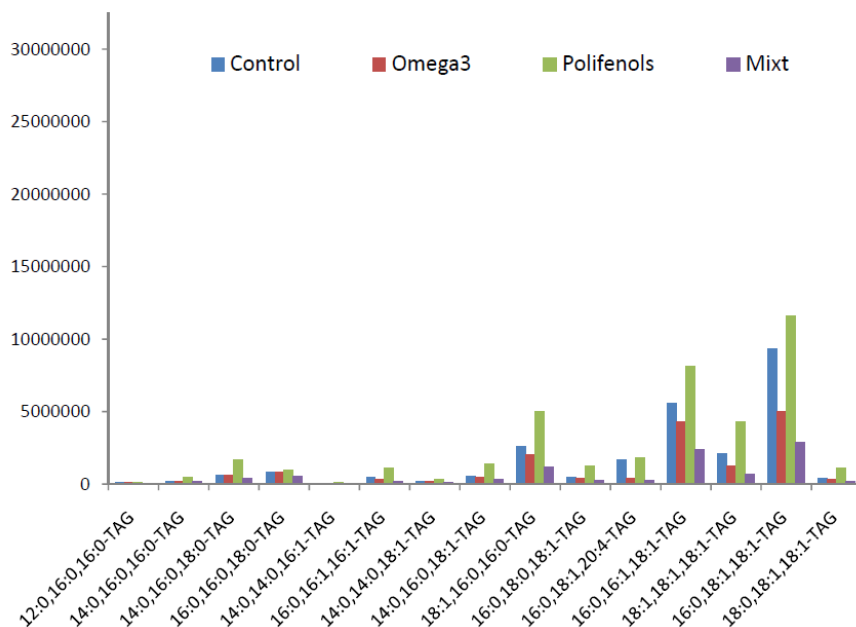
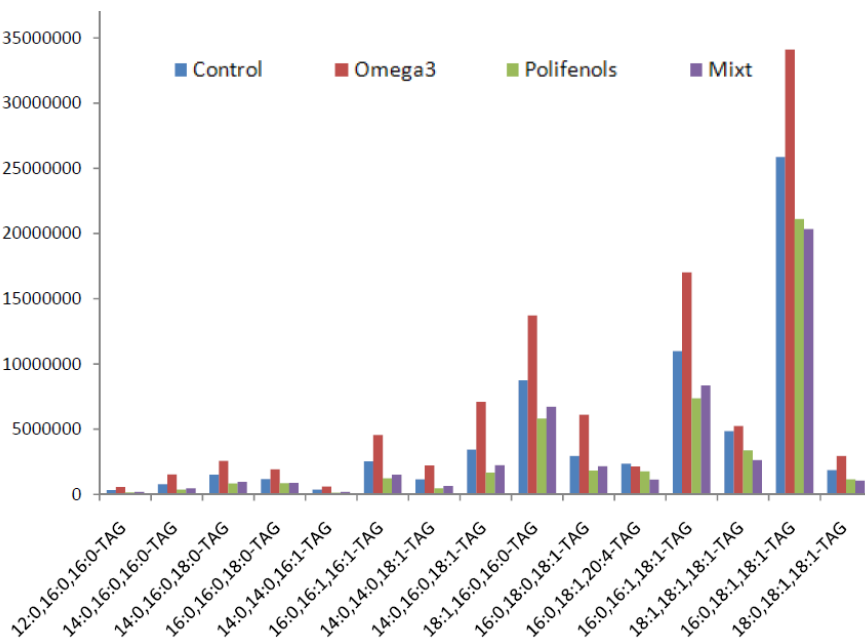
## 6.1 TAG

Pel que fa la composició de TAG presents al fetge, la figura 27 mostra una representació gràfica de les diferents espècies determinades.

- Comparant dietes es poden observar clarament dos perfils lipídics diferents de TAG. En general, n'hi havia molta més quantitat en els grups amb la dieta HFHS; en molts casos de l'ordre de sis vegades més alts. Els dos tractaments que contenen AGPI omega-3 (tractament omega 3 i tractament mixt) van presentar canvis significatius entre dietes en totes les espècies de TAG identificades (taula 15). El tractament control va presentar diferències en 8 espècies de TAG i el tractament polifenols en 6.
- En la figura 27 observem que en la dieta ESTD la quantitat de TAG és més alta en el tractament ESTD-polifenols. La taula 13 mostra les diferències entre tractaments en què s'observen significacions en dues espècies concretes: 16:0,18:1,20:4-TAG i 16:0,18:1,18:1-TAG. En els dos casos el tractament ESTD-polifenols va augmentar-ne els valors respecte al tractament ESTD-omega-3 i el tractament ESTD-mixt va disminuir-ne els valors respecte a la resta de tractaments, ESTD-control, ESTD-omega-3 i ESTD-polifenols. Cal remarcar també que els valors de TAG 16:0,18:1,20:4-TAG en el grup ESTD- omega-3 van ser significativament més baixos que els valors del grup ESTD-control ( $p < 0,05$  en tots els casos)

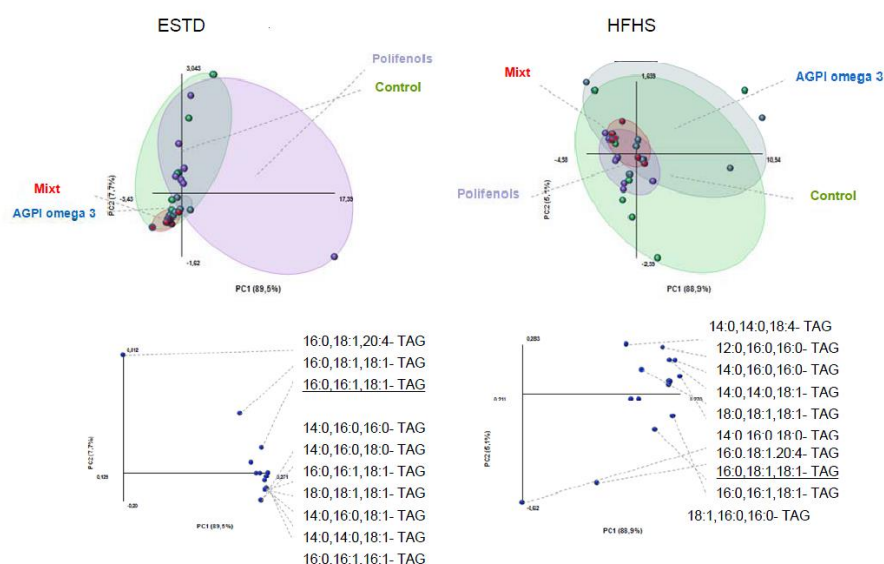
- En la dieta HFHS, la figura ens permet observar, de manera general, com la quantitat de TAG en aquesta dieta és més gran en el tractament HFHS-omega-3. La taula 14 mostra les diferències entre tractaments en què s'observen significacions en quatre espècies concretes: 16:0,16:0,18:0-TAG; 14:0,16:0,18:1-TAG ; 18:1,16:0,16:0 TAG; 16:0,16 :1,18:1 TAG. En aquestes quatre espècies, els tractaments HFHS-polifenols i HFHF-mixt van presentar valors significativament més baixos que el tractament HFHS omega-3 ( $p < 0,05$  en tots els casos).



**Figura 27. Contingut en TAG****TAG en dieta estàndard****TAG en dieta HFHS**

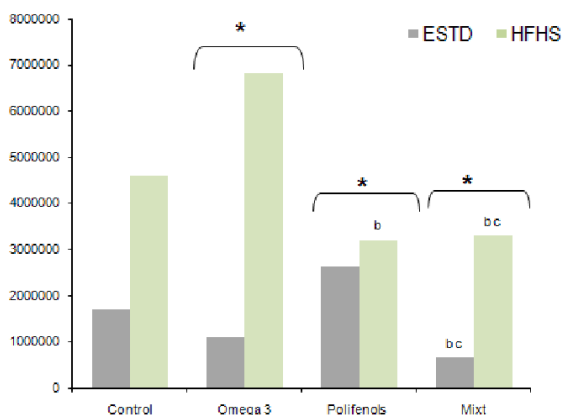
L'anàlisi de component principal (figura 28) ens mostra que en la dieta ESTD, els diferents tractaments van donar lloc a una composició similar; mentre que en la dieta HFHS els components principals es començaven a diferenciar segons el tractament seguit.

**Figura 28. TAG: Anàlisi de component principal**



**Anàlisi de component principal:** (TAG) Triacilglicerols. En el gràfic superior cada punt representa individu, els diferents tractaments estan diferenciats per colors. En correlació amb els gràfics superiors, en els gràfics inferiors cada punt representa una espècie lipídica. Aquestes espècies lipídiques són les que tenen més pes dintre de cada tractament i per tant separen els tractaments per component principal.

En la figura 29 es representa la suma de tots els TAG trobats al fetge i es distingeix per grups de tractament.

**Figura 29. TAG hepàtics totals**

**TAG hepàtics totals:** El gràfic representa la totalitat de (TAG) triacilglicerols determinats en fetge en cada tractament. La determinació segons les àrees sota el pic és adimensional. (\*) diferències entre dietes; (b) diferències estadísticament significatives respecte al tractament Omega 3 (c) diferències estadísticament significatives respecte al tractament polifenols.

- Comparant dietes es van donar valors més alts de TAG hepàtics en la dieta HFHS. Aquests valors van ser estadísticament significatius en els tres tipus de tractaments: HFHS-omega-3 ( $p=0,003$ ), HFHS-polifenols ( $0,048$ ) i HFHS-mixt ( $0,003$ ).
- En la dieta ESTD el grup de tractament ESTD-mixt va diferenciar-se significativament dels grups de tractaments ESTD-omega-3 ( $p=0,0032$ ) i del grup de tractament ESTD polifenols ( $p=0,003$ ) i va ser el grup de tractament que va donar menors valors de TAG hepàtics. Entre la resta de tractaments no es van trobar diferències significatives; però la tendència observada va ser que els omega-3 disminueixen els TAG i els polifenols els augmenten. En la dieta HFHS, els tractaments amb polifenols i mixt van donar

valors significament més baixos que el tractament amb omega-3 (p=0,015 i p=0,032 respectivament).

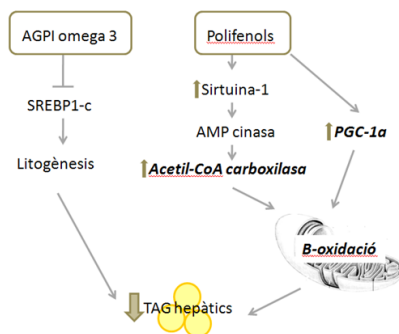
En resum, en cas de dietes ESTD, la suplementació amb omega-3 juntament amb polifenols seria útil per disminuir els TAG al fetge. En cas de dietes hipercalòriques, la inclusió d'omega-3 no millora el perfil hepàtic dels TAG i són més útils els suplementes amb polifenols.

Diferents estudis han demostrat la relació entre els AGPI omega-3 i el menor cúmul de TAG al fetge. Pel que fa al mecanisme d'acció (figura 30), sembla que els AGPI omega-3 inhibeixen la lipogènesi amb la inhibició del sistema LXR-SREB1-c (Lamaziere, Wolf, Barbe, Bausero, & Visioli, 2013; Shin, Yoon, & Moon, 2010). Els nostres resultats confirmen aquesta hipòtesi en dietes ESTD, però no en dietes HFHS.

Pel que fa als polifenols també s'ha estudiat el seu efecte sobre la composició lipídica hepàtica de manera que també prevenen el cúmul de TAG al fetge. Pel que fa al mecanisme d'acció (figura 30), els polifenols regulen les nivells de TAG hepàtics per dues vies: *a*) per mitjà de l'activació de la sirtuina-1 acaben activant l'enzim Acetil-CoA carboxilasa, el qual augmenta la beta oxidació mitocondrial dels greixos i, per tant, es disminueix el contingut hepàtic de TAG; i *b*) activen la proteïna PGC-1a (*Peroxisoma proliferator activated G-receptor coactivador-1a*), la qual és un lligand dels PPAR, família de receptors nuclears que també incrementen la  $\beta$ -oxidació de greixos per part del mitocondri (Aoun [et al.], 2010). Aquest mateix estudi demostra que el sistema de la SREBP1-c no es veu afectat per la suplementació de polifenols.

