



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Evaluación de la exposición a frutos secos en sujetos con síndrome metabólico mediante una aproximación metabolómica no dirigida. Evidencias desde estudios nutricionales de intervención y de cohorte

Lyda Ximena Mora Cubillos

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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A FRUTOS SECOS EN SUJETOS
CON SÍNDROME METABÓLICO MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN
METABOLÓMICA NO DIRIGIDA. EVIDENCIAS DESDE ESTUDIOS
NUTRICIONALES DE INTERVENCIÓN Y DE COHORTE**

LYDA XIMENA MORA CUBILLOS

Barcelona, 2016

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Programa de Doctorado
ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN
2012 – 2016

**EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A FRUTOS SECOS EN SUJETOS
CON SÍNDROME METABÓLICO MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN
METABOLÓMICA NO DIRIGIDA. EVIDENCIAS DESDE ESTUDIOS
NUTRICIONALES DE INTERVENCIÓN Y DE COHORTE**

Memoria presentada por LYDA XIMENA MORA CUBILLOS para optar al título de
doctora por la Universidad de Barcelona

Dra. Cristina Andrés Lacueva
(Directora/Tutora)

Dra. Sara Tulipani
(Directora)

LYDA XIMENA MORA CUBILLOS
Barcelona, 2016

*A Dios, por ser el cimiento de mi vida
A mi familia, por ser el motor de mi vida
A mí, por lo que significa este proceso*

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido financiado



Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias y de Investigación (AGAUR)–Generalitat de Catalunya

- Beca de formación predoctoral (FI-DGR 2012)
- Ayuda de apoyo a las actividades de Grupos



Ministerio de Economía y Competitividad y Fondo Europeo de Desarrollo Regional

- Proyecto (AGL2009-13906-C02-01)
- Programa INGENIO-CONSOLIDER (CSD2007-00063)



International Nut&Dried Fruit Council (INC) Word Forum for Nutrition Research and Dissemination

Proyecto FBF307906

Se agradece la colaboración en esta Tesis Doctoral de los



JPI HDHL FOODBALL

Proyecto PCIN-2014-133



**Instituto de Salud Carlos III
Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación**

Ministerio de Economía y competitividad
Proyecto PI13/01172



**Fundación Progreso y Salud
Consejería de Salud y Bienestar Social
Junta de Andalucía (España)**

Proyecto PI-0557-2013

AGRADECIMIENTOS

Me parece increíble estar escribiendo estas palabras, son muchos los sentimientos que se mezclan y muchas las personas que vienen a mi mente y a las cuales quisiera agradecerles por su apoyo, directo o indirecto, durante este proceso. A todos un sincero y amoroso ¡GRACIAS!

Gracias Cristina por la oportunidad para realizar mi doctorado. Gracias Sara por aproximarme al mundo de la metabolómica.

A tí mamita, gracias por la fuerza y el amor que siempre me has demostrado. Eres mi más grande orgullo. ¡Te amo!

A mi Zully y a mi Luchis, mis amorosos hermanos, no sólo de sangre sino también de espíritu. No puedo ni quiero imaginarme la vida sin ustedes. Gracias por todo lo que significan en mi vida. ¡Los amo! Gracias papi y Carlos por la compañía en este proceso.

A Samu, nuestro angelito, soy tan feliz de que me escogieras como tu tía. Eres la más grande representación de amor en nuestra familia. Espero ser para tí, una buena compañera de vida. Te llevo siempre en mi corazón.

Querida Eresbey, gracias por tu invaluable apoyo incondicional. Todo lo que he aprendido de tí me ha permitido ser un mejor ser humano. Gracias por las palabras precisas en el momento indicado. Nunca me cansaré de agradecer a la vida por la bendición de conocerte. ¡Gracias totales!

A tí Wilmer, quien mejor que tú conoce mi proceso en esta Tesis. Gracias, gracias, mil gracias por tus palabras, tu apoyo y tu cariño. Por cada café en la madrugada, inolvidable esfuerzo. Eres de los mejores regalos que me ha brindado Barcelona.

A mi inigualable y loca familia, no podría ser para menos si hacemos parte del municipio más loco de Colombia, mi amado Sibaté. A todos, infinitas gracias por su cariño, compañía, y apoyo, sus palabras y expresiones de cariño siempre han llegado a mi corazón, los quiero locamente.

A mi combo favorito Nameohnse. Definitivamente los amigos son la familia que escogemos y, sin duda alguna, ustedes son un gran regalo en mi vida. Gracias mi Johnci por tu apoyo incondicional y tus frases siempre inspiradores “la abeja”. Gracias mi Liba por tu fuerza, tu coraje, eres único. Mi Natha, gracias por ser luz, apoyo y fortaleza. Sin ustedes esto no hubiera sido lo mismo. ¡Los amo demasiado!

A tí Sandrita, quien más que mi amiga, eres mi hermana. Te admiro tanto. Gracias por tu apoyo y tu cariño, deseo de todo corazón, que tu camino al lado del precioso Jero y de “Junior” siempre desborde de bendiciones. ¡Los quiero mucho!

A mi madrina Yolanda, quien es como una madre para mí, su cariño y apoyo me han hecho sentir como en casa. Gracias infinitas a toda la hermosa familia Neyra que me han acogido como una más.

Adri, tu apoyo y tu compañía en cada etapa de esta experiencia han sido fundamentales, te admiro mucho y deseo lo mejor para tí siempre. ¡Nos vemos en Colombia! Muchas historias faltan por construir. ¡Gracias por todo!

Tati, mi hermanita española, muchas aventuras contigo y muchos lazos contruidos, gracias por todo, vamos por más ¡Next!

A los ángeles que en forma de amigos, Barcelona me ha permitido conocerlos, a tí Catica, Jhon, Caro, Yami, Aleja, Dorita, Enrique y Miriam, gracias por las charlas que me han enseñado otras formas de ver la vida.

A mi queridas "Latin girls", gracias por todo. Mary y Lili, gracias por el apoyo y el cariño siempre incondicionales.

A los del lab, Olha, Marisa, Ascen, Nina, Maria, Magali, Sheila, Fran, Ana, Arantxa, Maria Boto, Montse, Rosa, Mar, Maria Rotchés, Mariel, Rafa y Mireia, me llevo tanto de cada uno. Muchos éxitos en sus vidas.

Gracias UB por todas las experiencias y los aprendizajes. Gracias Barcelona por ser mi hogar durante estos años.

Los resultados directos de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

Revistas (JCR):

- Autores (p.o. de firma): **Ximena Mora-Cubillos**, Sara Tulipani, Mar Garcia-Aloy, Mònica Bulló, Francisco J Tinahones and Cristina Andres-Lacueva
Título: Plasma metabolomic biomarkers of mixed nuts exposure inversely correlate with severity of metabolic syndrome
Revista: **Molecular Nutrition & Food Research**
Volumen: 59 Número: 12 Páginas, inicial: 2480 final: 2490 Año: 2015
Lugar de publicación: Alemania
Base de datos de indexación: *Journal Citation Reports* (JCR)
Factor de impacto: 4.604
Indicios de calidad: Q1 (4/123) FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY
Clave: Artículo

- Autores (p.o. de firma): Sara Tulipani, **Ximena Mora-Cubillos**, Olga Jáuregui, Rafael Llorach, Eduardo García-Fuentes, Francisco J Tinahones, Cristina Andres-Lacueva
Título: New and Vintage Solutions to Enhance the Plasma Metabolome Coverage by LC-ESI-MS Untargeted Metabolomics. The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation
Revista: **Analytical Chemistry**
Volumen: 87 Número: 5 Páginas, inicial: 2639 final: 2647 Año: 2015
Lugar de publicación: Estados Unidos de América
Base de datos de indexación: *Journal Citation Reports* (JCR)
Factor de impacto: 5.636
Indicios de calidad: Q1 (4/74) CHEMISTRY, ANALYTICAL
Clave: Artículo

Congresos:

- **X. Mora-Cubillos**, S. Tulipani, Mar García-Aloy, M. Bullo, F. J. Tinahones, Andres-Lacueva. Plasma fingerprinting of mixed nuts exposure in subjects with metabolic syndrome. New insights into diet and host-microbial interactions in the protection against cardiometabolic disease risk. Poster presentado en ocasión del *7th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH, 2015)* (Tours, Francia, 27-30 de octubre de 2015).
- Sara Tulipani, **Ximena Mora-Cubillos**, Olga Jáuregui, Sara Tamimi, Rafael Llorach, Eduardo García Fuentes, Francisco J Tinahones, Cristina Andres-Lacueva. New and Vintage Solutions to Enhance the Plasma Metabolome Coverage by Single UHPLC-ESI- MS Analysis. All Counts when Looking for Needles in Haystack. Poster presentado en ocasión de *NuGoweek 2014*, Castellammare di Stabia (Nápoles, Italia, 8-10 de septiembre de 2014).
- Sara Tulipani, **Ximena Mora-Cubillos**, Olga Jáuregui, Rafael Llorach, Eduardo García Fuentes, Francisco J Tinahones, Cristina Andres-Lacueva. New and 'Vintage' Solutions to Enhance the Plasma Metabolome Coverage by HR-LC-ESI-q-ToF-MS. The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation in Untargeted Metabolomics. Poster presentado en ocasión del EMBO Practical Course on Metabolomics Bioinformatics for Life Scientists (EBI-EMBL, Hinxton, Cambridge, 17-21 de marzo de 2014).

Participación en otro trabajo publicado e incluido como Anexo en la presente Tesis Doctoral:

- Autores (p.o. de firma): Khan N., Khymenets O., Urpí-Sardà M., Tulipani S., Garcia-Aloy M., Monagas M., **Mora-Cubillos X.**, Llorach R., Andres-Lacueva C.
Título: Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease
Revista: **Nutrients**
Volumen: 6 Número: 2 Páginas, inicial: 844 final: 880 Año: 2014
Lugar de publicación: Suiza
Base de datos de indexación: *Journal Citation Reports* (JCR)
Factor de impacto: 3.270
Indicios de calidad: Q2 (21/77) NUTRITION & DIETETICS
Clave: Review

LISTA DE ABREVIATURAS

AAEC	Asociación Americana de Endocrinología Clínica (del inglés, <i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>)
AHA - NHILBI	Asociación Americana del Corazón - Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (del inglés, <i>American Heart Association - National Heart, Lung and Blood Institute</i>)
ANOVA	Análisis de la variancia (del inglés, <i>ANalysis Of VAriance</i>)
AUC	Área bajo la curva (del inglés, <i>Area Under the Curve</i>)
c-HDL	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (del inglés, <i>high-density lipoprotein cholesterol</i>)
c-LDL	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (del inglés, <i>Low-Density Lipoprotein cholesterol</i>)
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés, <i>European Food Safety Authority</i>)
EGIR	Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (del inglés, <i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>)
EPIC	Investigación Prospectiva Europea sobre el Cáncer y la Nutrición (del inglés, <i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>)
ESI	Ionización por electropulverización (del inglés, <i>Electrospray Ionization</i>)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, <i>Food and Agriculture Organization</i>)
FFQ	Cuestionario de frecuencia de consumo (del inglés, <i>Food Frequency Questionnaire</i>)
HCA	Análisis de cluster jerárquicos (del inglés, <i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
HMDB	Base de datos del metaboloma humano (del inglés, <i>Human Metabolome Database</i>)
HPLC-q-ToF-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (del inglés, <i>High-Performance Liquid Chromatography coupled to quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry</i>)
ICC	Índice Cintura-Cadera
IDF	Federación Internacional de la Diabetes (del inglés, <i>International Diabetes Federation</i>)

IMC	Índice de Masa Corporal
ISRCTN	Número Estándar Internacional De Ensayo Clínico Controlado y Aleatorizado (del inglés, <i>International Standard Randomized Controlled Trial Number</i>)
KEGG	Enciclopedia "Kyoto" de Genes y Genomas (del inglés, <i>Kyoto Encyclopedia of genes and Genomes</i>)
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (del inglés, <i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry</i>)
m/z	Relación masa/carga
MS/MS	Espectrometría de masa en tándem (del inglés, <i>tandem mass spectrometry</i>)
NCEP ATP-III	Tercer informe del Panel de expertos del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol para la Detección, Evaluación y Tratamiento de Hipercolesterolemia en adultos (del inglés, <i>National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III</i>)
OSC	Corrección de señales ortogonales (del inglés, <i>Orthogonal Signal Correction</i>)
OSC-PLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales con corrección de señales ortogonales (del inglés, <i>Partial Least Square Discriminant Analysis with Orthogonal Signal Correction</i>)
PCA	Análisis de componentes principales (del inglés, <i>Principal Component Analysis</i>)
PLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (del inglés, <i>Partial Least Square Discriminant Analysis</i>)
PREDIMED	Prevención con Dieta Mediterránea
QC	Control de calidad (del inglés, <i>Quality Control</i>)
ROC	Curva de rendimiento diagnóstico (del inglés, <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>)
RT	Tiempo de retención (del inglés, <i>Retention Time</i>)
TG	Triglicéridos
UHPLC-MS	Cromatografía de líquidos de ultra alto desempeño-espectrometría de masas (del inglés, <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
VIP	Importancia de las variables en la proyección (del inglés, <i>Variable Importance in the Projection</i>)

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTERÉS	5
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	11
2.1 Frutos secos: datos de consumo y perfil nutricional	13
2.2 Metabolismo y biodisponibilidad de los elagitaninos	23
2.3 Ingesta de frutos secos y síndrome metabólico.....	27
2.3.1 Evidencias científicas	30
2.3.2 Potenciales mecanismos de acción	35
2.4 Nutrimetabolómica: biomarcadores de exposición y efecto.....	39
2.4.1 Generalidades.....	39
2.4.2 Flujo de trabajo en nutrimetabolómica.....	44
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
3.1 Hipótesis	51
3.2 Objetivos	52
4. METODOLOGÍA	55
4.1 Diseño de los estudios nutricionales	57
4.1.1 Estudio de intervención: EFINUT	59
4.1.2 Estudio de cohorte: InCHIANTI	63
4.2 Análisis metabolómico de muestras de biológicas de plasma y orina	67
4.2.1 Recolección y preparación de la muestra.....	67
4.2.2 Adquisición de datos: plataforma analítica LC-ESI-MS	69
4.2.3 Análisis de datos.....	75
4.2.4 Identificación de biomarcadores.....	86
4.2.5 Interpretación biológica.....	90
5. RESULTADOS	97
5.1 Desarrollo metodológico para el análisis de muestras de plasma.....	99
5.1.1 Técnica de extracción de muestras de plasma.....	101

5.1.2 Adquisición de datos: puntos críticos en la selección de columnas cromatográficas y fases móviles.....	108
5.2 Estudio EFINUT.....	124
5.2.1 Análisis descriptivo de los participantes del estudio.....	124
5.2.2 Análisis del metaboloma plasmático.....	127
5.2.3 Asociación entre biomarcadores de ingesta y estado clínico.....	135
5.3 Cohorte InCHIANTI.....	152
5.3.1 Análisis descriptivo de los participantes del estudio.....	152
5.3.2 Análisis del metaboloma urinario.....	154
5.3.3 Predicción de la ingesta: aplicación de modelo Tobit.....	162
6. DISCUSIÓN.....	167
6.1 Desarrollo e implementación de metodología analítica.....	169
6.2 Evaluación de la exposición a frutos secos en diferentes biofluidos y diseños de estudio.....	173
6.3 Evaluación de la capacidad discriminante de los biomarcadores de exposición a frutos secos.....	176
6.4 Huellas metabólicas de biomarcadores de exposición a frutos secos.....	177
6.4.1 Biomarcadores de co-metabolismo de microbiota intestinal-huespéd de los polifenoles de frutos secos.....	178
6.4.2 Biomarcadores del metabolismo de ácidos grasos.....	180
6.5 Relación entre biomarcadores de exposición y estado clínico.....	180
6.6 Perspectivas de futuro. Reflexiones.....	182
7. CONCLUSIONES.....	185
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191
9. ANEXOS.....	207

RESUMEN

Nueces (*Juglans regia*), almendras (*Prunus dulcis*) y avellanas (*Corylus avellana*) son frutos secos reconocidos como alimentos saludables en patrones de alimentación como la Dieta Mediterránea. Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que la ingesta regular de estos alimentos está asociada con la prevención de riesgo de síndrome metabólico y el tratamiento de sus componentes diagnósticos. Sin embargo, a pesar de los conocimientos actuales, los mecanismos de acción subyacentes a dichos efectos saludables no están completamente elucidados. La aplicación de la metabolómica a estudios nutricionales (nutrimetabolómica), como herramienta analítica avanzada, permite explorar los cambios en el metaboloma humano producto de la ingesta de un determinado alimento o patrón de alimentación (*food metabolome*), con el fin de descubrir y validar biomarcadores nutricionales que reflejen la exposición real a la dieta y, de esta manera, establecer evidencias fiables y robustas acerca de la asociación recíproca entre la dieta y el estado de salud.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue identificar biomarcadores de exposición a frutos secos a través de la caracterización del perfil metabólico humano tras la ingesta, y evaluar las posibles asociaciones de efecto entre estos biomarcadores y el estado clínico de sujetos con síndrome metabólico. Para lograr este objetivo, el flujo de trabajo en nutrimetabolómica se aplicó desde una aproximación no dirigida a dos diseños de estudio diferentes, un estudio de intervención y un estudio de cohorte, en los cuales se analizó la huella metabólica plasmática y urinaria, respectivamente. La exploración del metaboloma urinario se realizó a partir de un protocolo analítico previamente validado por el grupo de investigación. Por el contrario, el protocolo analítico para la exploración del metaboloma plasmático se desarrolló y validó durante esta Tesis Doctoral.

El poder discriminante y predictivo de los biomarcadores de exposición a frutos secos se realizó a través de diferentes estrategias bioestadísticas, se interpretó

biológicamente las huellas metabólicas asociadas a los biomarcadores de exposición a frutos secos y, finalmente, se evaluó las posibles asociaciones entre los biomarcadores de exposición a frutos secos y el estado clínico según los criterios diagnósticos de síndrome metabólico.

En el estudio de intervención, la urolitina A glucurónido, metabolito derivado de la biotransformación de elagitaninos por acción de la microbiota intestinal y, el ácido dodecanodioico, metabolito derivado del metabolismo de ácidos grasos dicarboxílicos, se identificaron como los biomarcadores plasmáticos más discriminantes de la exposición a frutos secos. En cuanto al estudio de cohorte, catorce biomarcadores urinarios procedentes de diferentes rutas metabólicas (co-metabolismo microbiota-huespéd de polifenoles, metabolismo del triptófano y de los ácidos grasos) fueron considerados como discriminantes a la exposición a frutos secos. La relación entre estos biomarcadores urinarios de exposición y el registro de ingesta de frutos secos según el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (FFQ), se evaluó a través del modelo predictivo Tobit, lo cual demostró que la urolitina A glucurónido es el biomarcador más discriminante a la exposición a frutos secos en el estudio de cohorte. Estos resultados aportan evidencias contundentes acerca de la robustez de la urolitina A glucurónido como biomarcador de exposición a frutos secos independiente de la muestra biológica analizada (plasma y orina) y las características de exposición de la población (dieta controlada y condición de vida libre).

Finalmente, la evaluación entre los biomarcadores de exposición a frutos secos y el estado clínico, evidenció que sujetos con alteraciones metabólicas menos severas de síndrome metabólico, como obesidad abdominal e hiperglucemia, presentaron mayores niveles de urolitina A glucurónido en plasma. Esta correlación inversa permite abrir nuevas hipótesis acerca de la influencia del perfil de disbiosis de la microbiota intestinal, recientemente asociado a sujetos con síndrome metabólico, en el metabolismo de polifenoles por acción de la microbiota intestinal y, por tanto, en la producción de metabolitos asociados con efectos saludables como son las urolitinas.

1. INTERÉS

La dieta es uno de los principales factores de exposición humana que participan como mediadores en el estado salud y enfermedad (Rappaport 2011). La Dieta Mediterránea en particular se reconoce como un patrón de alimentación en la prevención de riesgo de **síndrome metabólico** (Salas-Salvado et al. 2014; Ros et al. 2014, Ros et al. 2015). Los efectos saludables de este patrón de alimentación están relacionados con hábitos de estilo de vida saludables como la actividad física y el consumo regular de ciertos alimentos representativos, entre los cuales se destacan los **frutos secos** (Damasceno et al. 2013).

Numerosas y recientes evidencias científicas, producto de estudios clínicos (Blanco Mejia et al. 2014) y epidemiológicos (Lutsey et al. 2008; Fernandez-Montero et al. 2013), sugieren que una ingesta regular de frutos secos como nueces (*Juglans regia*), almendras (*Pronus dulcis*) y avellanas (*Corylus avellana*) está asociada con mejoras en los parámetros diagnósticos de síndrome metabólico -obesidad abdominal (Jackson et al. 2014), hiperglucemia (Salas-Salvado et al. 2014), hipertensión (Guo, et al. 2014) y dislipidemia-, así como con la reducción de riesgo de enfermedad cardiovascular (Luo et al. 2014) y diabetes mellitus tipo II (Salas-Salvado et al. 2011). Estas evidencias han posicionado a los frutos secos como alimentos saludables en otros patrones de alimentación como lo es la Nueva Dieta Nórdica (Mithril et al. 2013) y en las recientes Recomendaciones Alimentarias para los Estadounidenses (2015) (USDA 2015).

Sin embargo, a pesar de las evidencias actuales, mecanismos subyacentes a dichos efectos saludables no están del todo elucidados. En particular, el papel de **componentes fitoquímicos** minoritarios de los frutos secos en la protección frente a riesgo cardiometabólico.

Por otra parte, asegurar la exposición real a los alimentos es un criterio fundamental en la exploración de las asociaciones entre la alimentación y el estado de salud, lo cual permite evidenciar los efectos reales de los alimentos en una condición patológica específica. En este sentido, evidenciar y diferenciar “lo que las personas realmente comen” de “lo que dicen que comen”, es el primer paso en la

evaluación de los efectos asociados a la salud tras la ingesta. Tradicionalmente, la valoración y el seguimiento de la ingesta alimentaria se ha realizado a través de un conjunto de métodos clásicos como son el recordatorio 24 horas, los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y los registros dietéticos, en los cuales las personas registran “lo que dicen que comen”, aunque son instrumentos que brindan información importante acerca del seguimiento alimentario en una población, sobretodo en estudios epidemiológicos y observacionales, presentan algunas limitaciones metodológicas y errores sistemáticos, asociados a la subestimación o sobreestimación del consumo real por parte de los sujetos al realizar sus registros y, a la comparación de este consumo con tablas de referencias de composición de alimentos previamente establecidas y que posiblemente no corresponden con las condiciones reales de consumo (Hedrick et al. 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, surge el concepto de **biomarcadores nutricionales** con el fin de establecer de una manera objetiva, válida y precisa la exposición real a los alimentos. La **metabolómica**, como la más reciente de las tecnologías “-ómicas”, se presenta como una herramienta robusta en el descubrimiento y validación de biomarcadores nutricionales (Zhang, al. 2008; Llorach, et al. 2012). En epidemiología nutricional, el descubrimiento y posterior verificación de estos biomarcadores en diversos diseños de estudios nutricionales (clínicos, de cohorte, observacionales...), garantiza la fiabilidad y robustez de estos biomarcadores en la valoración a la exposición real a la ingesta y, abre nuevas aplicaciones a estos biomarcadores en diversos campos como la investigación nutricional clínica relacionada con el estudio de los efectos de la ingesta en parámetros clínicos asociados a alteraciones metabólicas, el diseño de nuevos ingredientes o alimentos funcionales por parte de la industria alimentaria y, como evidencias potenciales en las declaraciones de las propiedades saludables de los alimentos siguiendo los criterios establecidos en estudios en humanos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (del inglés, *European Food Safety Authority*, EFSA) (EFSA 2016).

En **metabolómica nutricional** o **nutrimetabolómica**, plasma y orina son los biofluidos más utilizados (Zhang et al. 2008). El plasma es considerado como una de las matrices con mayor interés biológico ya que brinda información relevante acerca de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los metabolitos circulantes en el organismo (Rappaport et al. 2014). Por tanto, el desarrollo de metodologías analíticas robustas y validadas para la exploración del metaboloma plasmático es motivo de interés en estudios metabólicos. La exploración del metaboloma urinario también aporta información biológica relevante acerca de los productos de excreción del metabolismo no sólo de metabolitos endógenos, sino también de metabolitos exógenos, los cuales están directamente relacionados con la exposición dietética. En este sentido, explorar ambas matrices biológicas ofrece información complementaria que favorece la comprensión de los mecanismos biológicos asociados a los biomarcadores nutricionales con el fin de aumentar su validez y robustez como instrumentos de caracterización real de la exposición a la ingesta.

En esta Tesis Doctoral se ha propuesto el estudio de la huella metabólica relacionada con el consumo de frutos secos, tanto en muestras biológicas de orina como de plasma, desde una aproximación metabolómica no dirigida. Además se han evaluado las posibles relaciones existentes entre los biomarcadores de ingesta frutos secos identificados y los rasgos clínicos asociados al diagnóstico de síndrome metabólico. Concretamente, la aproximación metabolómica se aplicó a dos diseños de estudios diferentes, un estudio nutricional aleatorizado, controlado y en paralelo de 12 semanas de intervención y, un estudio observacional (de cohorte), en los cuales se exploró el metaboloma plasmático y el metaboloma urinario, respectivamente.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Frutos secos: datos de consumo y perfil nutricional

El Código Alimentario Español define como frutos secos o “frutas secas o de cáscara” a aquellos alimentos cuya parte comestible posee en su composición menos del 50% de agua (ver **Figura 2.1**). Dentro de esta definición se encuentran las castañas (*Castanea vesca*), las nueces (*Juglans regia*), las almendras (*Prunus dulcis*), las avellanas (*Corylus avellana*), las nueces de Málaga (*Caryia olivaeformis*) y los piñones (*Pinus pinea*), siendo las castañas las que contienen mayor proporción de agua (alrededor del 50%) en comparación con los demás frutos secos que no superan el 6% (Deleuze 2006).

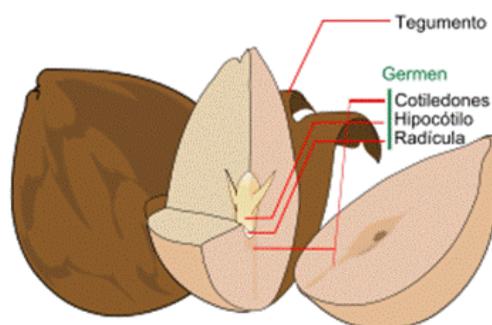


Figura 2.1. Descripción anatómica de la semilla de almendra (*Prunus dulcis*), parte comestible del fruto: germen y tegumento (piel). En general, los frutos secos se caracterizan por presentar una semilla en la que la pared del ovario se endurece en la madurez.

Las nueces (*Juglans regia*), las almendras (*Prunus dulcis*) y las avellanas (*Corylus avellana*) son los frutos secos de mayor consumo en Europa, con una ingesta significativamente superior en los países del mediterráneo de acuerdo con estudios epidemiológicos como la Investigación Prospectiva Europea sobre el Cáncer y la Nutrición (del inglés, *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition, EPIC*) (Jenab, et al. 2006) y bases de datos de consumo de alimentos. En el caso puntual de España e Italia, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, *Food and Agriculture Organization, FAO*), reporta que desde hace más de dos décadas, el consumo de frutos secos en estos países no sólo es significativamente superior en comparación con la media en Europa sino también a nivel mundial (ver **Figura 2.2**) (FAOSTAT 2015).

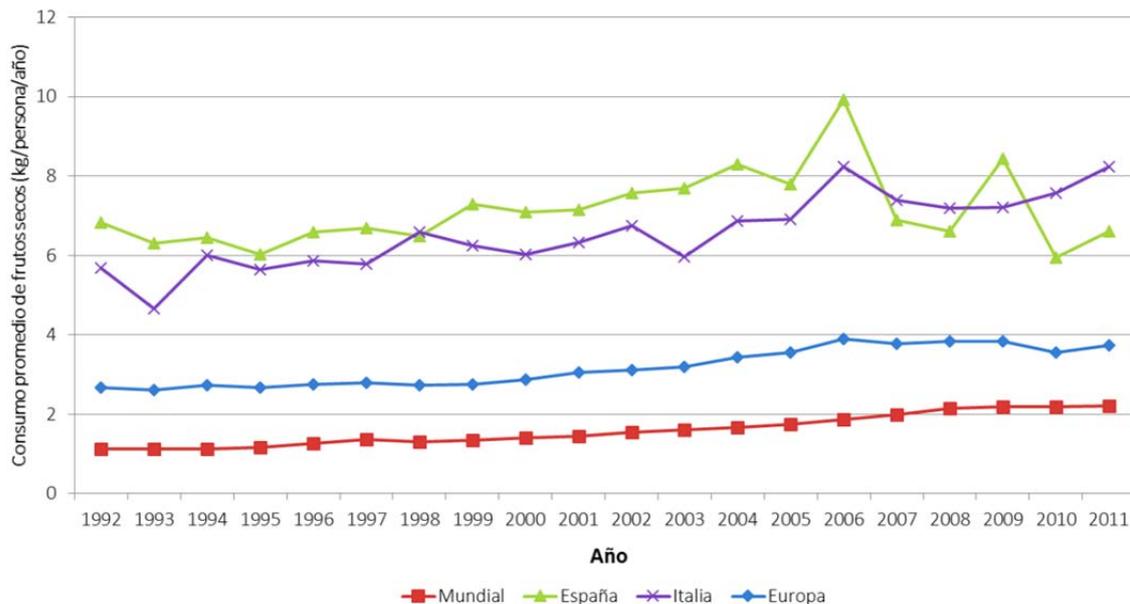


Figura 2.2. Reporte de consumo de frutos secos (kg/persona/año).
Fuente: FAO, FAOSTAT. Dirección de estadística, 2015 (FAOSTAT 2015).

Además, tanto las nueces como las almendras y las avellanas son considerados alimentos saludables dentro de patrones dietéticos como la Dieta Mediterránea (Damasceno, et al. 2013), la Nueva Dieta Nórdica (Mithril, et al. 2013) y en las recientes Recomendaciones Alimentarias para los Estadounidenses (2015 - 2020) (USDA 2015a), debido a su perfil nutricional único y complejo, tanto en composición de macro- y micronutrientes como de compuestos fitoquímicos (USDA 2015b). Sin embargo, este perfil nutricional puede variar de acuerdo con la forma de consumo, siendo la presentación natural, sin aditivos (sal o sacarosa) ni tratamientos térmicos que impliquen la adición de grasas como el tostado con aceites, la más recomendada (USDA 2015a; EFSA 2011).

Macronutrientes y micronutrientes

La composición de **macronutrientes** en los frutos secos en presentación natural se caracteriza por un alto contenido de grasas (> 50% de su peso total), menor proporción de proteínas y carbohidratos y, un escaso contenido en agua (Ros 2010) (ver **Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Composición nutricional por 100 g de porción consumible de nueces (*Juglans regia*), almendras (*Prunus dulcis*) y avellanas (*Corylus avellana*) según distintas bases de datos^a.

Nutrientes	DRI ^b		USDA			BEDCA			BDA		
	Mujeres	Hombres	Nueces	Almendras	Avellanas	Nueces	Almendras	Avellanas	Nueces	Almendras	Avellanas
Agua (g)	ND	ND	4.07	4.41	5.31	18.5	5.87	5.26	3.50	5.10	4.50
Energía (kcal)	1600 - 2000	2200 - 3000	654	579	628	595	589	656	689	603	655
Macronutrientes											
Proteína total (g)	46	56	15.23	21.15	14.95	14.00	19.13	12.01	14.30	22.00	13.80
Grasas totales (g)	20 - 35 ^c	20 - 35 ^c	65.21	49.93	60.75	63.28	45.22	56.25	68.10	55.30	64.10
Ácidos grasos saturados (g)	< 10 ^c	< 10 ^c	6.13	3.80	4.46	7.42	4.32	4.91	5.57	4.59	4.16
Ácidos grasos monoinsaturados (g)	ND	ND	8.93	31.55	45.65	12.13	27.98	46.40	9.54	39.44	38.60
Ácidos grasos poliinsaturados (g)	ND	ND	47.17	12.33	7.92	43.70	11.14	4.89	40.66	10.85	5.20
Ácidos grasos <i>trans</i> totales (g)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Colesterol (mg)	ND	ND	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Carbohidratos totales (g)	130	130	13.71	21.55	16.70	3.30	6.20	10.50	5.10	4.60	6.10
Azúcares totales (g)	ND	ND	2.61	4.35	4.34	ND	ND	ND	3.00	3.70	4.10
Fibra dietética total (g)	22.4 - 28	30.8 - 33.6	6.70	12.50	9.70	5.20	8.35	8.22	6.20	12.70	8.10
Micronutrientes: minerales											
Calcio (mg)	1000 - 1200	1000	98.00	269.00	114.00	77.00	248.25	226.00	61.00	240.00	150.00
Hierro (mg)	08 - 18	8	2.91	3.71	4.70	2.30	3.59	3.80	2.40	3.00	3.30
Magnesio (mg)	310 - 320	400 - 420	158.00	270.00	163.00	140.00	258.13	156.00	121.00	264.00	160.00
Fósforo (mg)	700	700	346.00	481.00	290.00	304.00	524.88	333.00	300.00	550.00	322.00
Potasio (mg)	4700	4700	441.00	733.00	680.00	690.00	767.25	636.00	603.00	780.00	466.00
Zinc (mg)	8	11	3.09	3.12	2.45	2.10	3.60	2.10	5.00	2.50	2.00
Sodio (mg)	2300	2300	2.00	1.00	0.00	3.00	10.36	6.00	Traza	14.00	11.00
Micronutrientes: vitaminas											
Vitamina A ^d (µg)	900 ^e	700 ^e	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	4.80	8.00	1.00	30.00
Vitamina B - Folato total (µg)	400	400	98.00	44.00	113.00	66.00	70.00	71.00	66.00	48.00	72.00
Vitamina C ^f (mg)	90	75	1.30	0.00	6.30	Traza	Traza	3.00	1.00	0.00	4.00
Vitamina E ^g (mg)	15	15	0.70	25.63	15.03	0.80	24.00	26.19	4.00	26.00	24.98

^a Fuentes: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28 (2015), Red BEDCA, Base de Datos Española de Composición de Alimentos y Banca Dati Di Composizione Degli Aliment Per Studi Epidemiologici (BDA, 2015). ^b Ingesta Diaria de Referencia (del inglés, *Dietary Reference Intakes, DRI*) para mujeres y hombres mayores de 19 años de acuerdo con *Dietary Guidelines for Americans 2015-2010*. ^c Expresado como % kcal. ^d Equivalentes de actividad de retinol (EAR). ^e mg EAR. ^f Ácido ascórbico total. ^g Equivalentes de α -tocoferol. ND, no datos.

El **perfil lipídico** es la fracción mayoritaria de macronutrientes en los frutos secos, el cual no sólo hace que sean considerados alimentos de muy alta densidad energética (segunda fuente de grasas de origen vegetal después de los aceites vegetales), sino que su compleja y única composición de ácidos grasos atribuye a los frutos secos una calidad lipídica exclusiva no registrada en otros alimentos. Esta fracción grasa se caracteriza por el alto contenido de ácidos grasos mono- y poli-insaturados, bajo contenido de ácidos grasos saturados (AGS) y libre de colesterol. Entre los AGS se destacan los ácidos monocarboxílicos como el ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) y esteárico (18:0) y, ácidos dicarboxílicos alifáticos de cadena media par como el ácido dodecanodioico (C12, 1-12) este último principalmente en avellanas (Dembitsky, et al. 2002). Las almendras y las avellanas presentan una mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) como el ácido oleico (C18:1 ω -9 cis) en comparación a su contenido de ácidos grasos poliinsaturados (AGP). Las nueces, contrario a los demás frutos secos, se caracterizan por un alto contenido de AGP como el ácido eicosapentaenóico (C20:5) y ácidos grasos de la serie omega ω -3 y ω -6 como el ácido α -linolénico (C18:3 ω -3) y el ácido linoleico (C18:2 ω -6), respectivamente (ver **Figura 2.3**). Esta composición sitúa a las nueces como principal fuente de ácido α -linolénico en una dieta de origen vegetal (USDA 2015b).