Els nostres resultats concorden amb la bibliografia, de manera que en una dieta HFHS, els polifenols disminueixen el contingut de TAG al fetge.

**Figura 30: Mecanismes d'acció implicats amb el cúmul de TAG al fetge**



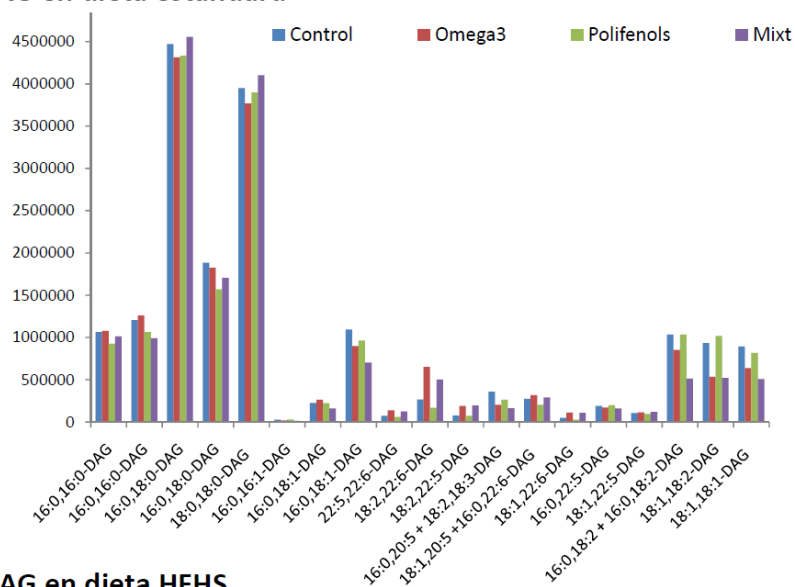
**Mecanismes d'acció implicats en el cúmul de TAG en fetge:** La figura representa les vies per les quals els AGPI omega-3 i els polifenols disminueixen els nivells de TAG en fetge. (SREBP1-c) *Sterol-regulatory-element-binding protein-1c*. (AMP cinasasa) *Protein-cinasa activada per adenosin monofosfat*. (PGC-1α) *Peroxisoma proliferator activated G-receptor coactivador-1α*. (TAG) *Triacilglicerols*. ( Esquema adaptat de Manar Aouar, 2010)

## 6.1 DAG

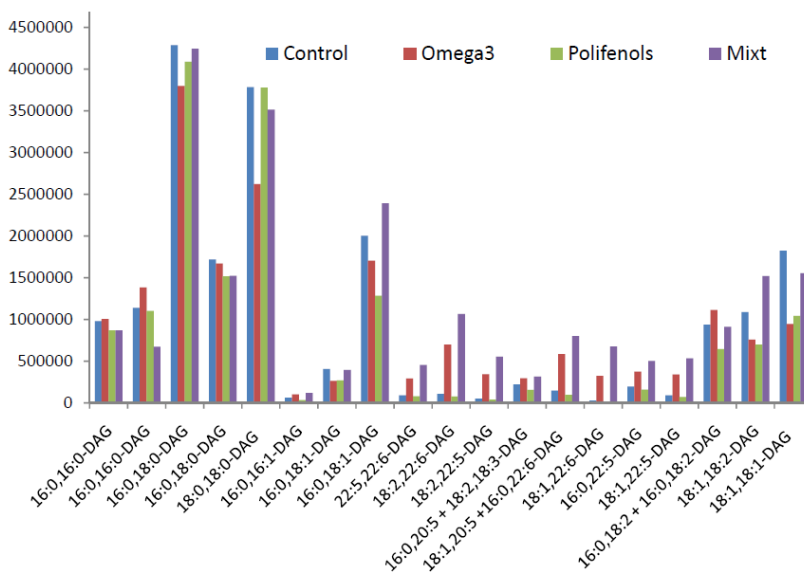
Pel que fa la composició de DAG presents al fetge, la figura 31 mostra una representació gràfica de les diferents espècies determinades en les dues dietes.

Figura 31. Contingut en DAG

## DAG en dieta estàndard



## DAG en dieta HFHS



- Comparant dietes, es poden observar diferents perfils lipídics de DAG, tant des del punt de vista quantitatiu com qualitatiu, sobretot en els DAG poliinsaturats (taula 16). El tractament amb el perfil més diferent va ser el perfil mixt, en què es van diferenciar significativament 13 espècies diferents. Els tractaments omega-3 i polifenols van presentar canvis significatius en 10 espècies de DAG i el tractament control en 8 espècies.
- En la taula 14, en la qual es comparen els tractaments en la dieta ESTD, s'observa que la majoria de canvis es donen entre DAG poliinsaturats. Només dos DAG de tipus saturat, 16:0,16:0-DAG i 16:0,18:0-DAG i un DAG monoinsaturat, 16:0,18:1-DAG, van mostrar canvis respecte algun dels altres tractaments ( $p < 0,05$  en tots els casos). En el grup de tractament ESTD-omega-3, totes les espècies de DAG amb diferències significatives van ser més elevades que en el grup ESTD-control a excepció del DAG 18:1;18:2 DAG que va ser més baix. En el grup de tractament ESTD-polifenols es van trobar valors significativament més baixos que el grup ESTD-omega-3 excepte en tres espècies concretes les tres poliinsaturades (18:2;22:6 DAG; 18:1;20:5 DAG i 18:1,22:5 DAG) en què els valors van ser més alts que els grups ESTD-control i ESTD-omega-3. Només va ser significativament més baixa que els grup ESTD-control l'espècie 16:0;18:0 DAG (II). Finalment el grup ESTD-mixt es va diferenciar principalment dels grups ESTD-control i ESTD-polifenols. L'única espècie significativament més baixa que el grup ESTD-omega-3 va ser

16:0,16:0 DAG. Pel que fa a les diferències amb el grup ESTD-control, la majoria va presentar valors més alts en el grup mixt, només dues espècies van donar valors més baixos. Respecte al grup ESTD-polifenols, també la majoria van ser valors més alts en el grup mixt a excepció de tres espècies amb valors més baixos.

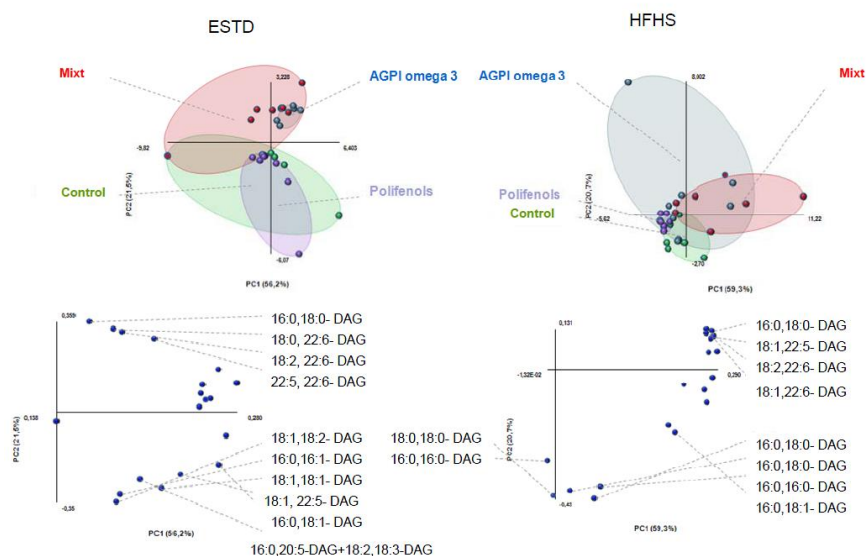
- En la dieta HFHS (taula 15), el nombre de diferències per part dels tractaments va ser més gran. Tres de les espècies que van presentar diferències en el grup de tractament HFHS-omega-3 van presentar valors més baixos que el grup de HFHS-control, les altres cinc espècies van ser significativament més elevades. També en el grup HFHS-polifenols totes les espècies que es va diferenciar del grup HFHS-control ho van fer amb valors més baixos i també van ser menors respecte al grup HFHS-omega-3 amb l'excepció del 18:0;18:0-DAG la qual va presentar valors més alts. Si ens fixem en els DAG diferents del grup HFHS-mixt, s'observa que tots són més alts que en la resta dels grups, excepte l'espècie 16:0;16:0 DAG que era menor en el grup mixt que en els altres tres.

Pel que fa la composició des DAG presents al fetge, l'anàlisi de component principal (figura 32) ens mostra com cada tractament va tenir uns components principals diferents. Tant en una dieta com en l'altra, els dos tractaments amb AGPI omega-3 van donar lloc a un perfil de DAG similar. Els dos grups de tractament que més es van diferenciar entre si van ser els tractaments polifenols i mixt. Aquesta diferència es veu més clara en la dieta HFHS, en la qual mentre que el tractament mixt va tenir



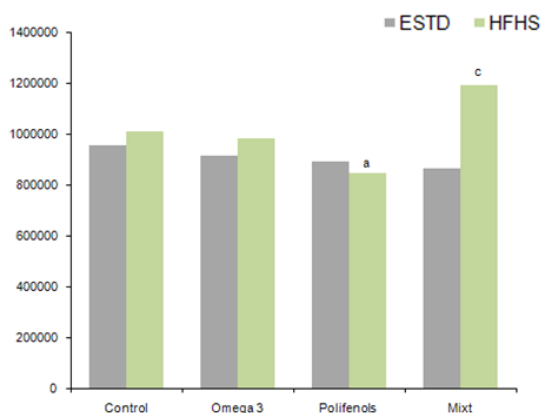
com a component principal DAG de tipus poliinsaturats en el tractament polifenols els DAG principals van ser de tipus saturat majoritàriament.

**Figura 32. DAG: Anàlisi de component principal**



**Anàlisi de component principal:** (DAG) Diacilglicerols. En el gràfic superior cada punt representa individu, els diferents tractaments estan diferenciats per colors. En correlació amb els gràfics superiors, en els gràfics inferiors cada punt representa una espècie lipídica. Aquestes espècies lipídiques són les que tenen més pes dintre de cada tractament i per tant separen els tractaments per component principal.

De manera conjunta, els nostres resultats van demostrar que en una dieta ESTD els nivells de DAG no es van veure afectats per cap dels tractaments; però en una dieta HFHS, els polifenols van disminuir els DAG respecte al control ( $p=0,002$ ) i respecte al tractament mixt ( $p=0,048$ ). (Figura 33.)

**Figura 33. DAG hepàtics totals**

**DAG hepàtics totals:** El gràfic representa la totalitat de (DAG) Diacilglicerols determinats en fetge en cada tractament. La determinació segons les àrees sota el pic és adimensional. (a) diferències estadísticament significatives respecte al tractament control (c) diferències estadísticament significatives respecte al tractament polifenols.

En aquest cas, l'efecte dels polifenols és el millor per prevenir el cúmul de DAG des del punt de vista hepàtic.

És interessant que el nombre més gran de diferències es doni en els DAG poliinsaturats, ja que això permet associar-los directament a la ingesta d'AGPI de la dieta.

Gordon Lee (2011) va demostrar que el cúmul de DAG al fetge és un bon biomarcador per determinar la progressió del fetge gras tant en animals com en éssers humans. Altres estudis també relacionen el cúmul hepàtic d'aquests mediadors lipídics amb la insulinoresistència (IR). (Jornayvaz & Shulman, 2012.) Per tant, sembla que el contingut de DAG des del punt de vista hepàtic és de gran rellevància en l'estudi de l'SM.