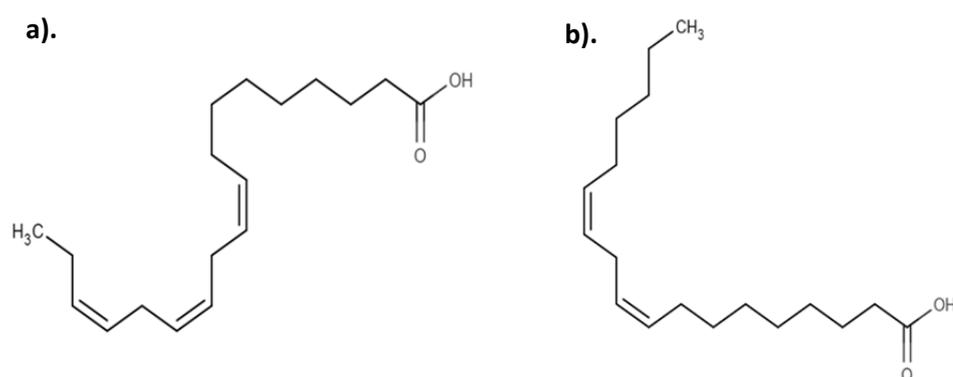


Figura 2.3. Ácidos grasos de la serie omega. a). ω -3: ácido α -linolénico (C18:3), principal ácido graso poliinsaturado en nueces y, b). ω -6: ácido linoleico (C18:2).

La fracción de **carbohidratos** es la segunda más alta de macronutrientes en los frutos secos en términos de calorías totales (Brufau, et al. 2006). Se compone mayoritariamente por carbohidratos complejos como la fibra dietética (principalmente de tipo insoluble) (Salas-Salvado, et al. 2006) en comparación con la proporción de carbohidratos simples como azúcares. Esta composición atribuye a los frutos secos como segunda fuente de fibra dietética de origen vegetal después de los cereales (Ros 2010).

El contenido total de **proteínas** en los frutos secos se considera relativamente alto, lo cual atribuye a estos alimentos como una buena fuente de proteína de origen vegetal (Brufau, et al. 2006). En cuanto a su valor biológico, se considera no muy alto debido a la presencia de un perfil limitado en algunos aminoácidos esenciales como treonina, isoleucina o metionina, en comparación con otros alimentos de origen vegetal y animal. La determinación de esta calidad proteica es producto de un puntaje o cómputo químico de aminoácidos corregido por digestibilidad proteica, donde un puntaje de proteínas de origen animal corresponde al 100% y la corrección de este valor según la digestibilidad proteica para los frutos secos es baja (48.09%) en comparación con otros alimentos de origen vegetal como las hortalizas (73.40%), los tubérculos (74.20%) y las legumbres (69.58%) o de origen animal con el huevo (97.00%) y la carne (94.00%) (Suarez Lopez, et al. 2006). Sin embargo, a diferencia de estos alimentos, con un *score proteico* más alto, los frutos secos y especialmente las nueces presentan un alto contenido en L-arginina (aminoácido no esencial) y bajo contenido en L-lisina (aminoácido esencial). El bajo índice L-lisina:L-arginina característico de los frutos secos es considerado de interés biológico en la prevención de enfermedades cardiometabólicas (Brufau, et al. 2006; Huynh and Chin-Dusting 2006; Ros 2015).

Dentro de los **micronutrientes**, los frutos secos se caracterizan por un importante contenido de **minerales** como calcio, fósforo, magnesio y potasio, en comparación con otros alimentos de origen vegetal. De acuerdo con la USDA (ver **Tabla 2.1**), el mineral que se encuentra en mayor proporción en los frutos secos es el potasio, siendo las almendras el fruto seco con mayor contenido de este mineral (733 mg/100 g), así como de calcio (269 mg/100 g), fósforo (481 mg/100 g) y,

magnesio (270 mg/100 g) en comparación con nueces y avellanas. En general, los frutos secos en presentación natural (sin presencia de aditivos) se caracterizan por un bajo contenido de sodio (<2 mg/100 g) y, un contenido apreciable de hierro (>2.91 mg/100 g). Sin embargo, la biodisponibilidad de este último mineral es baja debido a la absorción deficiente del hierro inorgánico procedente de los vegetales. También se consideran a los frutos secos como fuente importante de zinc y cobre. En su mayoría, las **vitaminas** en frutos secos son del tipo lipofílico debido a la matriz grasa predominante en estos alimentos y, la cual aumenta su biodisponibilidad. En general, los frutos secos son una excelente fuente de vitamina E, mayoritariamente en la posición isomérica de α -tocoferol (25.63 mg/100 g, 15.03 mg/100 g y 0.70 mg/100 g en almendras, avellanas y nueces, respectivamente) (USDA 2015b). β -tocoferol y γ -tocoferol también se han reportado pero en menor concentración. Dentro de las vitaminas hidrosolubles se encuentran los folatos totales, una vitamina del grupo B presente mayoritariamente en avellanas. Otras vitaminas como la A y la C se encuentran en muy bajas concentraciones o como trazas en la mayoría de frutos secos.

Compuestos fitoquímicos

Se define como compuestos fitoquímicos a un amplio y variado conjunto de nutrientes no esenciales, producto del metabolismo secundario de las plantas y, a los cuales se asocian efectos saludables como anti-oxidantes, anti-inflamatorios, anti-proliferativos, anti-virales, quimiopreventivos e hipocolesterolémicos, entre otros (Bolling, et al. 2011).

Los **compuestos (poli)fenólicos** o **(poli)fenoles**, con más de 8000 estructuras químicas caracterizadas, son el grupo más extenso y variado de compuestos fitoquímicos. Recientes estudios han demostrado que estos compuestos cuantitativamente minoritarios son de importancia biológica relevante para la salud cardiometabólica (Alasalvar and Bolling 2015; Hayes, et al. 2015; Sanchez-Gonzalez, et al. 2015; Zanotti, et al. 2015). Tradicionalmente, el reactivo de Folin-Ciocalteu es el ensayo utilizado para determinar los polifenoles totales, sin embargo, este método es inespecífico y puede detectar cualquier sustancia

reductora como azúcares, ácido ascórbico o aminas aromáticas, alterando la cuantificación (Abe, et al. 2010). Actualmente tecnologías analíticas avanzadas como cromatografía líquida (HPLC) se han incorporado en la identificación y cuantificación de estos compuestos fitoquímicos en diferentes matrices alimentarias. En este sentido, el desarrollo de una metodología analítica basada en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas para la identificación y caracterización de polifenoles en nueces ha sido reportada recientemente (Regueiro, et al. 2014). De acuerdo con diferentes técnicas de cuantificación, las nueces, las almendras y las avellanas son algunos frutos secos con mayor contenido de polifenoles en comparación con otros alimentos (ver **Figura 2.4**) (Perez-Jimenez, et al. 2010).

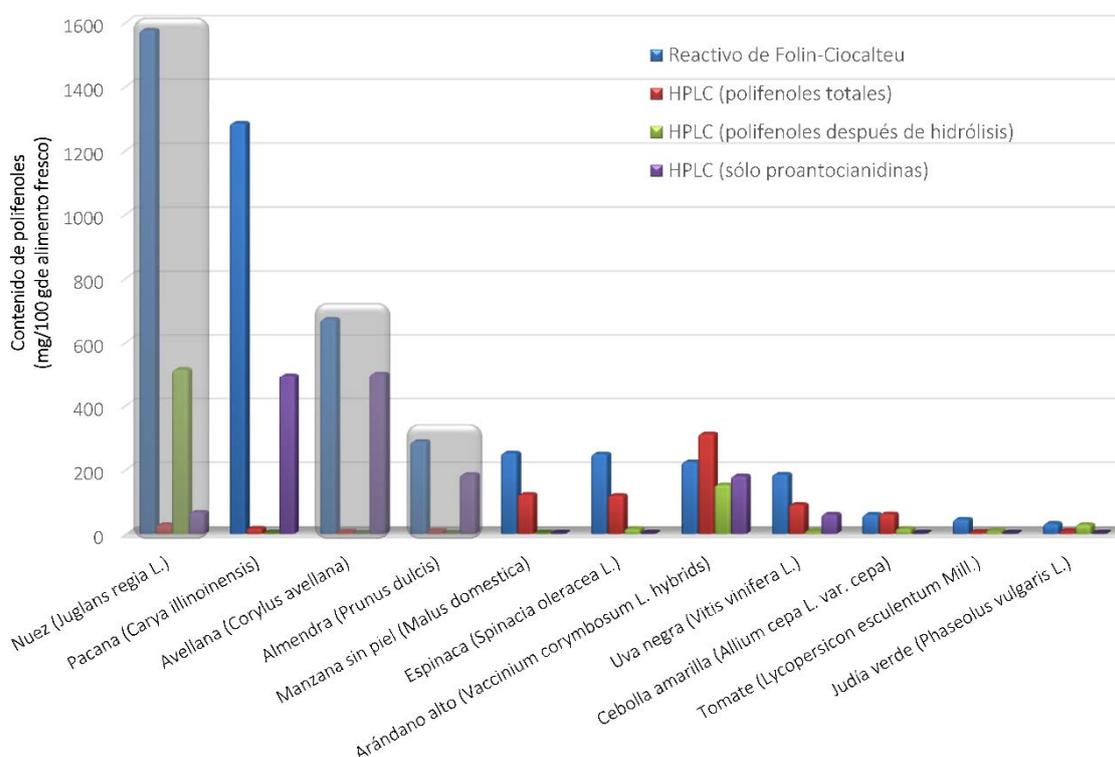


Figura 2.4. Comparación del contenido de polifenoles en algunos alimentos. Los valores reportados para el reactivo de Folin-Ciocalteu corresponden al promedio contenido en diferentes reportes científicos en la base de datos Phenol-Explorer (<http://phenol-explorer.eu/>) (Rothwell, et al. 2012; Bolling, et al. 2011). Búsqueda actualizada mayo de 2016.

Bases de datos de libre acceso como US Department of Agriculture phytochemical databases (<http://ars.usda.gov/nutrientdata>) y Phenol-Explorer ([19](http://phenol-</p>
</div>
<div data-bbox=)

explorer.eu/), son las principales fuentes de información acerca de la cantidad de compuestos fenólicos presentes en frutos secos como nueces, almendras y avellanas. En estas bases de datos, se registra el promedio de los compuestos fenólicos presentes en alimentos hasta la fecha en diferentes estudios científicos (Alasalvar and Bolling 2015). Sin embargo, las concentraciones de estos compuestos fenólicos pueden variar por motivos relacionados con las técnicas de cultivo, composición del suelo y condiciones ambientales, así como por los métodos de extracción y las técnicas de cuantificación utilizadas al momento del análisis.

La biosíntesis de los compuestos fenólicos ocurre como producto del metabolismo secundario de las plantas a través de la vía metabólica del ácido siquímico y del acetato y, la gran diversidad estructural de estos compuestos puede incluir desde moléculas monofenólicas como los ácidos fenólicos hasta moléculas poliméricas de alto peso molecular como taninos y algunos flavonoides (Rabassa, et al. 2011). Químicamente los compuestos fenólicos se caracterizan por un núcleo aromático de benceno substituido, como mínimo, por un grupo hidroxilo, comúnmente conocido como grupo fenol. El número de anillos fenólicos y los elementos que se unen a estos anillos son los que dan origen a la diversidad de compuestos fenólicos presentes en los vegetales.

En general, los compuestos fenólicos se clasifican en dos sub-grupos: **flavonoides** y **no flavonoides**, los cuales a su vez se sub-clasifican de acuerdo con la similitud de las propiedades estructurales y funcionales que exhiben los compuestos (Alasalvar and Bolling 2015; Bolling, et al. 2011). La estructura básica de los flavonoides es la del 2-fenilbenzopirona (C₆-C₃-C₆) y en este grupo se encuentran las siguientes ocho sub-clases: flavanonas, flavonas, dihidroflavonoles, flavonoles, flavan-3-oles, antocianidinas, isoflavonas y, proantocianidinas (ver **Figura 2.5**). Por otra parte, el grupo de los no flavonoides se clasifica según el número de carbonos que contiene la molécula en 13 sub-clases: fenoles simples, ácidos benzoicos, **taninos hidrolizables**, acetofenonas y ácidos fenilacéticos, ácidos cinámicos, cumarinas, benzofenonas, xantonas, estilbenos, chalconas, lignanos y secoiridoides (Rabassa, et al. 2011).

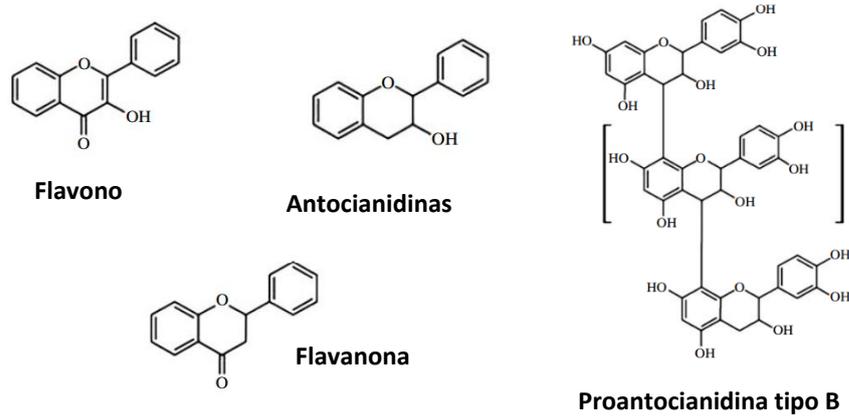


Figura 2.5. Algunos flavonoides representativos en frutos secos.
Tomado de: Bolling, et al. 2011.

En la **Figura 2.6** se presentan los principales compuestos fenólicos identificados en nueces, almendras y avellanas y, en la **Tabla 2.2** se describen rangos de concentración de los principales compuestos fenólicos reportados en estos alimentos.

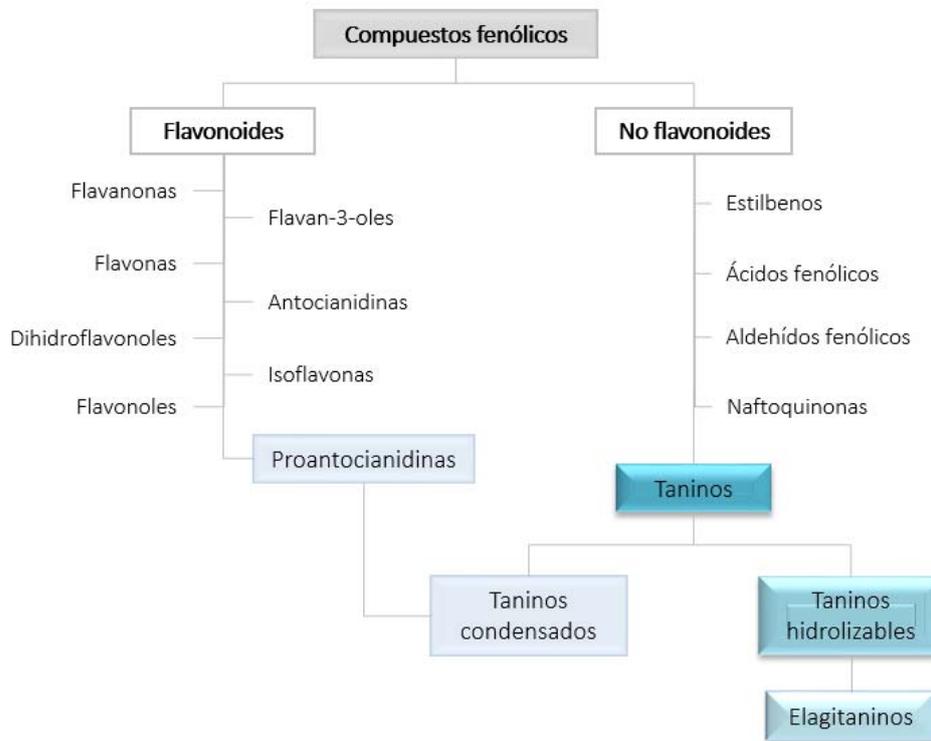


Figura 2.6. Clasificación de los principales compuestos fenólicos en nueces, almendras y avellanas. *Adaptado de:* Bolling, et al. 2011, Alasalvar and Shahidi 2009; Alasalvar and Bolling 2015.

Tabla 2.2. Compuestos fenólicos reportados para las almendras, las avellanas y las nueces (mg/100 g).

Compuestos fenólicos		Almendra	Avellana	Nueces
Fenoles totales		47 - 418	291 - 835	1558 -1625
Flavonoides		11	12	3 - 65
Estilbenos		0.008 - 0.01	ND	ND
Taninos condensados	Proantocianidinas	176	491	60
Taninos hidrolizables	Elagitaninos + ácido elágico	49 - 63	ND	6 - 823
	Galotaninos + ácido gálico	14 - 41	0.2 - 4.3	0.1
Ácidos fenólicos		0.2 - 0.7	2	36

Tomado de: Alasalvar and Bolling 2015.