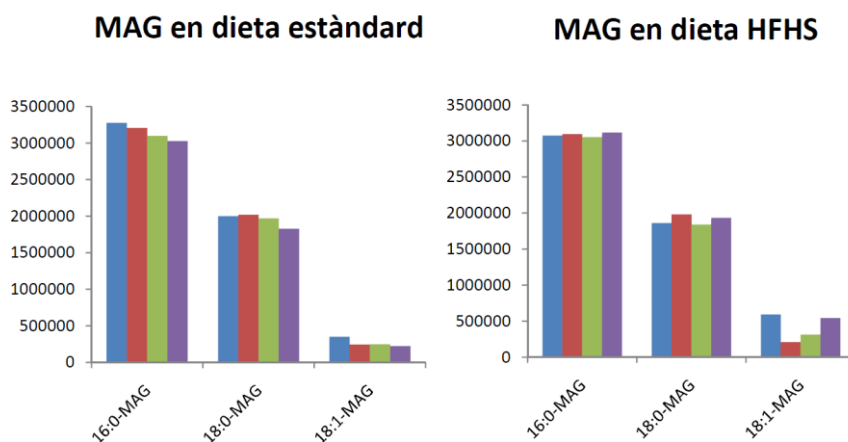
Tot i així, s'ha discutit el paper d'aquests mediadors lipídics com a biomarcadors, ja que depenent de la seva localització en la cèl·lula la

seva acció pot ser totalment diferent (Jornayvaz & Shulman, 2012; Samuel & Shulman, 2012), això podria explicar per què tot i saber el mecanisme d'acció d'aquestes espècies lipídiques en el metabolisme de la insulina per exemple, alguns estudis no han pogut correlacionar la seva presència amb la IR en alguns models animals (Cowart, 2009; Lamaziere [et al.], 2013).

## 6.2 MAG

Només tres espècies de MAG van ser determinades en aquest experiment. Els resultats es mostren a les taules 13, 14 i 15 i a la figura 34.

Figura 34. Contingut en MAG



- De les tres les espècies de MAG determinades, només el MAG monoinsaturat (18:1) va presentar diferències entre dietes, concretament en els tractaments polifenols i mixt (taula 16).

- Comparant tractaments en la dieta estàndard (taula 14), els tres grups de tractament van presentar valors de MAG 18:1 significativament més baixos que el grup ESTD control ( $p < 0,05$  en tots els casos).
- Si s'observen les diferències entre tractaments en la dieta HFHS (taula 15), es va veure que els omega-3 disminueixen el 18:1 MAG respecte als grups HFHS-polifenols i HFHS-mixt, i que els polifenols el disminueixen respecte al HFHS-control.

Tot i que els MAG són espècies lipídiques derivades dels TAG, pocs treballs han estudiat la importància fisiològica d'aquestes espècies amb relació a patologies com l'SM.

Ja el 1988 es va estudiar el paper dels MAG com a inhibidors de diferents enzims relacionats amb la biosíntesi i el metabolisme dels DAG (Coleman, 1988), i si aquests són considerats bons biomarcadors d'IR i d'SM, es podria esbrinar si alguns d'aquests enzims intervenen directament en la fisiopatologia de l'SM.

Estudis més recents recalquen la importància dels MAG independentment de la seva relació amb els DAG o amb els TAG. Per exemple, s'ha descrit que la inactivació de l'enzim hepàtic monoacilglicerol transferasa (MGAT), el qual es troba altament activat en models d'animals obesos, millora la tolerància a la glucosa i la senyalització hepàtica de la insulina independentment dels nivells intrahepàtics de DAG o TAG (Hall [*et al.*], 2014).

Els nostres resultats remarquen la importància de continuar investigant el paper d'aquestes espècies lipídiques, en especial del 18:1 MAG.

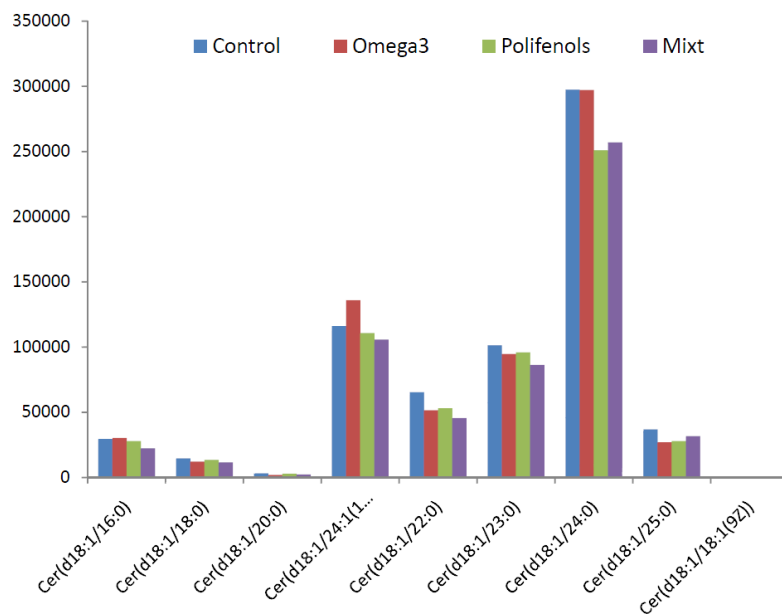
### 6.3 CERAMIDES

La composició de ceramides presents al fetge apareix resumida gràficament en la figura 35:

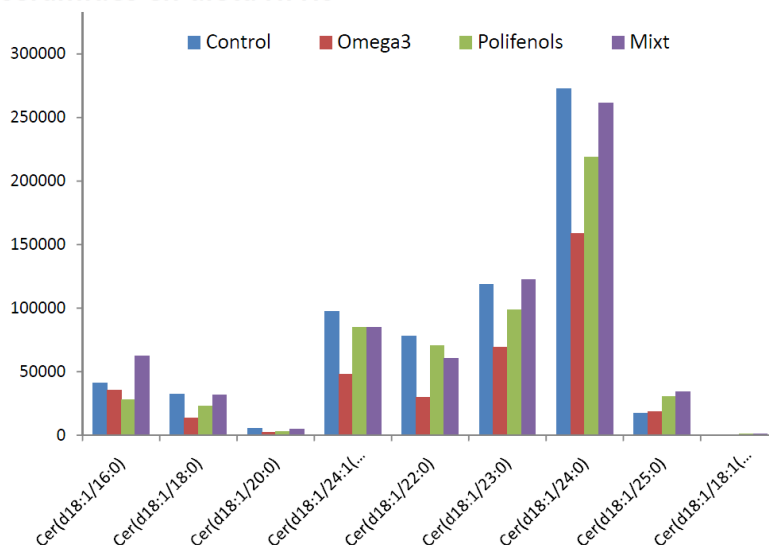
- Comparant dietes, es poden observar canvis en els perfils lipídics hepàtics de diverses ceramides. La taula 15 mostra com tant el grup control com la resta de grups de tractament van presentar canvis estadísticament significatius en diverses espècies de ceramides.
- En la dieta estàndard, la figura 35 i la taula 14 mostren que el grup de tractament ESTD-mixt va tenir el menor contingut de ceramides; ara bé no es van observar diferències significatives entre cap dels tractaments.
- En la dieta HFHS, la figura 35 i la taula 15 mostren que els omega-3 van disminuir els nivells de cinc espècies de les nou ceramides determinades respecte al grup HFHS-control. Els polifenols van augmentar els nivells de dues ceramides respecte al grup dels omega-3 i, finalment, el grup HFHS-Mixt va ser el que més canvis va presentar: de les nou espècies determinades, set espècies van donar nivells significativament més alts respecte a algun dels altres grups.

Figura 35. Contingut en ceramides

## Ceramides en dieta estàndard

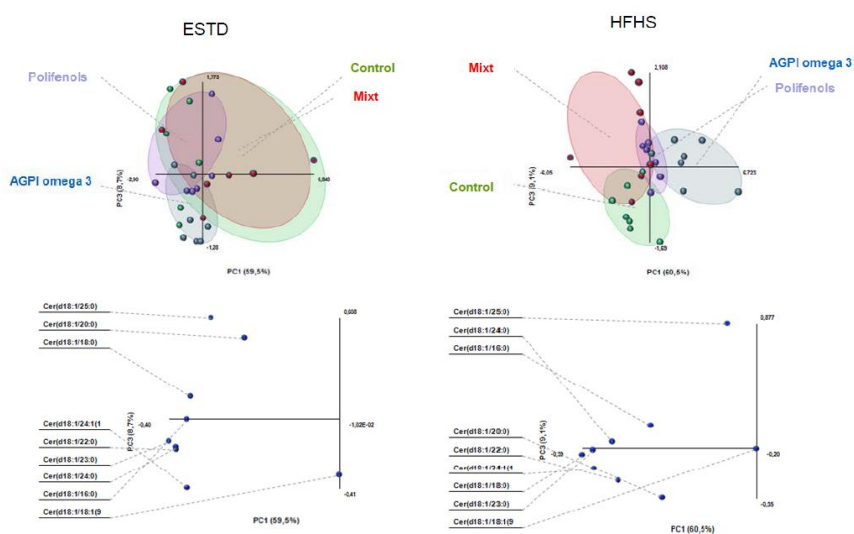


## Ceramides en dieta HFHS



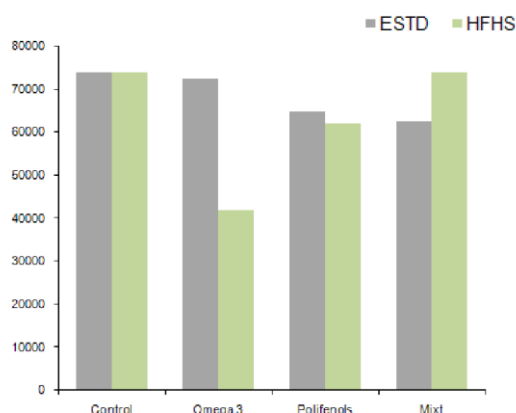
En l'anàlisi de component principal (figura 36) podem observar que hi va haver una àmplia variació entre individus en les dues dietes. Tot i així, els diferents tractaments en la dieta HFHS defineixen millor un determinat perfil quant a la composició hepàtica de ceramides, ja que cada tractament estava diferenciat per un component principal diferent, fet que no es va observar en la dieta ESTD.

**Figura 36. Ceramides: Anàlisi de component principal**



**Anàlisi de component principal:** En el gràfic superior cada punt representa individu, els diferents tractaments estan diferenciat per colors. En correlació amb els gràfics superiors, en els gràfics inferiors cada punt representa una espècie lipídica. Aquestes espècies lipídiques són les que tenen més pes dintre de cada tractament i per tant separen els tractaments per component principal.

La figura 37 representa la suma de totes les espècies de ceramides trobades al fetge.

**Figura 37. Ceramides hepàtiques totals**

**Ceramides hepàtiques totals:** El gràfic representa la totalitat de ceramides determinades en fetge en cada tractament. La determinació segons les àrees sota el pic és adimensional.

- Comparant dietes no es van trobar diferències estadísticament significatives; tot i que els omega-3 amb una dieta hipercalòrica van disminuir les ceramides totals respecte una dieta estàndard amb omega-3. Entre tractaments, en la dieta ESTD, es va observar una lleugera disminució del contingut total de ceramides en els tres tractaments respecte al control, sense diferències.
- Comparant tractaments amb dieta HFHS, els omega-3 i els polifenols van disminuir el contingut total de ceramides respecte als grups HFHS-control i HFHS-mixt, sense diferències significatives.

Ara bé, en el cas de les ceramides resulta interessant analitzar les espècies una a una, ja que la bibliografia recent relaciona la llargada de la seva cadena amb l'IR i l'SM. Les ceramides de cadena llarga (cer 18-20) estan relacionades amb un agreujament de la resistència a la insulina en fetge i amb les malalties cardiovasculars; mentre que les ceramides de



cadena molt llarga (cer 20-25) estan relacionades amb un efecte protector davant d'aquests dos trets de l'SM (Hage Hassan, Bourron, & Hajduch, 2014; Turpin [*et al.*], 2014).

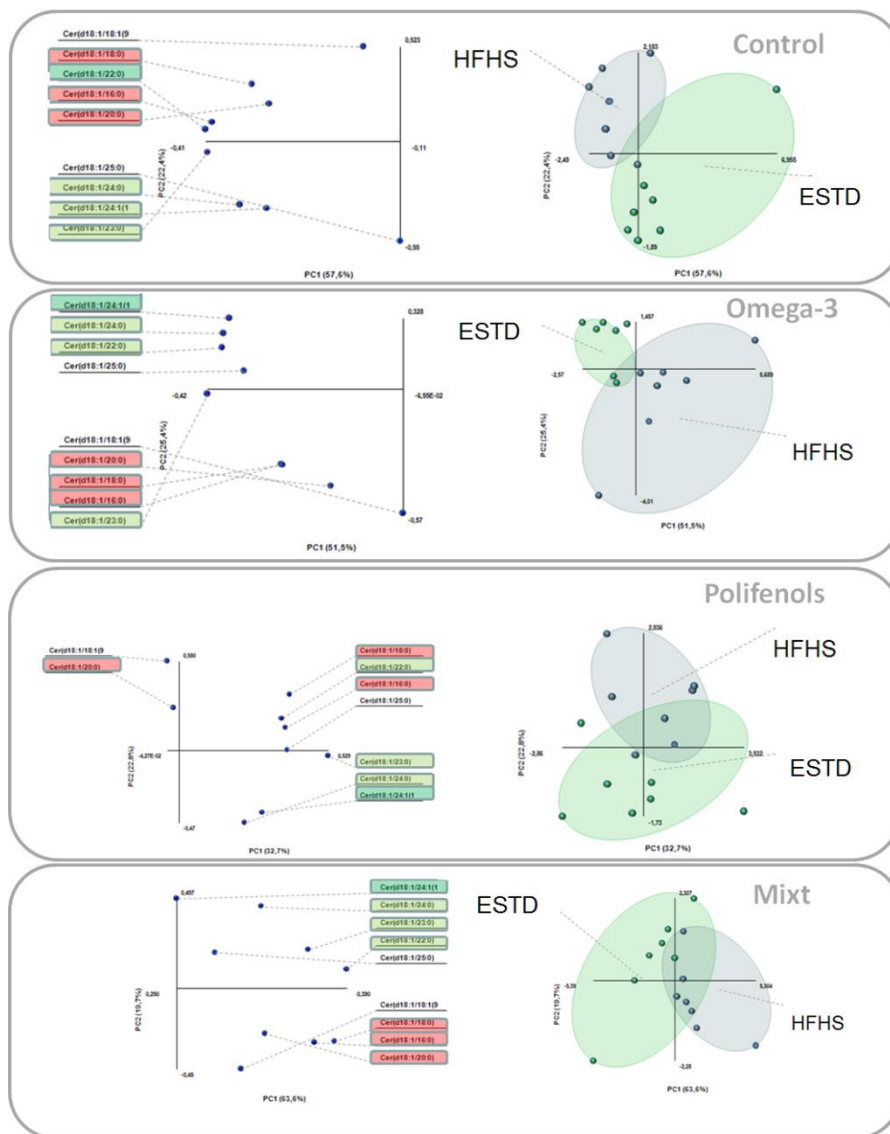
L'anàlisi de component principal en cada un dels tractaments (figura 38) ens permet veure quin pes tenen aquestes espècies de ceramides en cada tractament en les dues dietes.

S'observa que, en general, la dieta HFHS engloba les ceramides de cadena llarga/agreujants (marcades en vermell) i la dieta ESTD agrupa les ceramides de cadena molt llarga/protectores (marcades en verd).

Aquest patró general es va comprovar en tots els grups de tractament. Sorprenentment, tots els tractaments control, omega-3 i polifenols en la dieta HFHS contenen la majoria de ceramides agreujants i alguna de protectora; però en el tractament HFHS-Mixt aquesta petita aportació de les ceramides protectores desapareix.

Això fa pensar que, tot i que puguem haver vist efectes protectors de la barreja polifenols i AGPI omega-3 des del punt de vista bioquímic, en un nivell més intern pot ser és un indicador dels efectes d'aquests biocomponents a llarg termini, per això calen més estudis a llarg termini per poder assegurar l'efecte sobre l'SM tant dels omega-3 com dels polifenols en una dieta HFHS.

**Figura 38. Ceramides: Anàlisi de component principal per tractaments**



## 7. ESTUDI HISTOPATOLÒGIC

### 7.1 AORTA

Els resultats de les variables quantitatives analitzades en l'aorta apareixen reflectits en la taula 17.

**TAULA 17. VARIABLES QUANTITATIVES ANALITZADES EN AORTA**

DIETA	VARIABLE	Tractament								p total
		Control		Omega3		Polifenols		Mixt		
		Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE	Mitjana	DE	
<b>ESTD</b>										
	Gruix de la paret (µm)	96,4 ± 23		103,1 ± 17		110,8 ± 38		98,9 ± 11		0,458
	Perímetre de l'aorta (mm)	3,1 ± 1		3,1 ± 1		3,1 ± 1		3,3 ± 1		0,775
	Àrea de la llum (mm <sup>2</sup> )	490,8 ± 394		605,4 ± 355		507,1 ± 202		515,5 ± 253		0,968
<b>HFHS</b>										
	Gruix de la paret (µm)	121,9 ± 25		101,5 ± 16		108,2 ± 13		101,5 ± 19		0,963
	Perímetre de l'aorta (mm)	2,7 ± 1		2,9 ± 1		3,3 ± 1		3,2 ± 1		0,849
	Àrea de la llum (mm <sup>2</sup> )	562,1 ± 420		382,5 ± 184		594,6 ± 291		697,6 ± 385		0,285
<b>ESTD-HFHS</b>										
		p		p		p		p		
	Gruix de la paret	0,577		0,442		0,124		0,506		
	Perímetre de l'aorta	0,951		0,721		0,745		0,858		
	Àrea de la llum	0,655		0,946		0,423		0,397		

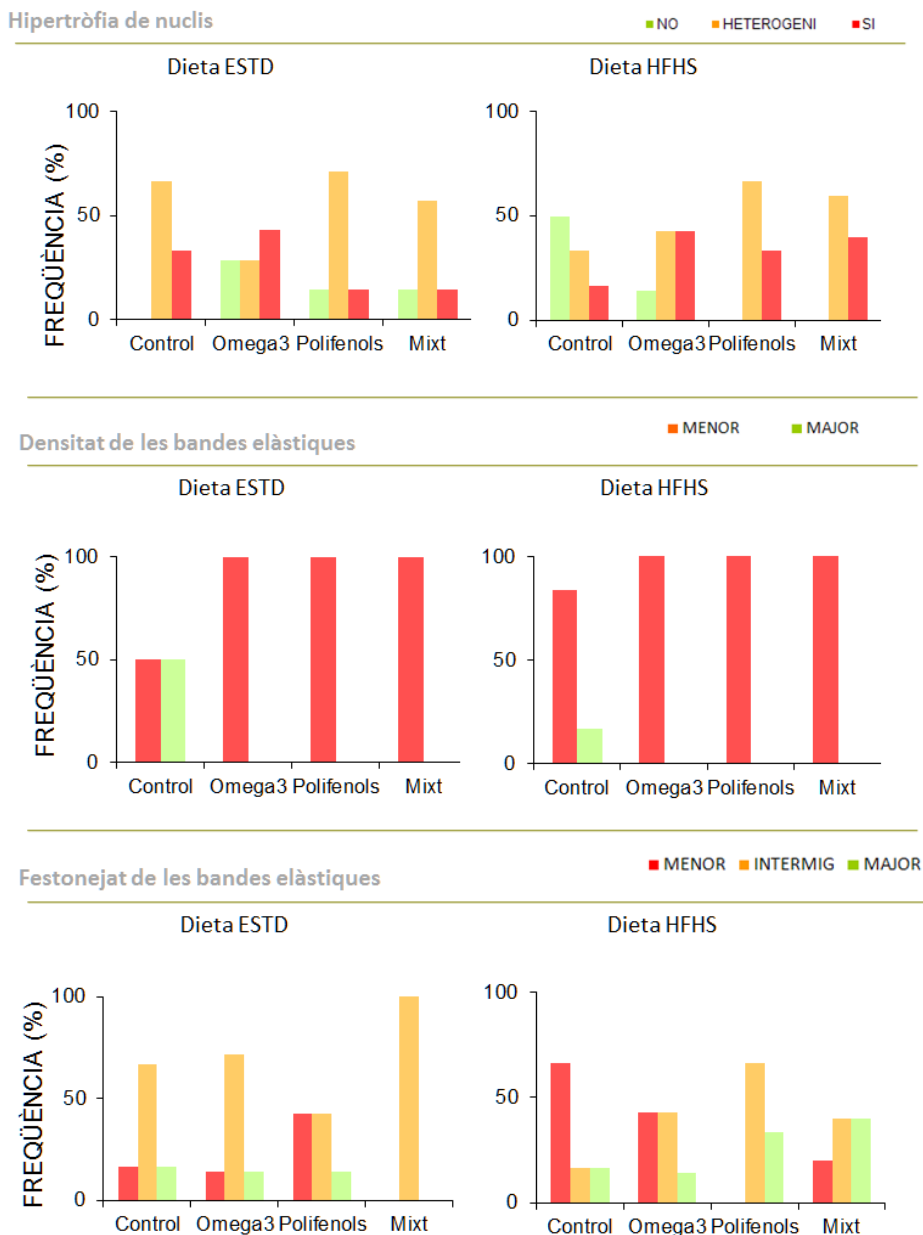
Variables quantitatives analitzades en aorta: Els resultats s'expressen en mitjanes ± (DE) desviació estàndard.

- No es van trobar diferències entre dietes en cap de les variables estudiades (gruix de les parets, perímetre del vas i area de la llum).
- Tampoc es van observar en comparar tractaments.

En referència al gruix de les parets, tot i no observar diferències entre dietes ni entre tractaments, es pot intuir un possible paper protector dels tres tractaments, ja que mentre que el grup HFHS control va augmentar els valors de gruix amb relació al grup ESTD control, la resta de tractaments van mantenir valors similars. El fet que no s'observessin diferències significatives ni entre els perímetres ni entre les llums de les aortes, és un indicador que les mostres d'aorta van ser extretes de la mateixa zona i que, per tant, els possibles efectes en la resta de paràmetres estudiats poden ser atribuïts a la dieta o als tractaments i no pas a la localització del teixit.

Els resultats de les variables categòriques es resumeixen en la figura 39, en la qual se segueix una escala de color tipus semàfor en què el color verd indica millor estat, seguit del taronja, que indica estat entremig, i del vermell, que indica el pitjor estat. Aquests resultats s'expressen en freqüències, és a dir, percentatge d'animals que van presentar la variable.

**Figura 39. VARIABLES CATEGÒRIQUES ANALITZADES EN AORTA**



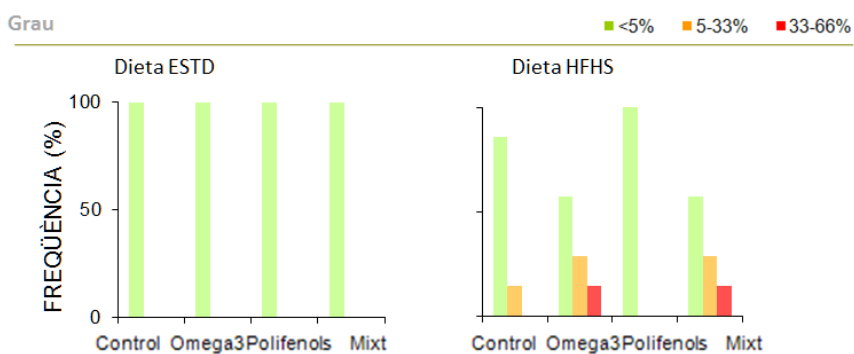
**Variabls categòriques analitzades en aorta:** El s resultats s'expressen en freqüències, és a dir, en el percentatge d'animals que van presentar la variable categòrica.

- Comparant dietes, les variables hipertròfia de nuclis i densitat es van veure augmentades en la dieta HFHS, però aquests augments no van presentar diferències estadísticament significatives. Pel que fa al festonejat de les elàstiques, és a dir, a la funcionalitat, va ser una mica superior en la dieta HFHS que no pas en la dieta ESTD, tot i que tampoc no es van observar diferències.
- Entre tractaments, tant en la dieta ESTD com en la dieta HFHS, les diferents variables no van donar lloc a diferències estadísticament significatives.

## 7.2 FETGE

De la histologia del fetge es van obtenir dades del grau d'esteatosi (figura 40) i de la seva localització (taula 18). En els dos casos els resultats estan expressats en percentatge d'animals.

Figura 40. ESTEATOSI



**Esteatosi:** Els resultats s'expressen en freqüències, és a dir, en el percentatge d'animals que van presentar la variable categòrica esteatosi.