Como se destaca en la **Tabla 2.2**, los taninos constituyen el grupo mayoritario en los tres tipos de frutos secos reportados en esta Tesis Doctoral, los cuales son clasificados a su vez en taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables. Las proantocianidinas, predominantemente del tipo-B, son la clase más abundante de flavonoides en almendras y avellanas, mientras que las nueces son los frutos secos con mayor contenido de taninos hidrolizables, especialmente, **elagitaninos**. Mientras que, fenoles totales, elagitaninos y ácidos fenólicos son significativamente superiores en las nueces en comparación con otros frutos secos (Alasalvar and Bolling 2015).

Las proantocianidinas son polímeros de flavanoles-3 que constituyen el producto final de la vía biosintética de los flavanoides y se metabolizan a antocianinas. Estas unidades más simples están constituídas por flavanoles unidos a uno o varios glucósidos. Diferentes estudios han demostrado que ambos compuestos (proantocianidinas y antocianinas) están asociados con efectos beneficiosos a la salud debido a sus propiedades antibacterianas, antioxidantes y antitumorales.

Tanto las proantocianidinas como los taninos hidrolizables se caracterizan por ser compuestos poliméricos de elevado peso molecular (> 1000 Da) y baja biodisponibilidad. Como consecuencia, su absorción tras la ingesta requiere una etapa previa de biotransformación por parte de la microbiota a nivel del lumen intestinal.

2.2 Metabolismo y biodisponibilidad de los elagitaninos

La estructura base de los taninos hidrolizables consiste en glucosa unida a ácido gálico (galotaninos) o ácido hexahidroxidifénico (elagitaninos), que por hidrólisis liberan ácido gálico y ácido elágico, respectivamente. Los elagitaninos se caracterizan por exhibir una estructura común compuesta por anillos hexahidroxidifenólicos (HHDP) que varían en complejidad (desde oligómeros hasta polímeros) de acuerdo con el alimento del que provienen. Entre los elagitaninos de consumo frecuente en la dieta se encuentran la punicalagina ($C_{48}H_{28}O_{30}$) y la punicalina ($C_{34}H_{22}O_{22}$) en granadas; la sanguina H6 ($C_{82}H_{54}O_{52}$), la sanguina H10 ($C_{68}H_{48}O_{44}$) y la lambertianina C ($C_{123}H_{80}O_{78}$) en bayas, frambuesas y fresas; y la vescalagina ($C_{41}H_{26}O_{26}$) y la castalagina ($C_{41}H_{26}O_{26}$) en vino de roble envejecido (García-Munoz and Vaillant 2014). En frutos secos, la **pedunculagina** ($C_{34}H_{24}O_{44}$) se ha reportado mayoritariamente en nueces, sin embargo, también se ha descrito la presencia de elagitaninos en almendras y avellanas en menor proporción (Alasalvar and Bolling 2015). Los elagitaninos, como la pedunculagina, son compuestos que se caracterizan por el gran número de grupo hidroxilo ($-OH$) en su estructura molecular, lo cual les otorga una alta polaridad y, consecuentemente, una baja biodisponibilidad. *In vitro*, estas moléculas son relativamente estables en medios ácidos e inestables en medios básicos, incluso en neutros (ver **Figura 2.7**).

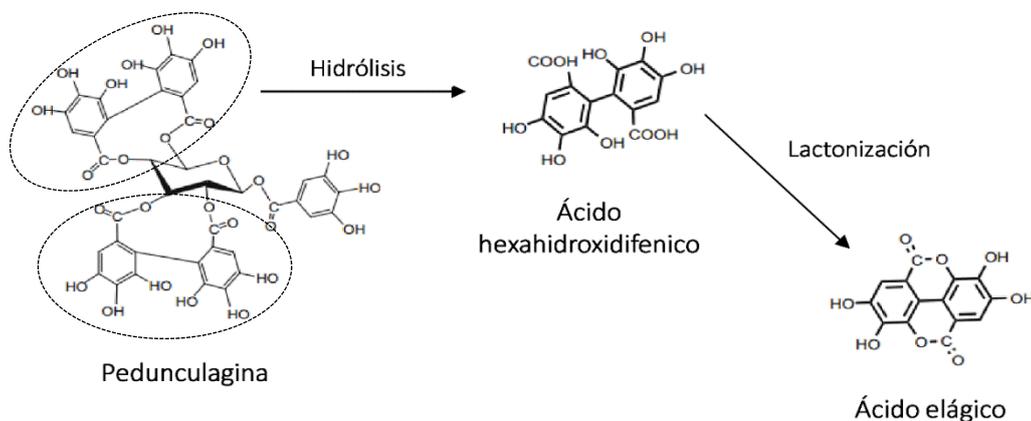


Figura 2.7. La pedunculagina es el elagitanino presente mayoritariamente en nueces. Los círculos punteados representan los dos grupos HHDP presentes en cada molécula. A través de hidrólisis enzimática, estos grupos HHDP son biotransformados en ácido elágico. *Adaptado de:* Espin, et al. 2013.

En condiciones fisiológicas, el metabolismo de los elagitaninos inicia con la biotransformación de estos compuestos en **ácido elágico**, a través de una hidrólisis enzimática microbial (*Tanasa-hidroxisilasa*) a condiciones de pH ácido en el estómago, reacción que produce la liberación de los grupos HHDP presentes en los elagitaninos, que posteriormente, son biotransformados en ácido elágico a través de una reacción de lactonización espontánea o por medio de una reacción enzimática microbial (*Lactonasa*) en el medio básico propio del duodeno, parte proximal del intestino delgado (ver **Figura 2.8**). Una baja concentración de ácido elágico y residuos de elagitaninos son absorbidos a través de los enterocitos y transportados a nivel sistémico por medio de la vena porta. Sin embargo, la mayor parte del ácido elágico es transportado hacia el colón, donde la microbiota intestinal biotransforma este compuesto en moléculas más simples que se ha demostrado presenta mayor biodisponibilidad, como son las **urolitinas**. Estos compuestos bioactivos están asociados con efectos saludables como agente quimiopreventivo, anti-inflamatorio y anti-oxidante (Garcia-Munoz and Vaillant 2014; Espin, et al. 2013).

La formación de estos compuestos de bajo peso molecular (urolitinas) se produce por la eliminación gradual de grupos hidroxilo a través de reacciones de deshidroxilación enzimática (*dehidroxilasas*) por interacción con la microbiota intestinal (metabolismo de fase I), biotransformando progresivamente compuestos pentahidroxílicos (urolitina D) a monohidroxílicos (urolitina B), lo cual incrementa su lipofilia y capacidad de absorción. La urolitina D ha sido encontrada principalmente en el yeyuno (parte intermedia del intestino delgado entre el duodeno e íleon) en cerdos ibéricos (Espin, et al. 2013), mientras que las demás urolitinas (C, A y B) se han reportado mayoritariamente en colón y heces. A continuación, estos metabolitos son absorbidos a través de los colonocitos y son transportados por medio de la vena porta al hígado, donde ocurre principalmente, reacciones de conjugación enzimática con moléculas endógenas (glucurónidos, sulfatos o sulfatoglucurónidos) con el fin de aumentar su polaridad y, en consecuencia su bioaccesibilidad y posterior eliminación por vía renal (metabolismo fase II). Estas reacciones de metabolismo de fase II pueden ocurrir tanto en colonocitos como en hepatocitos, siendo mayoritariamente su

biotransformación en el hígado. Entre los metabolitos conjugados detectados con mayor frecuencia se encuentran los glucurónidos y sulfatos.

La variedad de las urolitinas producidas tras la ingesta de alimentos ricos en elagitaninos depende de la composición de la microbiota, el tiempo de exposición a la microbiota intestinal y, eventualmente, al tipo de enzimas deshidroxilasas involucradas (Gonzalez-Barrio, et al. 2011). Esta elevada variabilidad inter-individualidad, se atribuye no sólo a factores genéticos, sino mayoritariamente a las diferencias en la microbiota intestinal (Tomas-Barberan, et al. 2014; Garcia-Munoz and Vaillant 2014; Zanotti, et al. 2015).

Poca información existe acerca de la microbiota intestinal asociada a la producción de urolitinas, sin embargo, investigaciones recientes han identificado que dos cepas de la familia *Coriobacteriaceae*, género *Gordonibacter* se relacionan con la transformación de diferentes polifenoles en moléculas bioactivas y en la producción de estos metabolitos (Gupta, et al. 2013; Selma, et al. 2014a; Selma, et al. 2014b). Selma *et al.* 2014 demostraron que las cepas *Gordonibacter pamelaee* y *Gordonibacter urolithinifaciens* tienen la capacidad de producir la urolitina M-5, urolitina M-6 y urolitina C a partir del catabolismo del ácido elágico durante la fase estacionaria de crecimiento bacterial en condiciones anaerobias (Selma, et al. 2014b). Previamente, la presencia de *G. pamelaee* ha sido reportada en un paciente con enfermedad de Crohn (Wurdemann, et al. 2009) y, en un voluntario saludable (Jin, et al. 2007). *G. urolithinifaciens* fue aislada en las heces de una mujer sana a una alta concentración ($\geq 10^7$ cfu/g heces) luego de una intervención con ingesta de nueces durante un año (Selma, et al. 2014b).

En términos de biodisponibilidad, el ácido elágico ha sido detectado en plasma humano una hora después de la ingesta, aunque en concentraciones bajas. Mientras que los derivados conjugados de las urolitinas A y B han sido generalmente reportados en muestras de plasma 24 horas después de la ingesta, con un máximo de concentración entre las 48 y 72 horas (Garcia-Munoz and Vaillant 2014; Espin, et al. 2013).

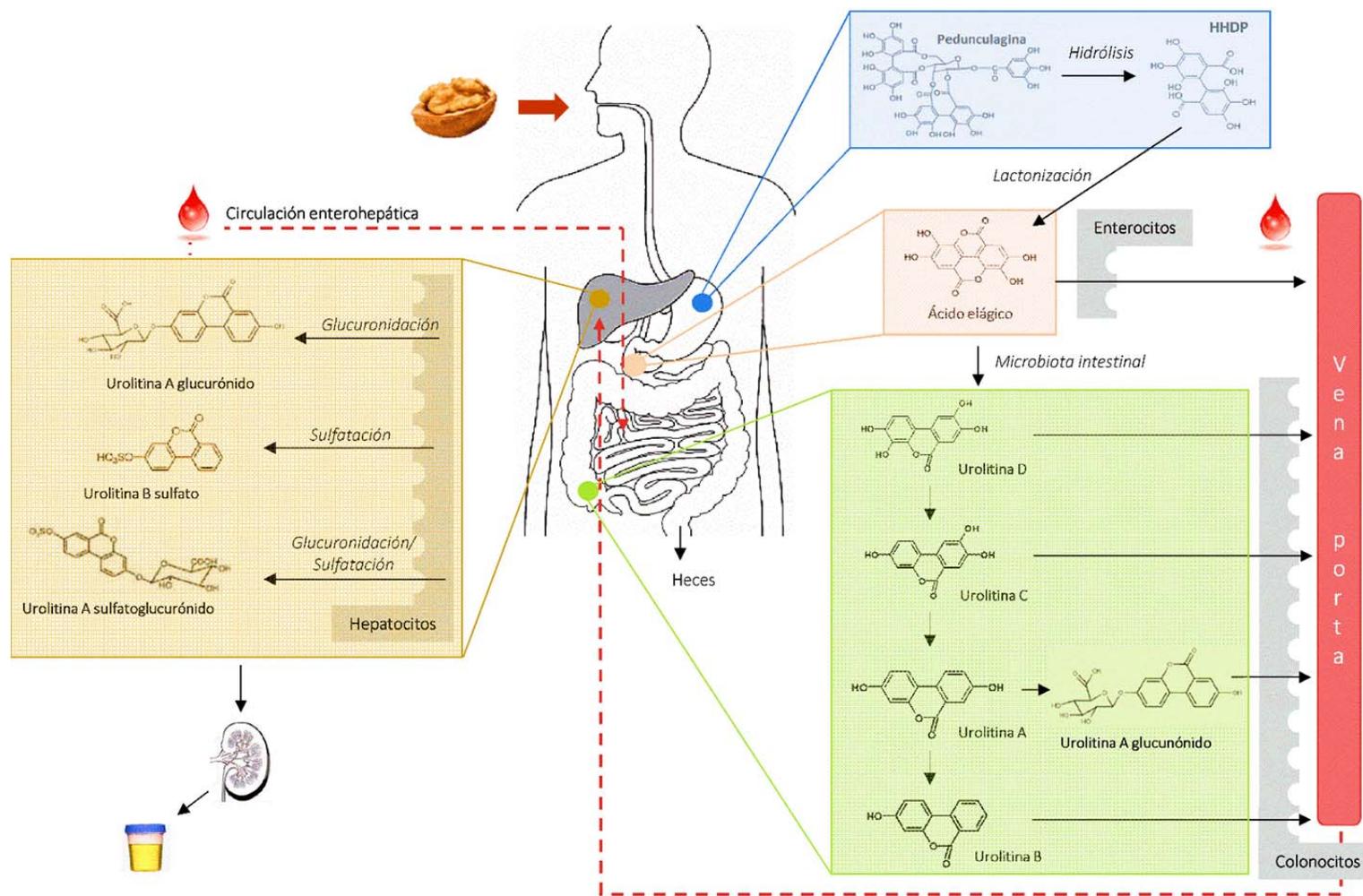


Figura 2.8. Biotransformación de elagitaninos en compuestos bioactivos como urolitinas A y B, producto de la acción enzimática y de la microbiota intestinal. *Adaptado de:* Tulipani, et al. 2012; Garcia-Munoz and Vaillant 2014; Espin, et al. 2013; Zanotti, et al. 2015.

2.3 Ingesta de frutos secos y síndrome metabólico

El **síndrome metabólico** es una constelación de factores fisiológicos, bioquímicos, clínicos y metabólicos correlacionados entre sí, que incrementan hasta 5 veces el riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo II (Gao, et al. 2016) y, la presencia de diabetes mellitus tipo II incrementa de 2 a 5 veces el desarrollo de enfermedad cardiovascular, especialmente en mujeres (World Health Organization 2011). Además, este síndrome está asociado con otras complicaciones en la salud no menos complejas como son accidentes cerebrovasculares, cáncer de mama, próstata y colon, amputación de extremidades, ceguera y enfermedades renales y biliares (Haimovici 1979; Uzunlulu, et al. 2016; van Rooy and Pretorius 2015). Se estima que cerca del 20-25% de la población adulta a nivel mundial presenta síndrome metabólico y, las evidencias sugieren que estas cifras están en aumento proporcional con la prevalencia de obesidad y diabetes mellitus tipo II, convirtiéndose el síndrome metabólico en un problema de salud pública a nivel mundial (Gao, et al. 2016; World Health Organization 2011).

Factores ambientales y genéticos están asociados al desarrollo de síndrome metabólico. Entre los factores ambientales se destaca la inactividad física, el tabaquismo, la ingesta excesiva de alimentos altamente energéticos así como constantes episodios de estrés, mientras que como factores genéticos se asocia tanto el genotipo como el fenotipo ahorrador (Kaur 2014). Aunque la definición de síndrome metabólico sigue siendo debatida y en continua revisión (ver **Tabla 2.3**), este síndrome es universalmente conocido como el conjunto de alteraciones metabólicas que incluye obesidad abdominal, alteración en el control glucémico, hipertensión arterial y, desequilibrio del perfil lipídico (disminución de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad -c-HDL- y aumento de niveles de triglicéridos -TG-) (ver **Figura 2.9** y **Tabla 2.4**) (Alberti, et al. 2009). Asimismo, el síndrome metabólico puede estar relacionado con otros componentes como deterioro del estado oxidativo e inflamación crónica de bajo grado (Mahjoub and Masrou-Roudsari 2012; Monteiro and Azevedo 2010).

Tabla 2.3. Diferentes definiciones de los criterios diagnósticos de síndrome metabólico (1998 – 2005).

	Criterios diagnósticos	WHO (1998)	EGIR (1999)	NCEP ATP-III (2001)	AAEC (2002)	IDF (2005)	AHA - NHLBI (2005)
Generalidades	Criterio fundamental	Resistencia a la insulina	Resistencia a la insulina	Ninguno	Ninguno	Circunferencia de cintura	NR
	Número de criterios para el diagnóstico	≥ 2	≥ 2	≥ 3	Según criterio médico	≥ 2	≥ 3
Obesidad	Circunferencia de cintura (cm)	NR	≥ 94 ♂ & ≥ 80 ♀	> 102 ♂ & > 88 ♀	NR	Según etnia	≥ 102 ♂ & ≥ 88 ♀
	IMC (kg/m ²)	> 30	NR	NR	≥ 25	NR	NR
	ICC	> 0.9 ♂ & > 0.88 ♀	NR	NR	NR	NR	NR
Hipertensión	PAS/PAD (mm Hg)	≥ 140/90	≥ 140/90	≥ 130/85	≥ 130/85	≥ 130/85	≥ 130 o ≥ 85
	Tratamiento	NR	SR	NR	NR	SR	SR
Dislipidemia	TG (mg/dL)	≥ 150	≥ 180	≥ 150	≥ 150	≥ 150	≥ 150
	c-HDL (mg/dL)	< 35 ♂ & < 39 ♀	< 40 ♂ & < 50 ♀	< 40 ♂ & < 50 ♀	< 40 ♂ & < 50 ♀	< 40 ♂ & < 50 ♀	< 40 ♂ & < 50 ♀
	Tratamiento	NR	SR	NR	NR	SR	SR
Control glucémico	Glucosa en ayunas (mg/dL)	NR	> 110	> 110	Alteración (no se reporta umbral)	> 100	≥ 100
	Diabetes mellitus tipo II	NR	Se excluye	NR	SR o antecedentes familiares	SR	NR
	Tratamiento	NR	NR	NR	NR	NR	SR
Otros		Microalbuminuria (> 30 mg/g)	NR	NR	> 40 años, sedentarismo y/o antecedentes de enfermedad cardiovascular	NR	NR

Abreviaturas: NR (no se requiere), SR (se requiere), ♂ (hombres), ♀ (mujeres), PAS (presión arterial sistólica) y PAD (presión arterial diastólica). *Adaptado de:* O'Neill and O'Driscoll 2015; Kaur 2014.