**Taula 18. LOCALITZACIÓ DE L'ESTEATOSI**

DIETA	VARIABLE	Tractament			
		Control	Omega3	Polifenols	Mixt
ESTD	<b>Localització no zonal (%)</b>	0	0	0	0
HFHS	<b>Localització no zonal (%)</b>	14	57	0	14

**Localització de l'estetos:** Els resultats s'expressen en freqüències, és a dir, percentatge d'animals que van presentar la variable categòrica localització no zonal

Pel que fa a l'esteatosi:

- Comparant dietes es va observar esteatosi hepàtica en les rates alimentades amb la dieta HFHS, sobretot en els grups de tractament suplementat amb AGPI omega-3, és a dir, HFHS-omega-3 i HFHS-mixt. Tot i així, no es van veure diferències estadísticament significatives.
- Tampoc van aparèixer diferències entre tractaments en cap de les dues dietes.

Amb relació a la localització de l'esteatosi:

- Si comparem els dos grups de tractament suplementats amb AGPI omega-3,(HFHS-omega-3 i HFHS-mixt) veiem com el tractament HFHS-mixt, tot i presentar el mateix grau d'esteatosi va donar lloc a una distribució no zonal menor que el grup HFHS-omega-3.

Shin [et al.] (2010) van demostrar que els polifenols presents en les llavors de raïm, entre ells les procianidines, tenen un efecte hepatoprotector amb efectes antiinflamatoris, antifibròtics i antioxidants (Shin [et al.], 2010).

Segons els nostres resultats, també sembla que els polifenols tenen un efecte protector davant del cúmul de greix al fetge perquè el 100% dels animals alimentats amb HFHS-polifenols van presentar el menor grau d'esteatosi (figura 40) i una localització d'aquesta menys perjudicial (taula 18). La localització no zonal de l'esteatosi és un indicador negatiu de l'estat del fetge. En general l'esteatosi comença amb una distribució o localització periportal, que s'estén a localització de tipus centrolobulillar i acaba en una distribució o localització no zonal.

En cap dels tractaments es van observar cèl·lules blanques (inflamació), fet que resulta estrany si l'esteatosi es troba ja amb una distribució no zonal. Aquest fet es podria explicar per l'acció tant dels AGPI omega-3 com de les procianidines sobre la inflamació, ja que ambdós inhibeixen l'activitat de les ciclooxigenases i disminueixen l'activació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B (Martinez-Micaelo [et al.], 2012). De fet, els resultats dels marcadors d'inflamació analitzats al fetge (taula 13), mostraven com tots els tractaments disminuïen els marcadors d'inflamació en dieta ESTD i com el TNFa també estava disminuït en la dieta HFHS pels tractaments HFHS-omega-3 i HFHS-mixt.

### 7.3 RONYÓ

Les mostres de ronyó no es van veure afectades en cap dels nivells analitzats.



## 7.4 TEIXIT ADIPÓS

Els resultats dels paràmetres estudiats en el teixit adipós apareixen reflectits en la taula 19 i la figura 41.

DIETA	VARIABLE	Tractament			
		Control	Omega3	Polifenols	Mixt
ESTD	Mida variable (%)	28	33	14	43
	Presència Macrofags(%)	14	17	14	29
	Presència Mastòcits (%)	29	0	0	0
HFHS	Mida variable (%)	0	14	29	29
	Presència Macrofags(%)	86	57	71	57
	Presència Mastòcits (%)	0	29	0	0

Teixit adipós: Els resultats s'expressen en freqüències, és a dir, percentatge d'animals que van presentar la variable categòrica.

No es van observar diferències significatives en cap de les variables estudiades, ni entre dietes ni entre tractaments. De totes maneres, sí que es van observar canvis depenent de la dieta i del tractament seguit:

### 7.4.1. Mida variable

- Comparant dietes el percentatge d'animals que va presentar mida variable en els adipòcits va ser més alt en rates alimentades amb dieta ESTD que no pas amb dieta HFHS.
- Entre tractaments en la dieta ESTD es va observar més variabilitat en els grups omega-3 i mixt.
- Entre tractaments en la dieta HFHS hi va haver més variabilitat en el cas dels dos grups que incorporaven polifenols (HFHS-polifenols i HFHS-mixt).
- 

### 7.4.2. Macròfags

- Comparant dietes el percentatge d'animals que va presentar macròfags en els adipòcits va ser més alt en rates alimentades amb dieta HFHS que no pas amb dieta ESTD.
- En els grups amb dieta ESTD hi va haver més presència de macròfags en el tractament ESTD-mixt. En els grups amb dieta HFHS la presència més gran de macròfags es va donar en el grup HFHS-control.

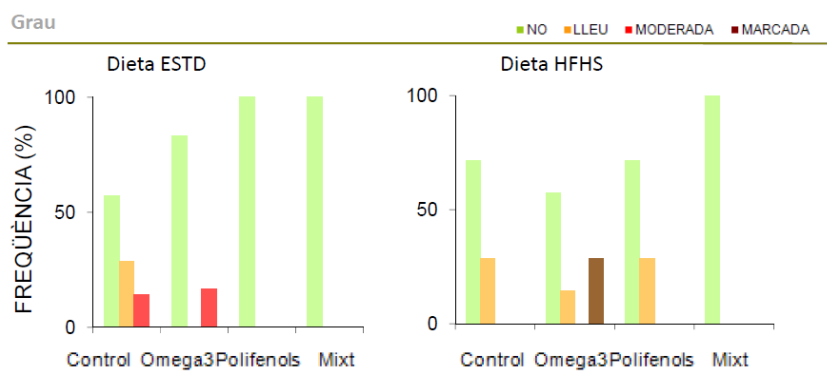
#### **7.4.3. Mastòcits**

- Comparant dietes el percentatge d'animals que va presentar mastòcits en els adipòcits va ser similar.
- Entre tractaments en la dieta ESTD, l'únic tractament que va presentar mastòcits va ser el tractament ESTD-control.
- Entre tractaments en la dieta HFHS, l'únic tractament que va presentar mastòcits va ser el tractament HFHS-omega-3.

#### **7.4.4. Inflamació**

Com que té més categories que la resta de variables, la inflamació del teixit adipós es presenta a la figura 41.

Figura 41. INFLAMACIÓ TEIXIT ADIPÓS



**Inflamació del teixit adipós:** Els resultats s'expressen en freqüències, és a dir, en el percentatge d'animals que van presentar la variable categòrica.

- Comparant dietes, la dieta que va presentar més percentatge d'inflamació en general va ser la dieta HFHS.
- Entre tractaments en la dieta ESTD, els dos tractaments que no presentaven inflamació van ser els que incloïen polifenols (ESTD-polifenols i ESTD-mixt).

L'únic tractament que no va mostrar inflamació va ser el tractament HFHS-mixt en el grup amb dieta hipercalòrica.

## 7.5 VALORACIÓ GLOBAL

Els resultats de l'anatomia patològica no mostren alteracions descrites en l'entitat de l'SM, com poden ser densitat de les parets aòrtiques disminuïdes, fetge gras, disfunció del teixit adipós o alteracions renals com la hipertròfia glomerular. S'ha de tenir en compte que les alteracions descrites en l'SM solen tenir lloc en processos avançats del

quadre clínic. En els nostre cas, no estem davant d'una afectació clara d'SM sinó en un estat previ i, en aquest sentit, els paràmetres d'histopatologia estudiats reforcen aquesta idea.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015



*Discussió global*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

## BIBLIOGRAFIA

L'estudi dels diferents bicomponents de la dieta que poden actuar, tant des del punt de vista preventiu com d'intervenció nutricional, sobre l'entitat clínica coneguda com SM és essencial. Així doncs, **l'objectiu principal d'aquest treball és avaluar l'efecte de l'enriquiment amb els biocomponents AGPI omega-3 i polifenols en rates alimentades amb una dieta rica en greixos i sucres.**

La font d'obtenció d'aquests dos bicomponents ha estat d'origen marí en el cas dels AGPI omega-3 (EPA i DHA) i provinents de les llavors del raïm en el cas dels polifenols (proantocianidines). Els dos s'han estudiat de manera individual i de manera conjunta en una dieta equilibrada (dieta ESTD) i en una dieta amb elevat contingut de greix i de sucre (dieta HFHS), per poder discernir les accions individuals i les accions conjuntes, tant pel que fa a prevenció com millora dels paràmetres relacionats amb l'SM.

El model animal escollit va ser la rata Wistar Kyoto, un model sa, que va ser alimentat amb una dieta HFHS, com a possible mecanisme per induir l'SM. La via d'administració dels biocomponents estudiants d'elecció va ser la via oral amb consum de pinso enriquit.

Existeixen diferents models animals per a l'estudi de l'SM. Els animals modificats genèticament, concretament amb vies de la leptina no funcionals, són apropiats per a l'estudi de l'SM, ja que la patologia desenvolupada per aquests animals és bastant similar al que passa en els éssers humans, sobretot quan la hipertensió arterial hi està implicada. No obstant això, la resistència a la leptina en éssers humans poques vegades és a causa d'una mutació del gen. Aquesta diferència podria



limitar el valor d'aquests models. També cal remarcar que en els models animals modificats genèticament, a diferència dels éssers humans, la resistència a la leptina és irreversible. Així doncs, els models d'SM induïda per una dieta alta en greixos són més representatius de la patogènesi de la síndrome humana (Fellmann, Nascimento, Tibiriça, & Bousquet, 2013).

Segons la metanàlisi duta a terme per Lorente-Cebrian [*et al.*] (2013), l'efecte dels omega-3 sobre l'obesitat, l'SM i les malalties cardiovasculars, depèn del disseny experimental realitzat. Així, una de les limitacions dels estudis relacionats amb omega-3 i la seva implicació a l'SM són les marcades diferències en els dissenys experimentals; tant pel que fa a la durada, com al tipus d'intervenció, característiques de la població d'estudi, dosis administrades com la inclusió o no de variables importants com l'exercici físic o la ingesta energètica total (Lorente-Cebrián [*et al.*], 2013).

En aquest sentit, el nostre disseny experimental és un dels punts forts d'aquest treball. Pel que fa a la durada, la inducció per mitjà de la dieta de l'SM en models animals varia de 2 a 18 setmanes (Aydin [*et al.*], 2014). En el nostre experiment la durada de la intervenció es va allargar fins a les 25 setmanes.

La quantitat d'AGPI omega-3 administrats es va calcular en funció de les recomanacions establertes per l'EFSA: 250 mg d'omega-3/dia per a éssers humans. En aquest experiment es van administrar 72 vegades les dosis recomanades, ja que la ingesta de greixos requerida per induir anomalies metabòliques és més gran en els rosegadors que en els

éssers humans, perquè els rosegadors són menys sensibles al desenvolupament de trastorns metabòlics (Fellmann [et al.], 2013).

La proporció entre la quantitat d'EPA i DHA en el suplement va ser la 1:1. Segons els estudis previs del nostre grup, aquesta proporció és la més adient amb relació a la millora dels marcadors de risc cardiovascular, estrès oxidatiu i alteracions histològiques en l'SM (Lluís [et al.], 2013; Molinar-toribio [et al.], 2015; Taltavull [et al.], 2014).

Finalment, les procianidines s'han classificat com els composts fenòlics amb una biodisponibilitat més gran (Fraga & Oteiza, 2011). Alguns estudis d'intervenció en models animals reforcen l'administració de dosis de procianidines entre 25-50 mg/kg/dia per demostrar el seu efecte sobre alteracions metabòliques (Caimari [et al.], 2012; Montagut [et al.], 2010). D'altra banda, estudis de cohorts realitzats en éssers humans demostren com fins i tot quantitats relativament petites d'aliments rics en procianidines poden ser beneficioses per disminuir el risc per desenvolupar malalties cardiovasculars i disminuir la mortalitat. En aquest estudi es va considerar la dosi 13 mg/kg /dia.

**El nostre primer objectiu secundari va ser definir l'entitat SM en les rates intervingudes.** Com s'ha vist en l'apartat de resultats, aquesta inducció amb la dieta rica en greixos i sucres ha donat lloc a un estadi primerenc de l'SM (figura 26), ja que, tot i la durada de l'estudi de 25 setmanes, vam poder observar pocs canvis en els criteris de definició de l'SM. Existeixen pocs estudis sobre els primers nivells d'SM, però s'han descrit riscos i comorbiditats associades que reforcen la necessitat d'estudiar el quadre clínic en aquests estadis previs. Per exemple, Park

[*et al.*] (2015) va associar l'SM amb l'aterosclerosi subclínica i amb l'alt risc d'esdeveniments cardíacs. Un altre exemple recent és l'estudi de Hasemipour (2015), en el qual es relaciona la insulinoresistència amb l'SM, encara que els individus presentin pes normal (Hashemipour [*et al.*], 2015). Aquestes troballes suggereixen la importància de reduir les condicions metabòliques desfavorables en individus asimptomàtics.