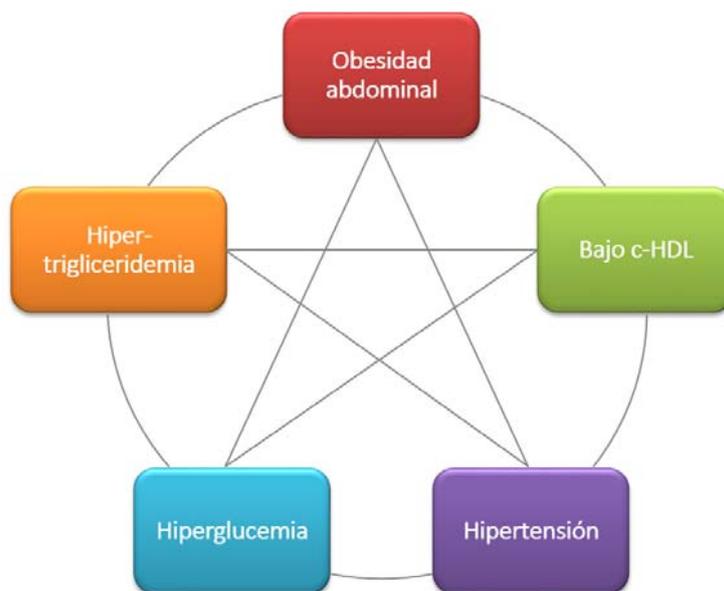


Figura 2.9. Correlación entre los diferentes componentes diagnósticos de síndrome metabólico de acuerdo con la definición armonizada (2009).

Adaptado de: Mendizabal, et al. 2013.

Tabla 2.4. Criterios diagnósticos de síndrome metabólico armonizados (2009).

Criterios diagnósticos	Valores umbrales
Elevada circunferencia de cintura ^a	Definición específica según la población y el país
Triglicéridos elevados (un indicador alternativo es el tratamiento farmacológico para triglicéridos elevados) ^b	≥ 150 mg/dL
Reducción de colesterol HDL (un indicador alternativo es el tratamiento para colesterol HDL reducido) ^b	< 40 mg/dL para hombres y < 50 mg/dL para mujeres
Presión arterial elevada (un indicador alternativo es el tratamiento farmacológico con antihipertensivos en un paciente con antecedentes de hipertensión arterial)	sistólica ≥ 130 mm Hg y/o diastólica ≥ 85 mm Hg
Elevada glucemia basal en ayunas (un indicador alternativo es el tratamiento farmacológico para glucosa elevada) ^c	≥ 100 mg/dL

^a La circunferencia de cintura para la población europea se considera ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres según la Sociedad Europea Cardiovascular; para los demás países y etnias, la IDF considera diferentes puntos de corte tanto para hombres como para mujeres en obesidad abdominal. ^b Los fármacos más utilizados para la reducción de los triglicéridos elevados y c-HDL son los fibratos y ácido nicotínico. Un paciente que toma uno de estos fármacos puede presumir de tener niveles altos de triglicéridos y bajos niveles de c-HDL. Las dosis altas de ácidos grasos ω-3 presumen niveles altos de triglicéridos. ^c La mayoría de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tendrán síndrome metabólico según los criterios propuestos.

Posterior a esta definición armonizada (2009) de síndrome metabólico, la Organización Mundial de la Salud en 2010 propuso la exclusión de sujetos que han sido diagnosticados con diabetes mellitus tipo II (y/o glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl) o enfermedad cardiovascular (y/o antecedentes de infarto agudo de miocardio, síndromes coronarios o ictus), los cuales serían incluidos en un nuevo concepto denominado síndrome metabólico premórbido (Simmons, et al. 2010). Los criterios y los valores umbrales que definen el diagnóstico de síndrome metabólico utilizados en los estudios reportados en esta Tesis Doctoral, corresponden a los propuestos por la definición armonizada (ver **Tabla 2.4**) (Alberti, et al. 2009).

2.3.1 Evidencias científicas

El desarrollo de síndrome metabólico depende tanto de factores genéticos como de condiciones ambientales, siendo la dieta uno de los principales factores de exposición al riesgo de enfermedad. En este sentido, la modificación del estilo de vida sigue siendo la intervención inicial por elección en la prevención y el tratamiento de síndrome metabólico. Las terapias modernas combinan recomendaciones estratégicas de comportamiento relacionadas con cambios específicos en la dieta y la práctica regular de ejercicio físico. Mientras que el tratamiento farmacológico es considerado sólo para aquellos sujetos cuyos factores de riesgo no se reducen de manera adecuada con los cambios de estilo de vida (Kaur 2014). Los efectos saludables asociados al consumo regular de nueces, almendras y avellanas se han demostrado tanto por estudios epidemiológicos como clínicos en la prevención y tratamiento de síndrome metabólico (Blanco Mejía, et al. 2014; Kendall, et al. 2010). Según un reciente meta-análisis, existen más de 100 estudios clínicos reportados en la literatura científica, sin embargo, más del 70% de estos estudios se caracterizan por una baja calidad (Methodological Quality Score < 8) y, más del 60% son estudios de corta duración (< 12 semanas) (Blanco Mejía, et al. 2014). Hasta la fecha se reportan cinco estudios epidemiológicos en los cuales se evalúa la asociación entre la prevalencia e incidencia de síndrome metabólico y el consumo de frutos secos. En dos de los

cinco estudios se evidencia una disminución en la prevalencia de síndrome metabólico y, en uno de los estudios reportados con 6 años de seguimiento sugiere una disminución en la incidencia de síndrome metabólico (Salas-Salvado, et al. 2014). Estos resultados evidencian una asociación inversa y significativa entre el consumo de frutos secos y la incidencia y prevalencia de síndrome metabólico (ver **Tabla 2.5**).

Tabla 2.5. Estudios epidemiológicos de consumo de frutos secos y componentes de síndrome metabólico.

Estudio	Diseño	Sujetos (n)	Seguimiento (años)	Exposición	Resultados
ARIC	Prospectivo	9514 sujetos saludables	9	Consumo de frutos secos totales y manteca de cacahuates (basal)	No hay asociaciones
NHANES 1999-2004	Transversal	13292 sujetos saludables	-	Consumo de ≥ 18 vs ≤ 18 g de frutos secos y manteca de cacahuates	Baja prevalencia de síndrome metabólico, obesidad abdominal, hipertensión, c-HDL y glucosa en ayunas
SUN	Prospectivo	9887 sujetos saludables	6	≥ 2 raciones de almendras vs no consumidores (basal)	Baja incidencia de síndrome metabólico, obesidad abdominal y glucosa en ayunas en mujeres
PREDIMED	Transversal	7210 sujetos con alto riesgo cardiovascular	-	> 3 raciones por semana vs < 1 ración por semana	Baja prevalencia de síndrome metabólico y obesidad abdominal
NHANES 2005-2010	Transversal	14386 sujetos en riesgo	-	$< 1/4$ de onza/día (no consumidores) vs $\geq 1/4$ de onza/día de frutos secos	Bajo IMC, obesidad abdominal y presión arterial sistólica

Adaptado de: Salas-Salvado, et al. 2014; O'Neil, et al. 2015.

En cuanto a estudios clínicos, Blanco-Mejia *et al.* 2014 han descrito en un reciente meta-análisis 49 estudios aleatorizados y controlados que evalúan el efecto del consumo de frutos secos en relación con los criterios diagnósticos de síndrome metabólico (Blanco Mejia, et al. 2014). En este meta-análisis, el consumo de diferentes frutos secos fue evaluado, siendo el consumo de nueces y almendras, los frutos secos más reportados con 13 estudios clínicos en cada caso, las avellanas fueron reportados en tres estudios clínicos y, el consumo de una mezcla de frutos secos que incluían en diferentes proporciones nueces, almendras y avellanas fueron evaluados en dos estudios clínicos (Blanco Mejia, et al. 2014).

Frutos secos y control glucémico

Evidencias científicas acerca del efecto del consumo de frutos secos en el control glucémico, incluye asociaciones con respecto a la secreción y resistencia a la insulina, glicemia y riesgo de diabetes mellitus tipo II. Estudios prospectivos de cohorte como el Nurses' Health Study (NHS), Nurses' Health Study (NHS II), Shanghai Women's Health Study, y, el estudio PREDIMED, evidencian una disminución de riesgo de diabetes mellitus tipo II de 27%, 33%, 20%, y, 52%, respectivamente (Salas-Salvado, et al. 2014; Salas-Salvado, et al. 2011). En el seguimiento del estudio NHANES 2005-2010 se reporta una reducción significativa del HOMA-IR en los sujetos que mantienen una ingesta usual $\geq 1/4$ de onza/día en comparación al grupo control ($< 1/4$ de onza/día) (O'Neil, et al. 2015). Aunque los resultados de los estudios de cohorte parecen ser inconsistentes, en términos generales se sugiere que una ingesta regular de frutos secos puede disminuir la hiperglicemia por mecanismos de control glucémico postprandial e incremento de la excreción y sensibilidad a la insulina, especialmente en sujetos prediabéticos. Además, se sugiere que los frutos secos pueden reducir el impacto postprandial en la demanda de insulina por alimentos ricos en carbohidratos cuando son consumidos con frutos secos. Estos efectos son dosis-dependientes tal como lo señalan diferentes estudios que incluyen ingestas de 28 a 90 g/d de frutos secos (Salas-Salvado, et al. 2014). En cuanto a parámetros clínicos como hemoglobina glicosilada (HBA_{1c}) se reportan resultados inconsistentes. Cuatro de los cinco estudios epidemiológicos reportados a la fecha, no evidencian cambios significativos. Mientras que un estudio con 117 sujetos diagnosticados con diabetes mellitus tipo II y, quienes recibieron una suplementación de 75 g/d de una mezcla de frutos secos durante 3 meses, exhibieron un significativo decrecimiento de HBA_{1c} en comparación con el grupo control (Jenkins, et al. 2011).

Frutos secos y obesidad abdominal

Recientes meta-análisis evidencian que no se presentan efectos estadísticamente significativos relacionados con el diámetro de circunferencia de cintura en sujetos que han recibido una intervención con frutos secos en comparación con el grupo

control (Blanco Mejia, et al. 2014; Flores-Mateo, et al. 2013). Sin embargo, en los grupos de intervención que además de realizar la ingesta de frutos secos presentaban una baja ingesta de carbohidratos, se observó una reducción estadísticamente significativa de la circunferencia de cintura (Blanco Mejia, et al. 2014). A pesar de estas evidencias, estudios puntuales de cohorte transversal, observacional y clínico, aportan resultados interesantes. Un estudio transversal con población mediterránea (estudio PREDIMED) y elevado riesgo cardiovascular evidenció que tanto el IMC como la circunferencia de cintura fueron asociados con un decrecimiento de 0.78 y 2.1 cm, respectivamente, al consumir raciones de 30 g de frutos secos (Casas-Agustench, et al. 2011a). Asimismo, resultados del estudio de Seguimiento de la Universidad de Navarra (estudio SUN) con estudiantes universitarias saludables, sugiere que quienes consumen frutos secos ≥ 2 veces/semana presentan reducción de hasta un 31% de riesgo de aumentar de peso (Bes-Rastrollo, et al. 2007) y, disminuye en un 33% el riesgo de obesidad en mujeres (Bes-Rastrollo, et al. 2009). Adventist Health Study evidencia una correlación inversa entre los sujetos que consumen frutos secos ≥ 5 veces/semana e IMC en comparación con quienes nunca o rara vez consumen frutos secos (Fraser, et al. 1992) y, en su segunda etapa del Adventist Health Study-2, además de demostrar una fuerte asociación inversa entre la obesidad y el consumo de frutos secos, se evidencian diferencias de efectos de acuerdo con el tipo de fruto seco consumido (Jaceldo-Siegl, et al. 2014). En el Physicians`Health Study no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el IMC en una cohorte de hombres que siguieron un consumo de ≥ 2 veces/semana de frutos secos durante 16 años (Albert, et al. 2002). En el seguimiento del estudio NHANES 2005-2010 se reportó una reducción significativa en IMC y circunferencia de cintura en los sujetos que mantienen una ingesta usual $\geq 1/4$ de onza/día en comparación al grupo control ($< 1/4$ de onza/día) (O'Neil, et al. 2015).

Frutos secos y dislipidemia

Diferentes estudios clínicos han demostrado que un consumo regular de frutos secos, disminuye los niveles de colesterol total y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL); sin embargo, las evidencias acerca del impacto en

triglicéridos y c-HDL aún no son contundentes. Blanco Mejia, *et al.* 2014 reportan en su meta-análisis diferencias significativas entre sujetos saludables que consumieron frutos secos en comparación con el grupo control. Sin embargo, este mismo efecto no fue observado en sujetos con dislipidemia, síndrome metabólico o diabetes mellitus tipo II. El efecto del tipo de fruto seco también fue evaluado, presentando mayor reducción significativa en los niveles de triglicéridos en plasma, sujetos que consumen nueces y pistachos en comparación con quienes consumen almendras ($p < 0.05$) y, a su vez, quienes consumen almendras, macadamia, nueces y pistacho presentan una reducción de triglicéridos en plasma significativa ($p < 0.05$) en comparación con quienes consumen avellanas. En este mismo meta-análisis no se evidenciaron diferencias significativas en las concentraciones de c-HDL tras un consumo de frutos secos (Blanco Mejia, *et al.* 2014). Otro meta-análisis en el cual 13 estudios clínicos fueron seleccionados (> 300 sujetos incluidos en total), las concentraciones de c-HDL y triglicéridos no evidenciaron un efecto estadísticamente significativo asociado al consumo de nueces (Banel and Hu 2009). Mientras que, en un análisis combinado de 25 estudios clínicos que integró 7 países y 583 participantes, con el fin de evaluar la relación entre el consumo de diferentes tipos de frutos secos (consumo medio de 67 g/d) y, los perfiles lipídicos en sujetos normolipidémicos e hiperlipidémicos, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de triglicéridos y c-HDL en plasma tras un consumo diario de frutos secos en sujetos normolipidémicos, mientras que, en sujetos hipertrigliceridémicos se observó una reducción significativa de 20.6 mg/dL en las concentraciones de triglicéridos en plasma (Sabate, *et al.* 2010). En el seguimiento del estudio NHANES 2005-2010 se reportó un aumento significativo de c-HDL en los sujetos que mantienen una ingesta usual $\geq 1/4$ de onza/día en comparación al grupo control ($< 1/4$ de onza/día) (O'Neil, *et al.* 2015). De acuerdo con los resultados del estudio PREDIMED el consumo de frutos secos en individuos con hipertriglicemia puede tener efectos beneficiosos en el componente lipídico de síndrome metabólico (Estruch, *et al.* 2006).

Frutos secos e hipertensión

Reportes establecidos en recientes meta-análisis no evidencian un cambio significativo de presión arterial sistólica o presión arterial diastólica siguiendo un consumo de frutos secos. Sin embargo, se observó una reducción significativa de presión arterial sistólica en sujetos que, además de seguir una ingesta regular de frutos secos, siguen una ingesta alta en fibra y/o baja en carbohidratos (Blanco Mejia, et al. 2014). Interesantemente, dos estudios de cohorte prospectiva han establecido como objetivo principal, evaluar la asociación entre la incidencia de hipertensión y el consumo de frutos secos en sujetos saludables. El primero de ellos corresponde al Physicians`Health Study, en el cual hombres delgados, no obesos, presentaban una reducción de riesgo de hasta un 18% de desarrollar hipertensión al consumir frutos secos ≥ 7 veces/semana (Djousse, et al. 2009). Asimismo, en el estudio de cohorte de Seguimiento de la Universidad de Navarra (SUN), no se asociaron cambios significativos entre el consumo de frutos secos y la incidencia de hipertensión (Martinez-Lapiscina, et al. 2010). En el seguimiento del estudio NHANES 2005-2010 se reporta una reducción significativa en presión sistólica en los sujetos que mantienen una ingesta usual $\geq 1/4$ de onza/día en comparación al grupo control ($< 1/4$ de onza/día) (O'Neil, et al. 2015). En estudios de intervención con ingestas entre 30 a 108 g/d de frutos secos, en sujetos saludables y con elevado riesgo cardiovascular, se evidenciaron resultados contradictorios. En la mayoría de los estudios no se reportan cambios significativos en presión sanguínea, en algunos estudios se reportó una reducción de presión sistólica y diastólica al seguir una dieta enriquecida con frutos secos y, sólo en un estudio se describió un aumento en la presión sanguínea siguiendo una ingesta de frutos secos (Salas-Salvado, et al. 2014).

2.3.2 Potenciales mecanismos de acción

Hasta la fecha, los efectos saludables asociados al consumo de frutos secos en sujetos diagnosticados con síndrome metabólico están prioritariamente asociados con la mejora de estados de inflamación, estrés oxidativo y función endotelial, que a su vez se asociaría a un aumento de la sensibilidad y secreción de insulina, y una

disminución del riesgo de obesidad abdominal, hipertensión, dislipidemia y, diabetes mellitus tipo II (Ros 2010). Estos efectos saludables asociados con la prevención y el tratamiento de síndrome metabólico son producto de la respuesta metabólica al perfil nutricional y a la diversidad de compuestos bioactivos minoritarios presentes en los frutos secos (Salas-Salvado, et al. 2014).

A pesar del elevado contenido lipídico de los frutos secos, las evidencias científicas sugieren que su ingesta no se asocia a ganancia de peso corporal, por el contrario, se observa disminución de parámetros relacionados con obesidad, tales como IMC, circunferencia de cintura e índice cintura cadera (ver apartado sobre Frutos secos y obesidad abdominal del presente documento). Entre los lípidos “saludables” de los frutos secos se destacan los ácidos grasos insaturados, principalmente los PUFAs (por ejemplo, el ácido α -linolénico presente mayoritariamente en las nueces) que, además de ser una molécula con mayor susceptibilidad a la oxidación de c-LDL, se caracteriza por una alta capacidad anti-oxidante que puede contrarrestar el efecto pro-oxidante de las grasas (Kris-Etherton, et al. 2008) y, al igual que el ácido elágico exhibir propiedades anti-inflamatorias (ver **Figura 2.10**). Los MUFAs se asocian con una mejora en la eficiencia de la función de células β mediante el aumento de la secreción de péptido glucagón ligado-1, la cual participa en la regulación de la glucemia postprandial y la sensibilidad a la insulina. Asimismo, estos MUFAs y PUFAs pueden reducir las concentraciones séricas del tromboxano vasoconstrictor-2, produciendo la regulación de la presión arterial y la protección contra la hipertensión (Casas-Agustench, et al. 2011c).

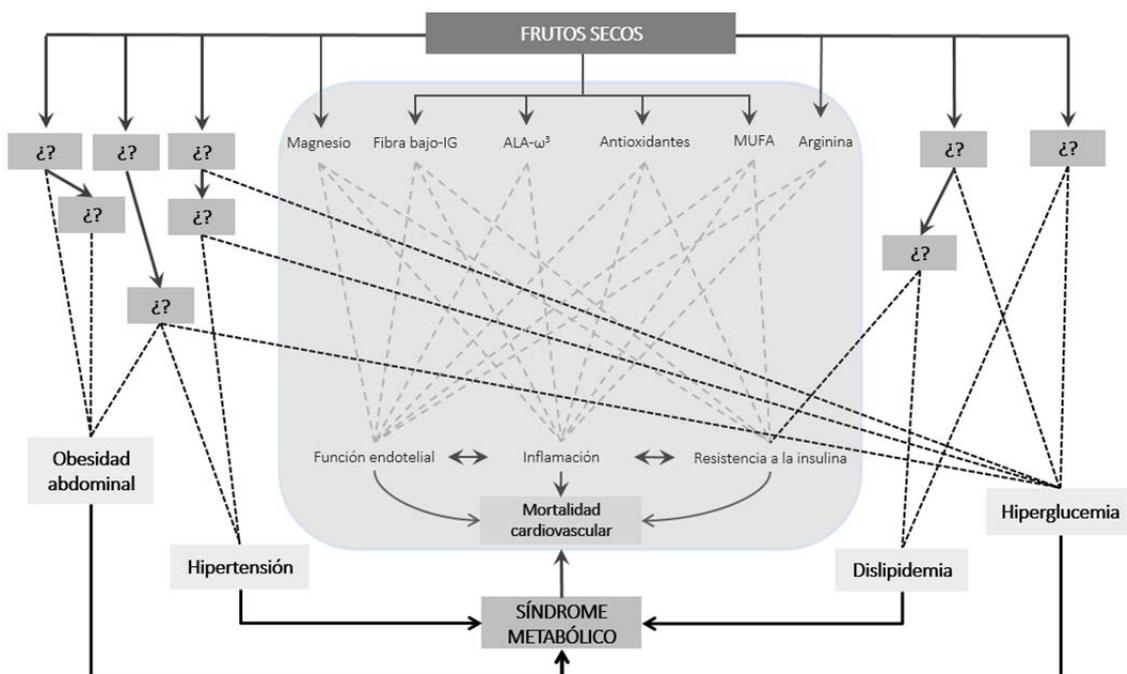


Figura 2.10. Perfil nutricional de frutos secos y su asociación con mecanismos de acción relacionados con alteraciones metabólicas. Evidencias reportadas hasta la fecha. La exploración de nuevos componentes de los frutos secos es necesaria para elucidar nuevos mecanismos asociados a parámetros de síndrome metabólico.

Adaptado de: Casas-Agustench, et al. 2010.

Los mecanismos asociados a esta respuesta metabólica no sólo están relacionados con el contenido de ácidos grasos presentes en los frutos secos, sino también a la acción sinérgica de otros componentes como la fibra dietética la cual podría aumentar la saciedad y, disminuir la ingesta de energía de otras fuentes, así como reducir secreciones postprandiales de glucosa, mejorando tanto los estados de inflamación como la resistencia a la insulina y, macronutrientes como las proteínas, donde el alto contenido en nueces del aminoácido no esencial L-arginina es considerado un potente precursor del óxido nítrico (NO) vasodilatador endógeno que favorece la reactividad vascular (Ros 2010). Sin embargo, múltiples componentes de los frutos secos aún pueden no estar identificados, así como los productos de su metabolismo, lo cual hace necesaria esta exploración con el fin de elucidar nuevos mecanismos asociados al consumo de los frutos secos y parámetros clínicos de síndrome metabólico.

En relación a los efectos asociados al consumo de frutos secos y la obesidad, algunos mecanismos se han descrito hasta la fecha (ver **Figura 2.11**), entre los

cuales se destaca la masticación incompleta, la disminución del apetito por causa del aumento de las hormonas gastrointestinales asociadas con la sensación de saciedad (glucagón–ligado a proteína 1 (GLP-1) y colescistokinnina (CCK)), la mala absorción y/o la absorción incompleta de ácidos grasos y, el aumento de la termogénesis, entre otros.

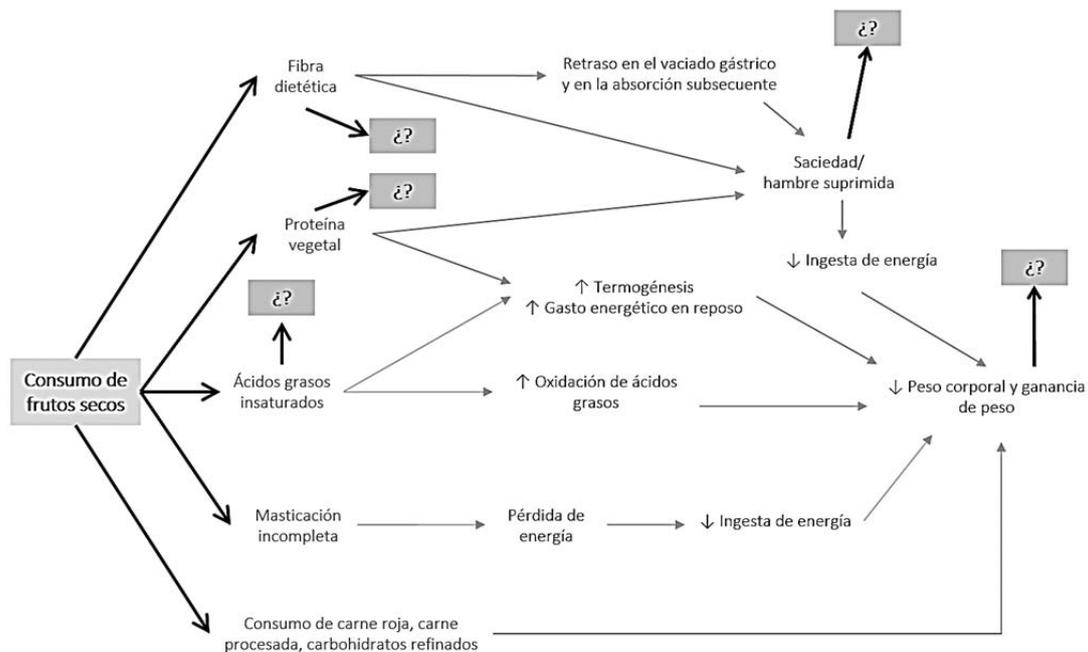


Figura 2.11. Potenciales mecanismos de acción asociados al consumo de frutos secos y obesidad (pérdida de peso corporal). La identificación de los componentes de los frutos secos (o producto de su metabolismo) puede abrir nuevas hipótesis acerca de los efectos en la salud metabólica. *Adaptado de:* Jackson and Hu 2014.

En relación a micronutrientes como los minerales, el alto contenido de magnesio está asociado con una reducción de la inflamación periférica, lo cual mejora la resistencia a la insulina y, estimula la producción de óxido nítrico y prostaciclina vasodilatadoras, parámetros asociados con la mejora del estado de salud cardiovascular (Barbagallo, et al. 2003). En caso contrario, concentraciones de magnesio inferiores a los niveles normales, se asocia con síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo II y enfermedades cardiovasculares (Ros 2015). Asimismo, el potasio es otro de los minerales que se encuentra en mayor proporción en los frutos secos sobretodo en almendras. La presencia de este mineral está asociada con la reducción del líquido extracelular, lo cual disminuye la influencia de la angiotensina y, por tanto, relaja el músculo liso vascular que mejora la respuesta a

la resistencia vascular periférica y, por consiguiente, reduce el riesgo de hipertensión. En general, los frutos secos al ser pobres en sodio y ricos en magnesio, potasio y calcio están asociados con efectos beneficiosos a la presión sanguínea, incluyendo mecanismos como la inhibición de la hormona paratiroidea (la cual induce hipertensión) al incrementar los niveles de calcio extracelular (Grosso and Estruch 2016).

De acuerdo con estos resultados, el Comité Científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2011 ha indicado una relación causa-efecto entre el consumo de nueces y la mejora de la vasodilatación dependiente del endotelio. Este panel ha considerado que esta aclaración es válida sólo si se consume como mínimo 30 g/d de nueces en el contexto de una dieta equilibrada (EFSA 2011).

Sin embargo, muchos componentes de los frutos secos así como los mecanismos de acción relacionados con sus efectos en la salud pueden ser aún desconocidos. El estudio de estos componentes puede abrir nuevas hipótesis acerca de los efectos saludables asociados a estos alimentos en la mejora y la prevención de patologías asociadas con alteraciones metabólicas. Análisis metabolómicos desde una aproximación no dirigida, se presentan como una herramienta analítica potencial en el descubrimiento de nuevos compuestos que son producto del metabolismo tras una ingesta de frutos secos y que pueden dar nuevas interpretaciones acerca de la relación entre ingesta de frutos secos y salud metabólica.

2.4 Nutrimetabolómica: biomarcadores de exposición y efecto

2.4.1 Generalidades

Evaluar la conexión entre la ingesta de frutos secos y los efectos asociados al estado de salud, requiere asegurar de manera válida y precisa la exposición a la dieta. Tradicionalmente, la valoración de la dieta en estudios epidemiológicos es realizada a través de la estimación de la ingesta por medio de instrumentos como cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos y, recordatorios dietéticos

24-h, en los cuales se registra la ingesta promedio en un periodo de tiempo puntual de información auto-referenciada, como por ejemplo, en la Investigación Prospectiva Europea sobre el Cáncer y la Nutrición, EPIC (Kaaks and Riboli 1997), donde se han desarrollado metodologías de validación y calibración de instrumentos para las mediciones de la ingesta dietética. Sin embargo, es ampliamente conocido que estos instrumentos presentan múltiples limitaciones metodológicas y errores sistemáticos (Hedrick, et al. 2012). Estas limitaciones pueden variar desde la subestimación o sobreestimación de la cantidad y la frecuencia de consumo de alimentos y, la omisión detallada de la ingesta (por ejemplo, consumo de condimentos o aderezos) hasta la variabilidad en la composición de los alimentos consumidos, al atribuir una composición absoluta a los alimentos como producto de tablas de composición “teóricas” que no necesariamente se ajustan fielmente con el consumo real (Bingham 1991; Corella and Ordovas 2015). Por otra parte, estos instrumentos se centran exclusivamente en la cantidad y el tipo de alimento consumido, dejando de lado la interacción entre los componentes de este alimento y el organismo. Esta interacción, producto del metabolismo humano, refleja procesos reales acerca de la absorción, la biodisponibilidad y la excreción de los alimentos y sus componentes. El metabolismo humano incluye procesos complejos y característicos en cada individuo, lo cual refleja una variabilidad interindividual producto de factores como el perfil de la microbiota intestinal, lo cual difícilmente puede ser considerado a través de los métodos tradicionales de evaluación de la ingesta.

Con el fin de responder a esta inminente situación, surge la necesidad de monitorizar los efectos asociados no solamente al consumo sino también a la exposición real, esto significa evaluar la biodisponibilidad y la bioaccesibilidad en el organismo (por ejemplo, los compuestos producto del metabolismo de los alimentos en biofluidos como plasma, suero y orina), con el fin de establecer de manera objetiva la exposición a la ingesta de ciertos alimentos y dilucidar los posibles mecanismos de acción a través de los cuales establecer el puente entre ingesta y efectos asociados a la salud. En este sentido, surge la necesidad de identificar **biomarcadores nutricionales** (Llorach, et al. 2012; Odriozola and Corrales 2015). En la actualidad existen diferentes definiciones y criterios de

clasificación de biomarcadores, sin embargo, la definición universalmente aplicable procede de *Biomarkers Definitions Working Group* (2011), al establecer que un biomarcador es “cualquier característica que es objetivamente medida y evaluada como un indicador de los procesos fisiológicos, procesos patológicos o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica” (*Biomarkers Definitions Working Group* 2001). En el contexto de la Nutrición, se requiere ampliar esta definición con el fin de incluir aspectos como: la ingesta alimentaria, el estado nutricional, la exposición de nutrientes, los efectos de intervenciones nutricionales en los estados fisiológico y/o patológico de la población y, además, proporcionar información sobre la respuesta a la dieta de acuerdo con la variabilidad interindividual (fenotipo metabólico). En este sentido, se define como biomarcador nutricional “a cualquier indicador bioquímico, funcional o clínico que ha sido medido en una muestra biológica y que refleja el estado nutricional respecto a la ingesta o al metabolismo de los componentes de la dieta, así como las consecuencias biológicas de la ingesta alimentaria” (Potischman and Freudenheim 2003). De forma general, los biomarcadores nutricionales se pueden clasificar en tres grupos: biomarcadores de exposición a la ingesta dietética, biomarcadores de efecto o estado nutricional y, biomarcadores de estado de salud/enfermedad o de fenotipo (Corella and Ordovas 2015; Llorach, et al. 2012).

En la era de las ómicas, la **metabolómica** se posiciona como una tecnología analítica avanzada en el descubrimiento y la validación de biomarcadores nutricionales y, por tanto, de biomarcadores de exposición a alimentos como los frutos secos. El objeto de estudio de la metabolómica es el metaboloma o conjunto de moléculas de bajo peso producidas en las células –metabolitos- y que están presentes en cualquier muestra biológica (ver **Figura 2.12**).

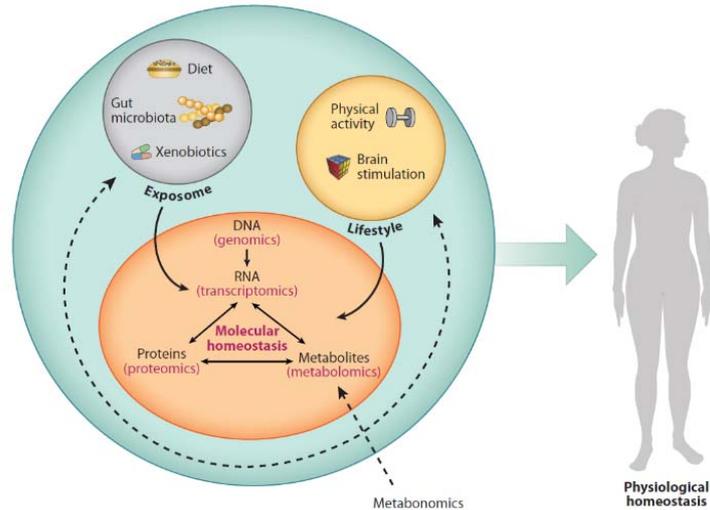


Figura 2.12. La metabolómica, la más reciente de las tecnologías “ómicas”, como herramienta en la interpretación de los sistemas biológicos relacionados con la exposición y el estilo de vida en los procesos de homeostasis fisiológica.
Tomado de: Claus and Swann 2013.

La subdisciplina de la metabolómica aplicada a la Nutrición es la **nutrimetabolómica** o **metabolómica nutricional** (Rezzi, et al. 2007). En los últimos años ha aumentado progresivamente la aplicación de la metabolómica al estudio de los cambios asociados a la dieta en humanos (ver **Figura 2.13**).

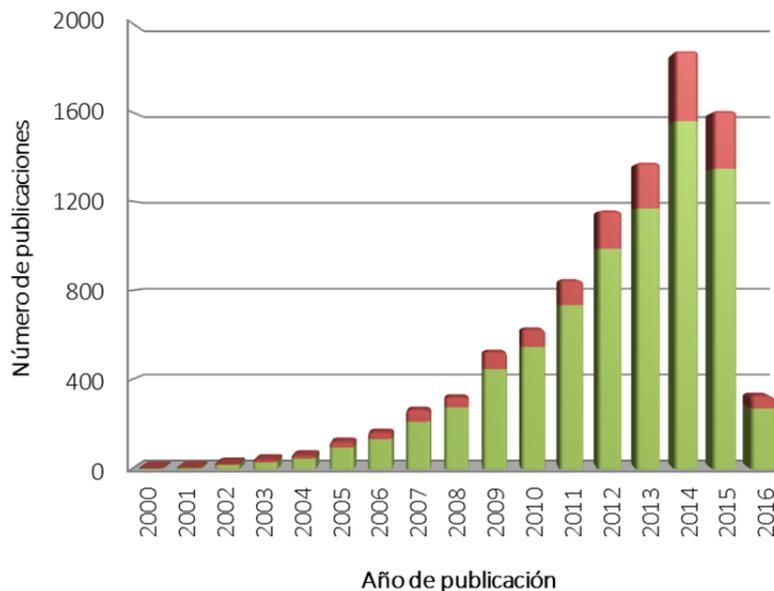


Figura 2.13. Publicaciones de estudios metabolómicos en humanos. Creciente aplicación de estudios nutrimetabolómicos. *Fuente:* Base de datos PubMed ((metabolomic OR metabonomic)) AND (Food OR Nutritional Sciences OR diet OR nutrimetabolomics OR metabolomics nutritional)) AND (human OR female OR male)). Búsqueda actualizada marzo de 2016.