L'anàlisi dels diferents paràmetres establerts en el diagnòstic de l'SM va permetre observar que el tractament mixt d'AGPI omega-3 i polifenols després de la ingesta continuada d'una dieta HFHS, dóna una afectació inferior d'aquesta entitat clínica, ja que aquest tractament només va presentar la disminució del colesterol HDL com a paràmetre negatiu. La resta de tractaments (AGPI omega-3, polifenol i control) donaven tres paràmetres alterats negativament, com a mínim.

Els nostres resultats també van permetre observar com aquest tractament mixt augmentava la sacietat, aportava més capacitat antioxidant total en el plasma, evitava l'augment de pes i el cúmul de greix, disminuïa els TG plasmàtics, proporcionava millors valors de la ràtio TG/HDL i disminuïa la glicosilació de l'Hb, comparat amb la resta de pinsos.

**El segon i tercer objectiu secundaris feien referència a l'estrès oxidatiu i la relació amb l'SM,** d'una banda, mesurar els diferents biomarcadors d'estrès oxidatiu relacionats amb l'SM i, d'altra banda, relacionar l'SM i l'estrès oxidatiu amb els biocomponents afegits a les dietes.

Existeix una relació directa entre la capacitat antioxidant ingerida amb la dieta i la capacitat antioxidant plasmàtica total (Georgoulis [*et al.*], 2015;

Narmaki [et al.], 2015). De fet, la modificació de l'estil de vida per pal·liar els factors de risc associats a l'SM és la primera línia terapèutica pels pacients que no es troben en elevat risc de patir alguna malaltia cardiovascular (Lopez-Huertas, 2012). El nostre experiment va mostrar que l'addició de compostos augmentava la capacitat antioxidant total (expressada en valors d'ORAC) en la dieta; però aquest increment no es va reflectir en els biomarcadors clàssics d'estrès oxidatiu ni a la sang ni al fetge. Cal recalcar la gran capacitat homeostàtica de l'organisme, en el sentit que, perquè s'arribi a un estat d'estrès oxidatiu, aquesta capacitat ha d'haver estat sobrepassada durant molt de temps (B. Halliwell, 2007).

Ara bé, els valors d'ORAC estaven incrementats en alguns grups, cosa que reforça la idea que aquest mètode és vàlid perquè dóna una idea general de l'efecte antioxidant dels tractaments. En la dieta HFHS, l'ORAC en el tractament mixt va augmentar la capacitat antioxidant total mentre que el tractament omega-3 la va disminuir; per tant, afegir polifenols evita la disminució produïda pels omega-3. La disminució de l'ORAC per part dels AGPI omega-3 podria estar donada per la seva tendència a la peroxidació (Lluís [et al.], 2013; Venarucci [et al.], 1999), la qual dóna lloc a l'augment d'espècies reactives de l'oxigen. Aquesta disminució de la capacitat antioxidant total s'observa en la dieta HFHS. Per tant, el paper dels omega-3 com a protectors en una dieta estàndard no es descarta. Ara bé, segons aquest treball, el seu paper com a pal·liants de l'EO després del seguiment d'una dieta amb elevat contingut de greix i sucre és qüestionable.

**Definir el perfil lipídic hepàtic era el nostre quart objectiu.** El fetge gras no alcohòlic (NAFLD) s'ha considerat una manifestació hepàtica de l'SM

(Cahova [et al.], 2012). De fet, s'ha vist que la prevalença de NAFLD augmenta de 10-80% en individus obesos, 26-58% en individus amb dislipèmia, de 35-90% en individus amb diabetis mellitus tipus 2 i de 30-56% en individus amb hipertensió (Tarantino, 2014).

En el nostre experiment, els fetges no van mostrar afectació des del punt de vista histopatològic; és a dir, els fetges de les rates alimentades amb dieta HFHS no es podien classificar com a fetges grassos; però en determinar la composició lipídica hepàtica vam poder observar com tant les diferents dietes com els diferents tractaments en cada dieta donaven lloc a perfils lipídics hepàtics diferents.

Darrerament, s'ha donat gran importància als mediadors lipídics al fetge per la relació que tenen amb la insulinoresistència hepàtica i amb les malalties cardiovasculars (Hage Hassan [et al.], 2014; Samuel & Shulman, 2012). Relacionant-los, per tant, amb altres alteracions metabòliques desencadenades com l'SM. Els mediadors lipídics més estudiats són els diacilglicerols (DAG) i les ceramides. Tant uns com les altres poden actuar sobre diferents vies relacionades amb la insulinoresistència al fetge (Jornayvaz & Shulman, 2012).

La identificació i la validació de biomarcadors lipídics pot ser útil en la pràctica clínica per millorar la quantificació del risc de malaltia i la identificació primerenca de la síndrome (Meikle & Christopher, 2011). Tenint en compte que l'estudi s'ha realitzat en estadis primerencs de l'SM, en aquest treball plantegem la determinació de DAG i CER com a biomarcadors primerencs d'insulinoresistència des del punt de vista hepàtic, els quals poden tenir rellevància clínica. D'una banda, perquè

hem demostrat com el tractament mixt que millora l'SM primerenca també millora els nivells d'aquests biomarcadors en una dieta estàndard. D'altra banda, per la possibilitat d'una determinació clínica senzilla: un estudi recent conclou que fins al 60% dels canvis en la composició lipídica del fetge poden ser monitorats mitjançant una anàlisi de sèrum, entre les quals els de les ceramides (Eisinger [et al.], 2014).

Finalment, com a cinquè objectiu ens vam proposar **relacionar les diferents espècies lipídiques determinades amb l'entitat SM.**

Com hem comentat al llarg del treball, la fisiopatologia d'SM s'explica per mitjà d'una sèrie d'afectacions encadenades entre si. Aquest primer graó és l'augment del greix. A mesura que el greix va substituint la glucosa com a substrat energètic en els teixits, el pàncrees respon augmentant la secreció d'insulina, la qual acabarà donant lloc a una glucosa basal i postprandial alterada i a un estadi d'hipertensió arterial.

Però l'evidència indica que algunes vegades, tot i la sensibilitat de les cèl·lules Beta pancreàtiques, la glucèmia postprandial i basal poden aguantar inalterades fins i tot anys (Hamaguchi [et al.], 2012; Tarantino, 2014). Per aquest motiu, Tarantino i Finelli (2014) proposen modificar els criteris diagnòstics de l'SM, canviant el criteri de glucosa basal alterada per fetge gras no alcohòlic o algun altre paràmetre que defineixi millor la resistència a la insulina. Els nostres resultats reforcen aquesta hipòtesi, de manera que les espècies lipídiques determinades al fetge poden ser un bon indicador de l'inici i progrés de l'SM.

Tot i que l'estudi ha estat adequat, també presenta una sèrie de **limitacions** que caldrà tenir en compte en futurs estudis:

Com a primera limitació cal comentar la durada de l'experiment. Tot i ser un temps força llarg, 25 setmanes, no ha estat suficient per aconseguir la inducció de l'SM en rates sanes, en el sentit que ha induït un estadi previ de l'entitat clínica.

També hem considerat una limitació la producció pròpia dels pinsos en el laboratori. En introduir un contingut de greix, els pelets resultants van ser de consistència tova. Tenint en compte la natura rosegadora del model animal, potser el pinso administrat no tenia la textura adequada per afavorir un consum elevat. Per tant, caldria estudiar i millorar el procés d'elaboració de cara a futurs estudis per acabar induint prou alteracions metabòliques a les rates i així estudiar l'SM induïda per la dieta.

Finalment cal recalcar que, tot i que els models murins serveixin per a l'estudi de la majoria d'alteracions metabòliques degudes al consum de dietes amb elevat contingut de greix i sucre, hi ha estudis científics que remarquen la gran diferència amb relació al metabolisme del colesterol entre models murins i humans (Santos-Gallego, Badimon, & Ibáñez, 2013). Davant d'aquestes evidències, cal plantejar-se si els rosegadors són els millors models per a l'estudi del perfil lipídic, concretament pel que fa als diferents tipus de colesterol (Santos-Gallego [et al.], 2013).



## *Conclusions*





UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

## BIBLIOGRAFIA

1. La ingesta de 57 kcal/dia d'una dieta HFHS durant 25 setmanes indueix un estadi primerenc d'SM en rates Wistar Kyoto.
2. En un estadi primerenc d'SM el tractament mixt d'AGPI omega-3 i polifenols dóna lloc a una menor afectació d'aquesta entitat clínica.
3. En un estadi primerenc d'SM, el tractament mixt d'AGPI omega-3 i polifenols augmenta la sacietat, disposa de més capacitat antioxidant total, evita l'augment de pes i el cúmul de greix, disminueix els TG plasmàtics, proporciona millors valors de la ràtio TG/HDL i disminueix la glicosilació de l'hemoglobina, en comparació amb els altres tractaments.
4. En un estadi primerenc d'SM, el tractament amb AGPI omega-3 disminueix els nivells de colesterol total i de colesterol LDL i evita la insulinoresistència provocada per la dieta HFHS estàndard.
5. En un estadi primerenc d'SM el tractament polifenols millora la pressió sistòlica, disminueix els nivells de colesterol total i colesterol LDL.
6. L'estadi primerenc de l'SM no afecta els biomarcadors clàssics d'estrès oxidatiu: SOD, CAT, i GR ni a la sang ni al fetge. Al fetge tampoc s'afecta el sistema glutatió; però sí que augmenta l'enzim Gpx eritrocitari independentment del tractament seguit.
7. La ingesta d'AGPI omega-3 en una dieta HFHS disminueix la capacitat antioxidant total del plasma i la ingesta del tractament mixt la normalitza. En rates HFHS el tractament mixt proporciona valors de capacitat antioxidant total més elevats.
8. L'estadi primerenc de l'SM no afecta els biomarcadors hepàtics d'inflamació: PCR, TNF $\alpha$  i ICAM-1. Els tractaments mixt i omega-3

milloren els valors del marcador  $\text{TNF}\alpha$  en els dos tipus de dieta amb relació als grups control.

9. Una SM primerenca no provoca les següents alteracions histopatològiques: esteatosi i inflamació hepàtica, funcionalitat de l'aorta, morfologia i inflamació del teixit adipós i morfologia i inflamació renal.
10. La ingesta de 57 kcal/dia d'una dieta HFHS durant 25 setmanes fa variar el perfil lipídic hepàtic. Aquest perfil també varia en funció del tractament seguit.
11. Les ceramides i els DAG són biomarcadors primerencs d'insulinorresistència hepàtica.
12. El consum d'una dieta HFHS augmenta el contingut de TAG al fetge. El tractament amb AGPI omega-3 millora aquest cúmul en una dieta estàndard, però l'empitjora en una dieta HFHS.
13. El consum d'una dieta HFHS augmenta el contingut de ceramides al fetge. El tractament amb AGPI omega-3 tendeix a disminuir els nivells totals de ceramides hepàtiques.
14. El tractament mixt millora el perfil lipídic hepàtic: TAG, DAG i ceramides en una dieta estàndard. Després de la ingesta d'una dieta HFHS durant 25 setmanes, el tractament mixt millora els TAG hepàtics però empitjora DAG i ceramides.



## *Bibliografia*



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTE DELS ÀCIDS GRASSOS OMEGA-3 D'ORIGEN MARÍ I ELS POLIFENOLS SOBRE LA SÍNDROME  
METABÒLICA EN RATES.

Núria Taltavull Anglada

Dipòsit Legal: T 1346-2015

- Abete, I., Goyenechea, E., Zulet, M. A., & Martínez, J. A. (2011). Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. doi:10.1016/j.numecd.2011.05.001
- Aoun, M., Michel, F., Fouret, G., Casas, F., Jullien, M., Wrutniak-Cabello, C., ... Feillet-Coudray, C. (2010). A polyphenol extract modifies quantity but not quality of liver fatty acid content in high-fat-high-sucrose diet-fed rats: possible implication of the sirtuin pathway. *British Journal of Nutrition*, 104(12), 1760–1770. doi:10.1017/S0007114510002850
- Aranceta, J., & Pérez-Rodrigo, C. (2012). Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *The British Journal of Nutrition*, 107 Suppl , S8–22. doi:10.1017/S0007114512001444
- Aydin, S., Aksoy, A., Aydin, S., Kalayci, M., Yilmaz, M., Kuloglu, T., ... Catak, Z. (2014). Today's and yesterday's of pathophysiology: Biochemistry of metabolic syndrome and animal models. *Nutrition*. doi:10.1016/j.nut.2013.05.013
- Bailey, D. P., Savory, L. a, Denton, S. J., Davies, B. R., & Kerr, C. J. (2014). The triglyceride to high-density lipoprotein ratio identifies children who may be at risk of developing cardiometabolic disease. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 103(8), e349–53. doi:10.1111/apa.12677

- Bakker, G. C. M., Erk, M. J. Van, Pellis, L., Wopereis, S., Rubingh, C. M., Cnubben, N. H. P., ... Hendriks, H. F. J. (2010). An antiinflammatory dietary mix modulates inflammation and oxidative and metabolic stress in overweight men: a nutrigenomics approach 1 – 4. *American Journal of Clinical Nutrition*, 4, 1044–1059. doi:10.3945/ajcn.2009.28822.1
- Barceló-Coblijn, G., & Murphy, E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Progress in Lipid Research*. doi:10.1016/j.plipres.2009.07.002
- Belén, L., Oliva, M. L., Maffei, L., Rossi, M. L., Squillace, C., Alorda, M. B., & Torresani, M. E. (2014). Relación TG/HDL y resistencia a la insulina en mujeres argentinas según su estado nutricional. *Revista Española de Nutrición Humana Y Dietética ...*, 18(1), 18–24. Retrieved from <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Nutrición+Humana+y+Dietética#0>>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Burlamaqui, I. M. B., Dornelas, C. a, Telmo, J., Jr, V., Mesquita, F. J. C., Veras, L. B., & Rodrigues, L. V. (2011). Gastroenterologia

- Experimental / Experimental Gastroenterology Fat-Rich  
Hypercaloric and, (2), 153–158.
- Byrne, C. D. (2010). Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid  
nutrition. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 82,  
265–271. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.012
- Cabo, J., Alonso, R., & Mata, P. (2012). Omega-3 fatty acids and blood  
pressure. *The British Journal of Nutrition*, 107 Suppl , S195–200.  
doi:10.1017/S0007114512001584
- Cahova, M., Dankova, H., Palenickova, E., Papackova, Z., & Kazdova, L.  
(2012). The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on  
fatty acid oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat  
model of metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism*,  
2012. doi:10.1155/2012/757205
- Caimari, A., del Bas, J. M., Crescenti, A., & Arola, L. (2012). Low doses of  
grape seed procyanidins reduce adiposity and improve the plasma  
lipid profile in hamsters. *International Journal of Obesity*.  
doi:10.1038/ijo.2012.75
- Calder, P. C. (2011). Fatty acids and inflammation: The cutting edge  
between food and pharma. In *European Journal of Pharmacology*  
(Vol. 668). doi:10.1016/j.ejphar.2011.05.085
- Castell-Auví, A., Cedó, L., Pallarès, V., Blay, M. T., Pinent, M., Motilva, M.  
J., ... Ardévol, A. (2012). Procyanidins modify insulinemia by



- affecting insulin production and degradation. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 23, 1565–1572. doi:10.1016/j.jnutbio.2011.10.010
- Celi, F. S., & Shuldiner, A. R. (2002). The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and obesity. *Current Diabetes Reports*, 2, 179–185. doi:10.1007/s11892-002-0078-2
- Chen, B.-T., Li, W.-X., He, R.-R., Li, Y.-F., Tsoi, B., Zhai, Y.-J., & Kurihara, H. (2012). Anti-inflammatory effects of a polyphenols-rich extract from tea (*Camellia sinensis*) flowers in acute and chronic mice models. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 537923. doi:10.1155/2012/537923
- Chis, I. C., Ungureanu, M. I., Marton, A., Simesdrea, R., Muresan, A., Postescu, I.-D., & Decea, N. (2009). Antioxidant effects of a grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes & Vascular Disease Research: Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, 6, 200–204. doi:10.1177/1479164109336692
- Cohen G. Dembeic D. and Marcus J. (1970). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34(1), 30–38.
- Coleman, R. A. (1988). Hepatic sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases: Effect of monoacylglycerol analogs on mitochondrial and microsomal activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 963(2), 367–374. doi:10.1016/0005-2760(88)90303-7

- Cowart, L. A. (2009). Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi:10.1016/j.tem.2008.09.004
- Del Bas, J. M., Ricketts, M. L., Baiges, I., Quesada, H., Ardevol, A., Salvadó, M. J., ... Fernandez-Larrea, J. (2008). Dietary procyanidins lower triglyceride levels signaling through the nuclear receptor small heterodimer partner. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(10), 1172–81. doi:10.1002/mnfr.200800054
- Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., & Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 20(1), 1–6. doi:10.1016/j.numecd.2009.05.015
- Drabkin, D. L., & Austin, J. H. (1935). SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES. IV. HEMOCHROMOGENS. *The Journal of Biological Chemistry*, 112, 89–104. Retrieved from <<http://www.jbc.org>>
- Duracková, Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59, 459–469.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet*, 365, 1415–1428.
- EFSA. (2009). Scientific opinion of the panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from European commission

related to labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *EFSA Journal*, (1176), 1–11.

Eisinger, K., Krautbauer, S., Hebel, T., Schmitz, G., Aslanidis, C., Liebisch, G., & Buechler, C. (2014). Lipidomic analysis of the liver from high-fat diet induced obese mice identifies changes in multiple lipid classes. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(1), 37–43. doi:10.1016/j.yexmp.2014.05.002

Fellmann, L., Nascimento, A. R., Tibiriça, E., & Bousquet, P. (2013). Murine models for pharmacological studies of the metabolic syndrome. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(3), 331–40. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.11.004

Fernandez, M. L., & Webb, D. (2008). The LDL to HDL cholesterol ratio as a valuable tool to evaluate coronary heart disease risk. *J Am Coll Nutr*, 27, 1–5. doi:27/1/1 [pii]

Fernández-Iglesias, A., Pajuelo, D., Quesada, H., Díaz, S., Bladé, C., Arola, L., ... Mulero, M. (2014). Grape seed proanthocyanidin extract improves the hepatic glutathione metabolism in obese Zucker rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58, 727–737. doi:10.1002/mnfr.201300455

Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, A., Esquivel-Chirino, C., ... Morales-González, J. A. (2011). Inflammation, oxidative stress, and obesity.

- International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3117–3132.  
doi:10.3390/ijms12053117
- Figuerola, M. C., Pérez, I., & Mejía, R. (2013). Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Revista MVC Córdoba*, 18, 3699–3707.
- Flachs, P., Rossmeisl, M., & Kopecky, J. (2014). The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 63 Suppl 1, S93–118. Retrieved from <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564669>>
- Fraga, C. G., & Oteiza, P. I. (2011). Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.002
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., ... Makishima, M. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(December). doi:10.1172/JCI200421625.1752
- Georgoulis, M., Fragopoulou, E., Kontogianni, M. D., Margariti, A., Boulamatsi, O., Detopoulou, P., ... Papatheodoridis, G. (2015). Blood redox status is associated with the likelihood of nonalcoholic fatty liver disease irrespectively of diet's total antioxidant capacity.

---

*Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 35(1), 41–8.

doi:10.1016/j.nutres.2014.11.004

González-Abuín, N., Martínez-Micaelo, N., Margalef, M., Blay, M., Arola-Arnal, A., MUGUERZA, B., ... Pinent, M. (2014). A grape seed extract increases active glucagon-like peptide-1 levels after an oral glucose load in rats. *Food & Function*. doi:10.1039/C4FO00447G

Goodyear-Bruch, C., & Pierce, J. D. (2002). Oxidative stress in critically ill patients. *American Journal of Critical Care*, 11, 543–551. doi:/S0034-98872006000500015

Hage Hassan, R., Bourron, O., & Hajduch, E. (2014). Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. *World Journal of Diabetes*, 5, 244–57. doi:10.4239/wjd.v5.i3.244

Hajer, G. R., van Haeften, T. W., & Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal*, 29, 2959–2971. doi:10.1093/eurheartj/ehn387

Hall, A. M., Soufi, N., Chambers, K. T., Chen, Z., Schweitzer, G. G., McCommis, K. S., ... Finck, B. N. (2014). Abrogating Monoacylglycerol Acyltransferase Activity in Liver Improves Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Signaling in Obese Mice No Title. *Diabetes*, 63, 2284–2296.

Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1147–1150. doi:10.1042/BST0351147

- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 10). doi:10.1016/0891-5849(91)90055-8
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231–255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776
- Hamaguchi, M., Takeda, N., Kojima, T., Ohbora, A., Kato, T., Sarui, H., ... Takeda, J. (2012). Identification of individuals with non-alcoholic fatty liver disease by the diagnostic criteria for the metabolic syndrome. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 18(13), 1508–16. doi:10.3748/wjg.v18.i13.1508
- Han, X. (2002). Characterization and direct quantitation of ceramide molecular species from lipid extracts of biological samples by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 302, 199–212. doi:10.1006/abio.2001.5536
- Harden, C. J., Dible, V. A., Russell, J. M., Garaiova, I., Plummer, S. F., Barker, M. E., & Corfe, B. M. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation had no effect on body weight but reduced energy intake in overweight and obese women. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 34(1), 17–24. doi:10.1016/j.nutres.2013.10.004

- Hashemipour, S., Esmailzadehha, N., Hamid, H., Oveisi, S., Yakhchaliha, P., & Ziaee, a. (2015). Association of metabolic syndrome components with insulin resistance in normal weight population: the Qazvin Metabolic Diseases study. *Journal of Endocrinological Investigation*. doi:10.1007/s40618-015-0302-y
- HF Moselhy, RG Reid, S Yousef, S. B. (2013). A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLCNo Title. *Journal of Lipid Research*.
- Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C.-C., Bhindi, R., & Figtree, G. a. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1, 483–91. doi:10.1016/j.redox.2013.07.006
- Hollman, P. C. H., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., ... Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*, 141, 989S–1009S. doi:10.3945/jn.110.131490
- Hwang, I. K., Kim, D. W., Park, J. H., Lim, S. S., Yoo, K., Kwon, D. Y., ... Won, M. (2009). Effects of Grape Seed Extract and its Ethylacetate / Ethanol Fraction on Blood Glucose Levels in a Model of Type 2 Diabetes. *Phytotherapy Research*, 1185(December 2008), 1182–1185. doi:10.1002/ptr

- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2012). Diacylglycerol activation of protein kinase C $\epsilon$  and hepatic insulin resistance. *Cell Metabolism*, 15(5), 574–84. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.005
- Jump, D. B. (2002). The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 8755–8. doi:10.1074/jbc.R100062200
- Jump, D. B., Depner, C. M., & Tripathy, S. (2012). Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *Journal of Lipid Research*, 53, 2525–45. doi:10.1194/jlr.R027904
- Kasumov, T., Huang, H., Chung, Y. M., Zhang, R., McCullough, a J., & Kirwan, J. P. (2010). Quantification of ceramide species in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 401, 154–161. doi:10.1016/j.ab.2010.02.023
- Kerner, A., Avizohar, O., Sella, R., Bartha, P., Zinder, O., Markiewicz, W., ... Aronson, D. (2005). Association between elevated liver enzymes and C-reactive protein: possible hepatic contribution to systemic inflammation in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(1), 193–7. doi:10.1161/01.ATV.0000148324.63685.6a
- Kim, J., Li, Y., & Watkins, B. A. (2013). Fat to treat fat: Emerging relationship between dietary PUFA, endocannabinoids, and obesity.