El estudio del metaboloma abre nuevas hipótesis en la interpretación de mecanismos bioquímicos relativos al fenotipo celular y, por tanto, a los efectos asociados a la salud tras el consumo de un alimento o patrón dietético (Patti, et al. 2012). El metaboloma humano está constituido por diferentes metabolomas que son producto de reacciones bioquímicas propias del metabolismo celular (del inglés, *endogenous metabolome*), o como resultado de la exposición o agentes xenobióticos como medicamentos (del inglés, *metabolome drug*), condiciones ambientales (del inglés, *pollutant metabolome*) y, por supuesto, a la dieta (del inglés, *food metabolome*) (Scalbert, et al. 2014b). El *food metabolome* o metaboloma alimentario se define como la suma de todos los metabolitos directamente derivados de la digestión de alimentos, su absorción en el intestino y, biotransformación por tejidos y la microbiota (Fardet, et al. 2008; Scalbert, et al. 2014b). El metaboloma alimentario es una de las principales fuentes de metabolitos en el metaboloma humano con > 25.000 compuestos procedentes de los alimentos, además de sus respectivos derivados producto del metabolismo humano (Wishart, et al. 2007). La identificación de biomarcadores de exposición a frutos secos es una parte en la exploración del metaboloma alimentario. Según Corella *et al.* 2015, los biomarcadores de exposición pueden categorizarse temporalmente como biomarcadores de efectos agudos o a corto plazo (tras consumo de horas/días), a medio plazo (semanas/meses) y, crónicos (meses/años) (Corella and Ordovas 2015). Esta clasificación es asociada al tipo de muestra biológica analizada. Biofluidos como orina, plasma o suero reflejan una ingesta a corto tiempo; células o tejido adiposo permiten la identificación de biomarcadores de ingesta a mediano plazo y; cabello, uñas o dientes, son empleados para la identificación de biomarcadores a largo plazo (Potischman 2003).

En este sentido, para considerar un metabolito como potencial biomarcador de exposición a un determinado alimento, los siguientes criterios de validación biológica y analítica se deben tener en cuenta (Andersen 2013):

i). Validación biológica:

- Relación causal conocida con la exposición.

-
- Sensibilidad y especificidad.
 - Relación dosis-respuesta.
 - Variación inter-individual.

ii). Validación analítica:

- Condiciones de almacenamiento y preparativa de las muestras biológicas.
- Cuantificación de acuerdo con un método definido y un error analítico conocido.

2.4.2 Flujo de trabajo en nutrimetabolómica

Un análisis nutrimetabolómico puede ser abordado desde dos enfoques diferentes y complementarios al momento de establecer las interpretaciones biológicas del estudio (Dettmer, et al. 2007; Llorach, et al. 2012; Oresic 2009). El primer enfoque se basa en un *análisis dirigido*, lo cual significa el análisis de un grupo circunscrito de metabolitos relacionados con un compuesto particular o una vía metabólica. Este enfoque proporciona **perfiles metabólicos** cuantitativos (del inglés, *targeted metabolic profiling*) y guiados por hipótesis iniciales (del inglés, *hypothesis-driven approach*). El enfoque alternativo es por el contrario, libre de hipótesis iniciales (del inglés, *hypothesis-free approach*), tiene como objetivo el *análisis no dirigido* del máximo número de metabolitos contenidos en un sistema biológico sin un concepto establecido *a priori*, proporcionando complejas **huellas metabólicas** (del inglés, *non-targeted metabolomic fingerprinting*). Este método no dirigido procura obtener una visión global y semi-cuantitativa del metaboloma de una muestra biológica, incluidos aquellos que son desconocidos o poco caracterizados, y es una aproximación generadora de nuevas hipótesis biológicas, más que confirmatoria de hipótesis preestablecidas (del inglés, *hypothesis-generating approach*) como ocurre en un análisis dirigido (Patti, et al. 2012). Actualmente, estrategias no dirigidas y recientes avances en métodos estadísticos y bioinformáticos más sofisticados han permitido la identificación de potenciales biomarcadores útiles para evaluar la exposición a diferentes alimentos (Jenab, et al. 2009; Tulipani, et al. 2011). Entre las principales ventajas que ofrece un estudio metabólicomico no dirigido se incluye: i). El descubrimiento de nuevos

biomarcadores; ii). Una mayor comprensión acerca de los fenómenos bioquímicos ocurrientes en un organismo; iii). La descripción de la situación metabólica en tiempo real del sistema estudiado; y, iv). La integración de tecnologías analíticas avanzadas, en lugar de un gran número de métodos clásicos, para la determinación global del metaboloma (Gika, et al. 2014). Las técnicas analíticas más utilizadas desde un enfoque no dirigido son la **resonancia magnética nuclear** (siglas en inglés, **NMR**) y la **espectrometría de masas (MS)**, esta última generalmente combinada con técnicas separativas como la cromatografía de gases (GC-MS) o la cromatografía líquida (LC-MS) (Alonso, et al. 2015; de Raad, et al. 2016). Sus ventajas y desventajas han sido revisadas previamente (Dunn, et al. 2005; Zhang, et al. 2012) y hay consenso en que la medición exhaustiva de los metabolitos de un sistema requiere la integración de datos procedentes de distintas plataformas analíticas (Bingol, et al. 2016; Lanza, et al. 2010). Sin embargo, las técnicas de RMN se caracterizan por tener una alta reproducibilidad pero una sensibilidad limitada. Por el contrario, la sensibilidad alcanzada con técnicas de espectrometría de masas se están haciendo cada vez más adecuadas para la identificación de nuevos biomarcadores, debido a los avances en las tecnologías analíticas e informáticas. En particular, la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con ionización por electropulverización (LC-ESI-MS) se está convirtiendo en el método de elección para la adquisición tanto de perfiles metabolómicos como de huellas metabólicas en matrices biológicas complejas (Andersen, et al. 2014; Brown, et al. 2009; Fuhrer and Zamboni 2015; Gika, et al. 2014). Esta tecnología analítica avanzada permite la recopilación de información cuantitativa, semi-cuantitativa y estructural con una alta sensibilidad que puede llegar a la escala de pg/ml. Por tanto, LC-MS es una herramienta muy versátil en el análisis global del metaboloma humano (Theodoridis, et al. 2012). Curiosamente, la exploración del metaboloma plasmático humano en estudios nutrimetabolómicos desde una aproximación no dirigida, reporta sólo el 4.65% en el total de estudios publicados, independiente de la plataforma analítica utilizada y, 15.38% de los estudios reportados con la aplicación de la tecnología LC-q-ToF-MS (ver **Figura 2.14**), esta tendencia puede estar asociada a diversos puntos críticos durante la preparación de la muestra y la adquisición de datos.

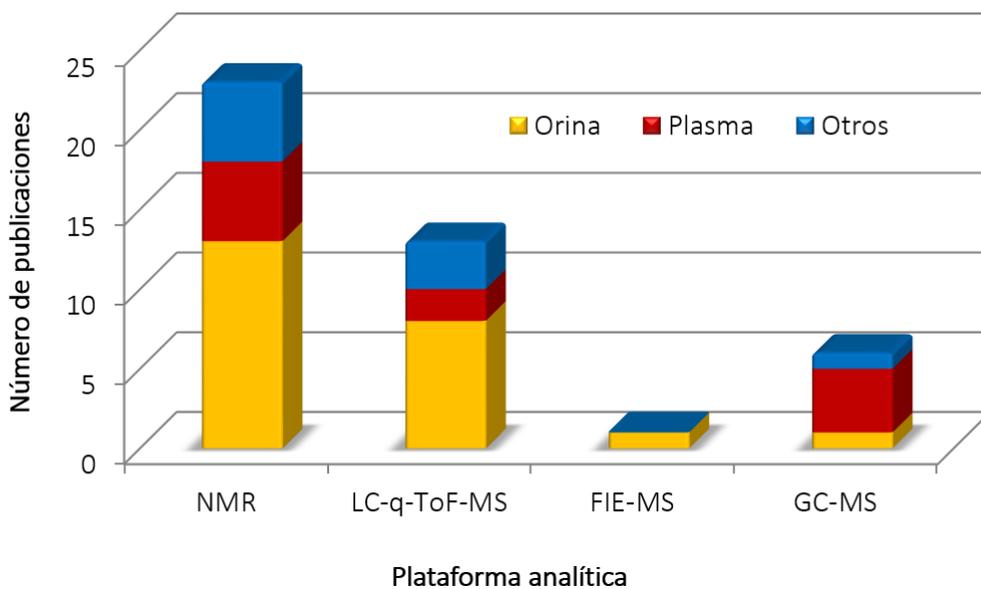


Figura 2.14. Tendencia de aplicación de las diferentes tecnologías en estudios nutrimetabolómicos en humanos desde una aproximación no dirigida. Búsqueda en PubMed actualizada en marzo de 2016.

La información biológica que se obtiene a través de estudios metabolómicos no dirigidos es relevante no sólo en volumen sino también en complejidad, por tanto, se requiere el uso de protocolos y metodologías validadas y estandarizadas. Tras el diseño del estudio, el flujo de trabajo (*workflow*) seguido comúnmente en metabolómica incluye una secuencia de cinco pasos principales (ver **Figura 2.15**):

1). Recolección y preparación de las muestras biológicas: incluye un control de calidad riguroso en el almacenamiento del material biológico y los procedimientos necesarios para la adecuación de las muestras antes de ingresar a la plataforma analítica.

2). Adquisición de datos: consiste en la generación de datos a través del procesamiento de las muestras biológicas en plataformas analíticas como LC-MS o RMN. En el caso de LC-MS se obtienen miles de iones con características como masa/carga y tiempo de retención específicos, a lo cual se denomina *señal de masa*.

3). Análisis de datos: etapa en la cual se aplican diferentes técnicas quimiométricas y bioinformáticas para el tratamiento de los datos obtenidos de las plataformas analíticas, con el fin de reducir significativamente el volumen de datos

procedentes de la etapa anterior, identificar las señales de masa que varían significativamente entre los grupos de intervención y, evaluar las posibles relaciones entre los datos obtenidos.

4). Identificación de metabolitos: paso crítico y de gran importancia en un análisis metabolómico. Consiste en descubrir la identidad (nomenclatura y estructura química) de las señales de masa discriminantes a través de una búsqueda minuciosa en literatura científica, la comparación de espectros en bases de datos online y, la realización de experimentos MS/MS para confirmar la identidad del metabolito, si se posee el reactivo comercial.

5). Interpretación biológica: en este paso final se da respuesta a la pregunta de investigación de acuerdo con los biomarcadores discriminantes identificados previamente. Consiste en establecer las relaciones de estos biomarcadores dentro de rutas metabólicas que responden a un contexto biológico específico.

Durante este proceso, el uso de herramientas bioinformáticas de alto rendimiento son necesarias para la interpretación y el análisis de los datos obtenidos (Alonso, et al. 2015).

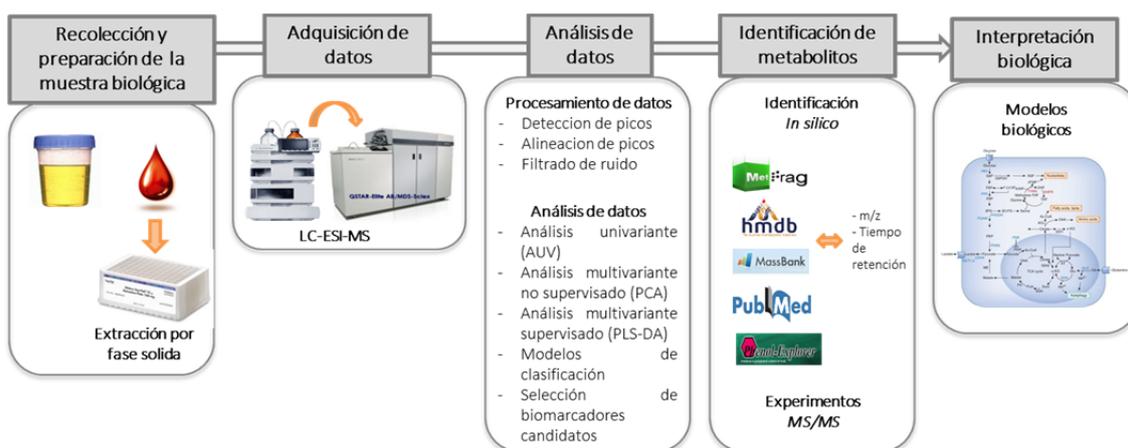


Figura 2.15. Diagrama de flujo en los estudios metabolómicos no dirigidos para el análisis de muestras biológicas de orina y plasma. *Adaptado de:* Llorach, et al. 2012; Alonso, et al. 2015.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La presente Tesis Doctoral se plantea de acuerdo con de las siguientes hipótesis de partida:

- Una intervención nutricional con frutos secos permitirá observar diferencias significativas en el perfil metabólico humano, posibilitando la caracterización del metaboloma y de biomarcadores específicos asociados al consumo de frutos secos.
- Los biomarcadores nutricionales asociados al consumo de frutos secos identificados en un estudio de intervención podrán ser replicados en otros diseños de estudios, aportando evidencias en la validación de dichos biomarcadores.
- Los biomarcadores nutricionales detectados tras la ingesta de frutos secos, tanto en el metaboloma plasmático como en el metaboloma urinario, permitirán una mejor asociación con los marcadores de síndrome metabólico, posibilitando la generación de nuevas hipótesis acerca de las implicaciones del consumo de frutos secos y el estado de salud cardiometabólica.

3.2 Objetivos

El **objetivo principal** de esta Tesis Doctoral es identificar biomarcadores de exposición a frutos secos a través de la caracterización de los perfiles metabólicos plasmático y urinario y, evaluar posibles asociaciones de efecto entre los biomarcadores de exposición a frutos secos y parámetros de estado clínico de sujetos diagnosticados con síndrome metabólico.

El desarrollo de este objetivo general incluye los siguientes objetivos específicos:

- Identificar y caracterizar biomarcadores metabólicos asociados al consumo de frutos secos en sujetos con síndrome metabólico en dos diseños de estudio diferentes (estudio de intervención y estudio de cohorte), implementando una metodología analítica en la exploración del metaboloma plasmático a partir de un análisis metabólico no dirigido.
- Seleccionar un conjunto robusto de biomarcadores discriminantes de exposición a frutos secos asociados a la frecuencia de consumo reportado en el FFQ en un estudio de cohorte.
- Evaluar las eventuales relaciones entre biomarcadores de exposición a frutos secos y parámetros clínicos asociados a síndrome metabólico.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de los estudios nutricionales

El objetivo de un estudio nutricional en investigación clínica es caracterizar el estado nutricional o condición de salud de un individuo o grupo de individuos influenciado por la ingesta, el metabolismo y el uso de nutrientes. Según su diseño, los estudios nutricionales se pueden clasificar de forma general como estudios de intervención y estudios observacionales. Los estudios de intervención se caracterizan por el control de la dieta, la inclusión de los participantes de acuerdo con criterios previamente establecidos, la clasificación aleatoria de los participantes en grupos y, el seguimiento de la intervención en rangos temporales como corta o media/larga duración, entre otros. Mientras que, los estudios observacionales suponen la colección de información sin efectuar ningún tipo de interferencia como, por ejemplo, el control de la dieta. Un estudio de cohorte es una muestra representativa que ha sido seleccionada de un estudio observacional de acuerdo con ciertos criterios como la exposición a la dieta (ver **Figura 4.1**).

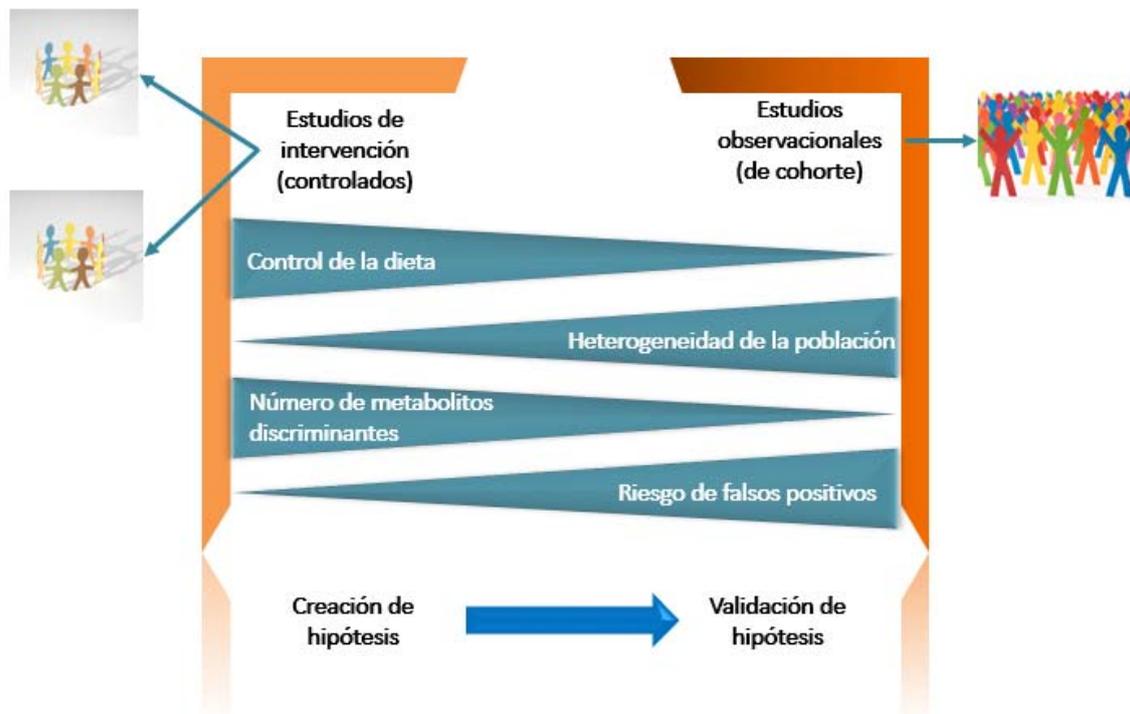


Figura 4.1. Comparación entre estudios nutricionales (estudios de intervención vs estudios transversales). *Adaptado de:* Jenab, et al. 2009; Scalbert, et al. 2014b.