- In *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* (Vol. 104–105, pp. 32–41). doi:10.1016/j.prostaglandins.2012.11.005
- Kremmyda, L. S., 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 Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 155, 195–218. doi:10.5507/bp.2011.052
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal*. doi:10.1155/2013/162750
- La Fleur, S. E., Luijendijk, M. C. M., van Rozen, A. J., Kalsbeek, A., & Adan, R. A. H. (2011). A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, 35, 595–604. doi:10.1038/ijo.2010.164
- Lamaziere, A., Wolf, C., Barbe, U., Bausero, P., & Visioli, F. (2013). Lipidomics of hepatic lipogenesis inhibition by omega 3 fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 88, 149–154. doi:10.1016/j.plefa.2012.12.001
- Lee, S.-Y., Kim, J. R., Ha, M.-Y., Shim, S.-M., & Park, T.-S. (2013). Measurements of diacylglycerols in skeletal muscle by atmospheric

- pressure chemical ionization mass spectrometry. *Lipids*, *48*, 287–96.  
doi:10.1007/s11745-013-3766-6
- Lluís, L., Taltavull, N., Muñoz-Cortés, M., Sánchez-Martos, V., Romeu, M., Giralt, M., ... Nogués, M. R. (2013a). Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids in Health and Disease*, *12*(1), 140.  
doi:10.1186/1476-511X-12-140
- Lluís, L., Taltavull, N., Muñoz-Cortés, M., Sánchez-Martos, V., Romeu, M., Giralt, M., ... Nogués, M. R. (2013b). Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids in Health and Disease*, *12*, 140.  
doi:10.1186/1476-511X-12-140
- Lopez-Huertas, E. (2012). The effect of EPA and DHA on metabolic syndrome patients: a systematic review of randomised controlled trials. *British Journal of Nutrition*, *107*(S2), S185–S194.  
doi:10.1017/S0007114512001572
- Lorente-Cebrián, S., Costa, A. G. V, Navas-Carretero, S., Zabala, M., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2013). Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *69*, 633–51. doi:10.1007/s13105-013-0265-4

- Maestre, R., Micol, V., Funes, L., & Medina, I. (2010). Incorporation and interaction of grape seed extract in membranes and relation with efficacy in muscle foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8365–8374. doi:10.1021/jf100327w
- Martinez-Micaelo, N., González-Abuín, N., Terra, X., Richart, C., Ardèvol, A., Pinent, M., & Blay, M. (2012). Omega-3 docosahexaenoic acid and procyanidins inhibit cyclo-oxygenase activity and attenuate NF- $\kappa$ B activation through a p105/p50 regulatory mechanism in macrophage inflammation. *The Biochemical Journal*, 441(2), 653–663. doi:10.1042/BJ20110967
- Martinez-Victoria, E., & Yago, M. . (2012). Omega 3 polyunsaturated fatty acids and body weight. *British Journal of Nutrition*. Retrieved from <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed10&NEWS=N&AN=2012285159>>
- Martínez-Victoria, E., & Yago, M. D. (2012). Omega 3 polyunsaturated fatty acids and body weight. *The British Journal of Nutrition*, 107 Suppl , S107–16. doi:10.1017/S000711451200150X
- Mataix Verdu, J. (2009). *Nutrición y alimentación humana*. (J. Mataix Verdu, L. Serra Majem, F. Sánchez de Medina, J. Salas i Salvadó, M. H. J. Alfredo, M. López Frías, ... J. Maldonado Lozano, ed.). 2n ed. Madrid: Ergon.
- Mateos, R., Lecumberri, E., Ramos, S., Goya, L., & Bravo, L. (2005). Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance

- liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidant. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 827(1), 76–82. doi:10.1016/j.jchromb.2005.06.035
- Meikle, P. J., & Christopher, M. J. (2011). Lipidomics is providing new insight into the metabolic syndrome and its sequelae. *Current Opin in Lipidology*, 3(22), 210–5.
- Mildner-Szkudlarz, S., & Bajerska, J. (2013). Protective effect of grape by-product-fortified breads against cholesterol/cholic acid diet-induced hypercholesterolaemia in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3271–3278. doi:10.1002/jsfa.6171
- Miller, M. H., Ferguson, M. a. J., & Dillon, J. F. (2011). Systematic review of performance of non-invasive biomarkers in the evaluation of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 31(4), 461–473. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02451.x
- Mirsa H P. and Fridovich I. (1972). The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase \* Autoxidation of. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(25), 3170–3175.
- Molinar-toribio, E., Ramos-romero, S., Perez-Jimenez, J., Romeu, M., Giralt, M., Taltavull, N., ... Torres, J. L. (2015). Effect of n-3 PUFA

- supplementation at different EPA : DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. *British Journal of Nutrition*, 133, 878–887. doi:10.1017/S0007114514004437
- Montagut, G., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, M. J., ... Ardévol, A. (2010). Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(10), 961–7. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.08.001
- Mori, T. a. (2014). Dietary n-3 PUFA and CVD: a review of the evidence. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 73, 57–64. doi:10.1017/S0029665113003583
- Mozaffarian, D., & Wu, J. H. Y. (2011). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*, 58, 2047–2067. doi:10.1016/j.jacc.2011.06.063
- Narmaki, E., Siassi, F., Qorbani, M., Shiraseb, F., Ataie-Jafari, A., & Sotoudeh, G. (2015). Dietary diversity as a proxy measure of blood antioxidant status in women. *Nutrition*, 31(5), 722–726. doi:10.1016/j.nut.2014.12.012
- Neri, M., Frustaci, A., Milic, M., Valdiglesias, V., Fini, M., Bonassi, S., & Barbanti, P. (2015). A meta-analysis of biomarkers related to oxidative stress and nitric oxide pathway in migraine. *Cephalalgia* :

---

*An International Journal of Headache*, 0(0), 1–7.  
doi:10.1177/0333102414564888

Osakabe, N. (2013). Flavan 3-ols improve metabolic syndrome risk factors: evidence and mechanisms. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 3(May), 186–192. doi:10.3164/jcbtn.12

Ou, B., Hampsch-woodill, M., Prior, R. L., Laboratories, B., & Lane, T. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626.

Parra, D., Ramel, A., Bandarra, N., Kiely, M., Martínez, J. A., & Thorsdottir, I. (2008). A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss. *Appetite*, 51(3), 676–680. doi:10.1016/j.appet.2008.06.003

Pazos, M., Lois, S., Torres, J. L., & Medina, I. (2006). Inhibition of hemoglobin- and iron-promoted oxidation in fish microsomes by natural phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4417–4423. doi:10.1021/jf0530300

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042. doi:10.1021/np9904509

Poljsak, B., Suput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants.

*Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*

doi:10.1155/2013/956792

Pons, Z., Guerrero, L., Margalef, M., Arola, L., Arola-Arnal, a, & Muguera, B. (2014). Effect of low molecular grape seed proanthocyanidins on blood pressure and lipid homeostasis in cafeteria diet-fed rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 70(2), 629–37. doi:10.1007/s13105-014-0329-0

Poudyal, H., Panchal, S. K., Diwan, V., & Brown, L. (2011). Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in Lipid Research*. doi:10.1016/j.plipres.2011.06.003

Puiggròs, F., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L., & Salvadó, M. J. (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6080–6086. doi:10.1021/jf050343m

Rueda, F., Domingo, J. C., & Mach, N. (2011). Efectos de los ácidos grasos omega 3 y otros suplementos alimenticios en procesos patológicos relacionados con la tercera edad. *Revista Española de Nutrición Humana Y Dietética*. doi:10.1016/S2173-1292(11)70004-7

Ruggiero, C., Ehrenshaft, M., Cleland, E., & Stadler, K. (2011). High-fat diet induces an initial adaptation of mitochondrial bioenergetics in the kidney despite evident oxidative stress and mitochondrial ROS

- production. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 300, E1047–E1058. doi:10.1152/ajpendo.00666.2010
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell*. doi:10.1016/j.cell.2012.02.017
- Santos-Gallego, C. G., Badimon, J. J., & Ibáñez, B. (2013). Modelos experimentales de aterosclerosis. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 13(Supl.E), 3–12. doi:10.1016/S1131-3587(13)70087-6
- Sardina, J. L., López-Ruano, G., Sánchez-Sánchez, B., Llanillo, M., & Hernández-Hernández, A. (2012). Reactive oxygen species: Are they important for haematopoiesis? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.03.005
- Shin, M.-O., Yoon, S., & Moon, J.-O. (2010). The proanthocyanidins inhibit dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 33(1), 167–173. doi:10.1007/s12272-010-2239-1
- Strobel, C., Jahreis, G., & Kuhnt, K. (2012). Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. *Lipids in Health and Disease*. doi:10.1186/1476-511X-11-144
- Taltavull, N., Muñoz-Cortés, M., Lluís, L., Jové, M., Fortuño, A., Molinar-Toribio, E., ... Nogués, M. R. (2014). Eicosapentaenoic



acid/docosahexaenoic acid 1:1 ratio improves histological alterations in obese rats with metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 13, 31. doi:10.1186/1476-511X-13-31

Tarantino, G. (2014). Nutrition: a promising route for prevention and management of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease. Title. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 2, 39–41.

Tebib, K., Besançon, P., & Rouanet, J. M. (1994). Dietary grape seed tannins affect lipoproteins, lipoprotein lipases and tissue lipids in rats fed hypercholesterolemic diets. *The Journal of Nutrition*, 124(12), 2451–2457.

Tejerina, T., & Civeira, F. (2013). Uso terapéutico de ácidos grasos omega-3 de prescripción en pacientes con hipertrigliceridemia grave. *Actualidad En Farmacología Y Terapéutica*, 11.

Terra, X., Pallarés, V., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., ... Blay, M. (2011). Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(4), 380–7. doi:10.1016/j.jnutbio.2010.03.006

Tesauro, M., Canale, M. P., Rodia, G., Di Daniele, N., Lauro, D., Scuteri, A., & Cardillo, C. (2011). Metabolic syndrome, chronic kidney, and cardiovascular diseases: role of adipokines. *Cardiology Research and Practice*, 2011, 653182. doi:10.4061/2011/653182

- Turpin, S. M., Nicholls, H. T., Willmes, D. M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C. M., ... Brüning, J. C. (2014). Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metabolism*, 20(4), 678–86. doi:10.1016/j.cmet.2014.08.002
- Vannice, G., & Rasmussen, H. (2014). Position of the academy of nutrition and dietetics: Dietary fatty acids for healthy adults. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114, 136–153. doi:10.1016/j.jand.2013.11.001
- Venarucci, D., Venarucci, V., Vallese, A., Battilà, L., Casado, A., De la Torre, R., & Lopez Fernandez, M. (1999). Free radicals: important cause of pathologies refer to ageing. *Panminerva Medica*, 4, 335–9.
- Vogels, N., Nijs, I. M. T., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2004). The effect of grape-seed extract on 24 h energy intake in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(4), 667–673. doi:10.1038/sj.ejcn.1601863
- Vonbank, A., Saely, C. H., Rein, P., & Drexel, H. (2013). Insulin resistance is significantly associated with the metabolic syndrome, but not with sonographically proven peripheral arterial disease. *Cardiovasc. Diabetol.*, 12, —. Retrieved from <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52692637>>

- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., ... Shen, C.-L. (2014). Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 1–18. doi:10.1016/j.jnutbio.2013.09.001
- Wang, Z. H., Gong, H. P., Shang, Y. Y., Tang, M. X., Fang, N. N., Jiang, G. H., ... Zhang, W. (2012). An integrative view on the carotid artery alterations in metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*, 42(5), 496–502. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02605.x
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., Omaye, S. T., & Korte, D. W. (1990). Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry*, 184(2), 193–199. doi:10.1016/0003-2697(90)90668-Y
- www.criver.com. (n.d.).
- Yanai, H., Katsuyama, H., Hamasaki, H., Abe, S., Tada, N., & Sako, A. (2015). Effects of Dietary Fat Intake on HDL Metabolism. *Journal of Clinical Medical Research*, 7(3), 145–149.
- Yen, C., Yang, N., Lee, B., Lin, J., Hsia, S., & Lin, P. (2008). The Antioxidant Status and Concentrations of Coenzyme Q10 and Vitamin E in Metabolic Syndrome. *The Scientific World Journal*, 2013, 7.

Yubero-Serrano, E. M., Delgado-Lista, J., Peña-Orihuela, P., Perez-Martinez, P., Fuentes, F., Marin, C., ... Lopez-Miranda, J. (2013). Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study. *Experimental & Molecular Medicine*, 45, e28. doi:10.1038/emm.2013.53