El potencial de los estudios de intervención radica en el control de la dieta y/o el estado de salud, lo cual significa, aumentar la posibilidad de identificar metabolitos discriminantes asociados al consumo específico del alimento valorado. Por su parte, los estudios transversales reflejan el consumo habitual del alimento en condiciones de vida libre, lo cual permite la validación de biomarcadores discriminantes a la ingesta valorando la variabilidad asociada a la inter-individualidad y heterogeneidad de la población (Jenab, et al. 2009; Scalbert, et al. 2014b). La integración de ambos tipos de estudio en el descubrimiento de biomarcadores nutricionales, aporta información independiente y complementaria, que posibilita nuevas interpretaciones asociadas no sólo a la validación y capacidad predictiva de estos biomarcadores como indicadores discriminantes de ingesta, sino también a la respuesta de la exposición dietético en poblaciones heterogéneas.

Este trabajo de Tesis Doctoral se centra en dos estudios nutricionales relacionados con el consumo de frutos secos en sujetos diagnosticados o no con síndrome metabólico. El primer estudio (EFINUT) corresponde a un estudio de intervención controlado en el cual se evaluó el consumo regular de frutos secos en sujetos diagnosticados con síndrome metabólico y, el segundo estudio, corresponde a un estudio de cohorte (*InCHIANTI*) donde se evaluó el consumo habitual de frutos secos de sujetos en condiciones de vida libre a los cuales se ha diagnosticado o no síndrome metabólico al inicio del estudio.

El diagnóstico de síndrome metabólico fue reportado de acuerdo con los criterios armonizados y, descritos en detalle en el apartado 2.3 de la presente Tesis Doctoral (Alberti, et al. 2009). Fue diagnosticado como sujeto con síndrome metabólico a todos aquellos que cumplieran al menos tres de los cinco componentes descritos a continuación: 1). Circunferencia de cintura: hombres (≥ 102 cm) y mujeres (≥ 88 cm); 2). Elevada concentración de triglicéridos en sangre: ≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L) o recibir un tratamiento farmacológico para la hipertrigliceridemia; 3). Baja concentración de c-HDL en sangre: hombres (< 40 mg/dL o 0.9 mmol/L) y mujeres (< 50 mg/dL o 1.1 mmol/L) o recibir tratamiento farmacológico para aumentar el c-HDL; 4). Elevada presión arterial: presión arterial sistólica (≥ 130

mmHg) y/o presión arterial diastólica (≥ 85 mm Hg) o recibir tratamiento farmacológico antihipertensivo; 5). Elevada concentración de glucosa en ayunas: (≥ 100 mg/dL o 5.55 mmol/L) o recibir tratamiento farmacológico para hiperglucemia.

4.1.1 Estudio de intervención: EFINUT

Diseño del estudio. Consiste en un estudio clínico nutricional aleatorizado, controlado y en paralelo de 12 semanas de intervención, cuyo objetivo inicial fue evaluar el efecto del consumo regular de una mezcla de frutos secos (nueces, almendras y avellanas) en la mejora de factores de riesgo cardiovascular en sujetos diagnosticados con síndrome metabólico (Casas-Agustench, et al. 2011b; Lopez-Uriarte, et al. 2010).

El protocolo de trabajo fue diseñado de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Sant Joan de Reus y, firmado por todos los voluntarios como consentimiento por escrito de su participación en este estudio (ISRCTN36468613), el cual fue financiado por el proyecto CONSOLIDER FUN-C-FOOD (CSD2007-063). Las muestras de plasma humano del estudio EFINUT fueron proporcionadas por los investigadores Dr. Jordi Salas-Salvadò y Dra. Mònica Bulló de la Unidad de Nutrición Humana de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, España).

Sujetos. Hombres y mujeres entre 18 y 65 años fueron entrevistados entre octubre de 2005 y febrero de 2007 en el Hospital Universitari Sant Joan de Reus y, en los tres centros de atención primaria de las comarcas del Baix Camp (Riudoms y Reus) y Alt Camp (Alcover) en Tarragona (España). Como criterio fundamental en la inclusión de los voluntarios, se consideró el diagnóstico de síndrome metabólico (ver **Figura 4.2**). En cuanto a los criterios de exclusión en este estudio, se tuvieron en cuenta los siguientes: 1). Alergias al consumo de frutos secos; 2). Diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 con o sin tratamiento farmacológico; 3). Índice de masa corporal > 35 kg/m²; 4). Leucocitosis al inicio del estudio (leucocitos > 10000

células x 10⁶; 5). Presencia de alguna enfermedad inflamatoria, infecciosa, autoinmune o grave, neoplásica, endocrina, pulmonar obstructiva y/o hematológica activa; 6). Consumo de medicamentos como antiinflamatorios, corticoides, hormonas o antibióticos en la semana previa al inicio del estudio; 7). Seguir una dieta muy restrictiva o registrar una pérdida de peso corporal superior a 5 kg en los últimos 3 meses antes del inicio del estudio; y/o 6). Presencia de tabaquismo, alcoholismo o drogodependencia. Al inicio del estudio, sesenta y un sujetos fueron elegibles, sin embargo, durante la selección once sujetos fueron excluidos por diferentes motivos, entre los cuales se destaca la dificultad para seguir el estudio, el inicio de un tratamiento farmacológico, el abandono del estudio por motivos personales y, el no cumplimiento con los criterios de inclusión del estudio. Las muestras biológicas de plasma fueron extraídas a cada voluntario al inicio (S0) y al final de la intervención, luego de las 12 semanas (S12).

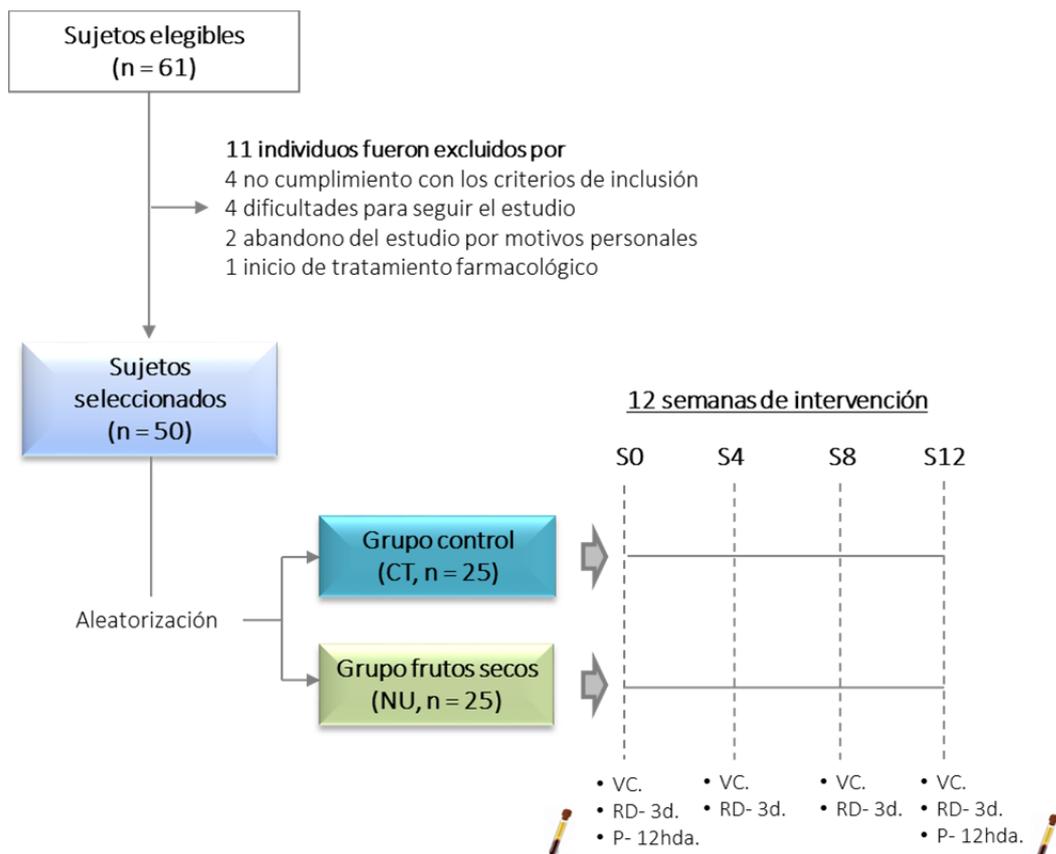


Figura 4.2. Esquema de diseño del estudio EFINUT: cincuenta sujetos fueron seleccionados. Valoración clínica (VC) y registro dietético de 3 días (RD-3d) fueron reportados al inicio del estudio (S0), cada cuatro semanas (S4 y S8) y al final de la intervención (S12). Las muestras de plasma 12 horas de ayuno (P-12hda) fueron extraídas solamente al inicio (S0) y al final de la intervención (S12).

Intervención. Antes de iniciar el estudio, los participantes seleccionados fueron estratificados por género y edad (< 50 años o \geq 50 años) y, asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos diseñados en este estudio de intervención: **grupo control (CT)** y **grupo de intervención (NU)**. Ambos grupos recibieron recomendaciones dietéticas cualitativas para el seguimiento de una dieta cardiosaludable, a partir de las recomendaciones de la Asociación Americana del Corazón (del inglés, *American Heart Association, AHA*) (Krauss, et al. 2000). Entre las recomendaciones cualitativas de una dieta cardiosaludable se sugirió a todos los participantes: reducir el consumo de cualquier fuente de grasa; aumentar el consumo de frutas y verduras; preferir el consumo de granos enteros; elegir productos libres de grasa o con bajo contenido de la misma; consumir pescado al menos dos veces por semana; limitar el consumo de carnes rojas o sustituirlo por carnes blancas; limitar el consumo de grasas *trans* y/o grasas saturadas y colesterol, así como de alimentos fuente de aceites vegetales hidrogenados; limitar el consumo de bebidas azucaradas y alimentos con azúcar adicionada; seleccionar y preparar alimentos con baja o nula adición de sal; y reducir el consumo de alcohol. Además, a todos los participantes se recomendó que no cambiaran su patrón de actividad física o hábito tabáquico, en caso de ser fumadores, durante las 12 semanas del estudio.

A los sujetos del grupo CT se les remarcó especialmente la importancia de no consumir ningún tipo de fruto seco o cacahuates durante las 12 semanas de la intervención. Por el contrario, el grupo NU se suplementó diariamente su dieta con 30 g de una mezcla de frutos secos (15 g de nueces + 7.5 g de almendras + 7.5 g de avellanas) que se les proporcionaron gratuitamente.

Dos muestras de sangre fueron extraídas tras 12 horas de ayuno a todos los participantes del estudio: al inicio (S0) y luego de las 12 semanas de intervención (S12). La sangre se recogió en tubos de plasma-EDTA. Una parte de cada muestra fue emitida el mismo día de la extracción al laboratorio de referencia en el Hospital Universitari Sant Joan de Reus donde se determinó de inmediato: hemograma, recuento y fórmula leucocitaria, velocidad de sedimentación globular, albúmina, colesterol total, c-HDL, triglicéridos, glucosa, sodio, potasio, urea, creatinina, ácido

úrico y transaminasas. La porción de la muestra restante fue centrifugada a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C y, almacenada en alícuotas de 0.5 mL de plasma fueron almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

Evaluación del estado clínico-antropométrico y de la ingesta dietética. Los sujetos inicialmente evaluados como elegibles, asistieron a una valoración médica previa al inicio del estudio. Los médicos tanto del Hospital Universitari Sant Joan de Reus como de los centros de atención primaria, realizaron el cribado a través de una entrevista personal, un análisis bioquímico y la evaluación de la historia clínica, esto con el objetivo de corroborar el estado de salud de los participantes y su elegibilidad en este estudio.

La caracterización clínica y antropométrica de los sujetos se realizó en cada una de las cuatro entrevistas realizadas durante la intervención (S0, S4, S8 y S12). Estatura solamente fue determinada al inicio del estudio (S0). La presión arterial (sistólica y diastólica) fue determinada en el brazo no dominante por duplicado y siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Europea de Hipertensión y de la Sociedad Europea de Cardiología (Redon and Coca 2003). La circunferencia de cintura se determinó en el punto medio, ubicado entre el borde costal inferior y el reborde superior de la cresta iliaca en bipedestación y, luego de una espiración suave. El gasto energético promedio diario se estimó de acuerdo con la actividad física realizada a través del cuestionario de actividad física de tiempo libre en Minnesota (Taylor, et al. 1978), que posteriormente fue validado en población española (Elosua, et al. 1994).

La **evaluación de la ingesta dietética** se realizó a través del registro alimentario de 3 días (2 días laborables y 1 día festivo) completado directamente por los participantes, de acuerdo con las indicaciones proporcionadas personalmente por el grupo de especialistas. Durante cada visita (S0, S4, S8 y S12), los participantes recibieron asesoría personalizada sobre el seguimiento nutricional y revisaban y completaban los registros dietéticos en compañía de los especialistas. Posteriormente cada uno de estos registros fue codificado para facilitar el análisis de esta información dietética en una base de datos. Los valores de la ingesta

energética total y de los nutrientes consumidos en la dieta, fueron calculados a partir de las tablas españolas de composición de alimentos del programa informático “*Professional Diet Balancer*” (Cardinal Health Systems Inc, Minnesota, Estados Unidos de América).

La adherencia a la intervención dietética en ambos grupos se evaluó a través del registro alimentario de 3 días, el recuento de los envases vacíos de frutos secos devueltos (en el caso del grupo NU) y el análisis por cromatografía de gases que determinó la concentración plasmática de ácido α -linolénico, empleado como biomarcador de consumo de frutos secos por ser un componente mayoritario en las nueces. La determinación de este biomarcador se realizó en una muestra aleatoria de 27 individuos distribuidos en 14 del grupo CT y 13 del grupo NU, respectivamente.

4.1.2 Estudio de cohorte: InCHIANTI

Diseño del estudio. El estudio InCHIANTI (*Invecchiare in Chianti*, envejecimiento en la zona de Chianti) es un estudio poblacional representativo de personas mayores (≥ 65 años) que viven en el área geográfica de Chianti (Toscana, Italia), específicamente de las regiones Greve in Chianti y Bagno a Ripoli (<http://InCHIANTIstudy.net/>). Este estudio es realizado en colaboración con el Dr. Luigi Ferrucci del Instituto Nacional sobre el Envejecimiento (NIH, NIA, Bethesda, Estados Unidos de América) y el Dr. Antonio Cherubini, del Instituto Nacional de Investigación y Atención a las Personas Mayores (INRCA, Ancona, Italia). La colaboración entre la Universitat de Barcelona, el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento (NIH, NIA, Bethesda, Estados Unidos de América) y, la Agencia Regional de Salud de la Toscana corresponde a un convenio de colaboración internacional que se centra en el estudio del efecto del consumo de dietas ricas en compuestos fenólicos y su relación con estados asociados al envejecimiento.

Como objetivo principal, el estudio InCHIANTI pretende traducir la investigación epidemiológica en herramientas clínicas geriátricas relacionadas con problemas de movilidad y fragilidad y, evaluar los factores de riesgo y los efectos asociados a la

pérdida de movilidad o enfermedades relacionadas con alteraciones neurológicas “leves”.

En la **Figura 4.3** se representa el diseño general del estudio InCHIANTI, un estudio de cohorte prospectivo que inició la recolección de datos en septiembre de 1998 y se completó en marzo de 2000. Este periodo se consideró como la fase inicial (o basal) del estudio y registró la inclusión de 1453 participantes entre hombres y mujeres con edades comprendidas entre 20 y 102 años, de los cuales 1260 participantes son adultos mayores de 65 años. A la fecha, en este estudio se han realizado cuatro etapas de seguimiento que incluyen la evaluación a los 3 años (2001 – 2003), seis años (2004 – 2006), nueve años (2007 – 2010) y quince años (2013 – 2015), respectivamente. Durante los años 2011 y 2012 sólo se reportaron datos de movilidad. El diseño y los métodos en la recolección de datos se han descrito previamente (Ferrucci, et al. 2000).

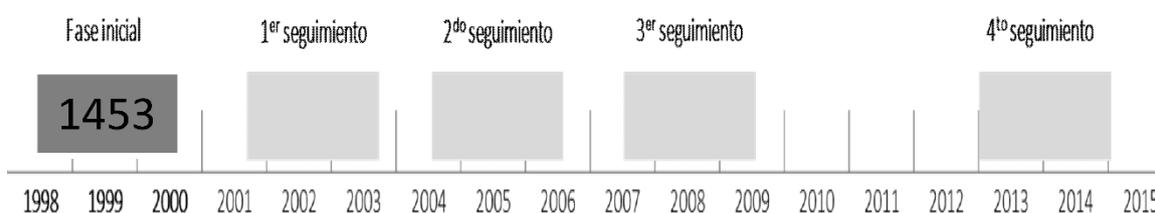


Figura 4.3. Línea de tiempo y seguimiento del estudio observacional prospectivo InCHIANTI.

Sujetos. Una cohorte de la fase inicial del estudio InCHIANTI ha sido seleccionada para la exploración del metaboloma urinario de adultos mayores (≥ 65 años) que registren una frecuencia de consumo de frutos secos y reporten criterios diagnósticos asociados a síndrome metabólico. Esta muestra representativa corresponde con los criterios de inclusión y exclusión propuestos para el estudio: “Associació entre l’exposició als fruits secs en la dieta i el deteriorament cognitiu en un període de tres anys en la gent gran: estudi InCHIANTI” (código oficial FBG307906), financiado por el INC (International Nut & Dried Fruit Council) World Forum for Nutrition Research and Dissemination durante el periodo 2014 - 2016 (ver **Figura 4.4**).

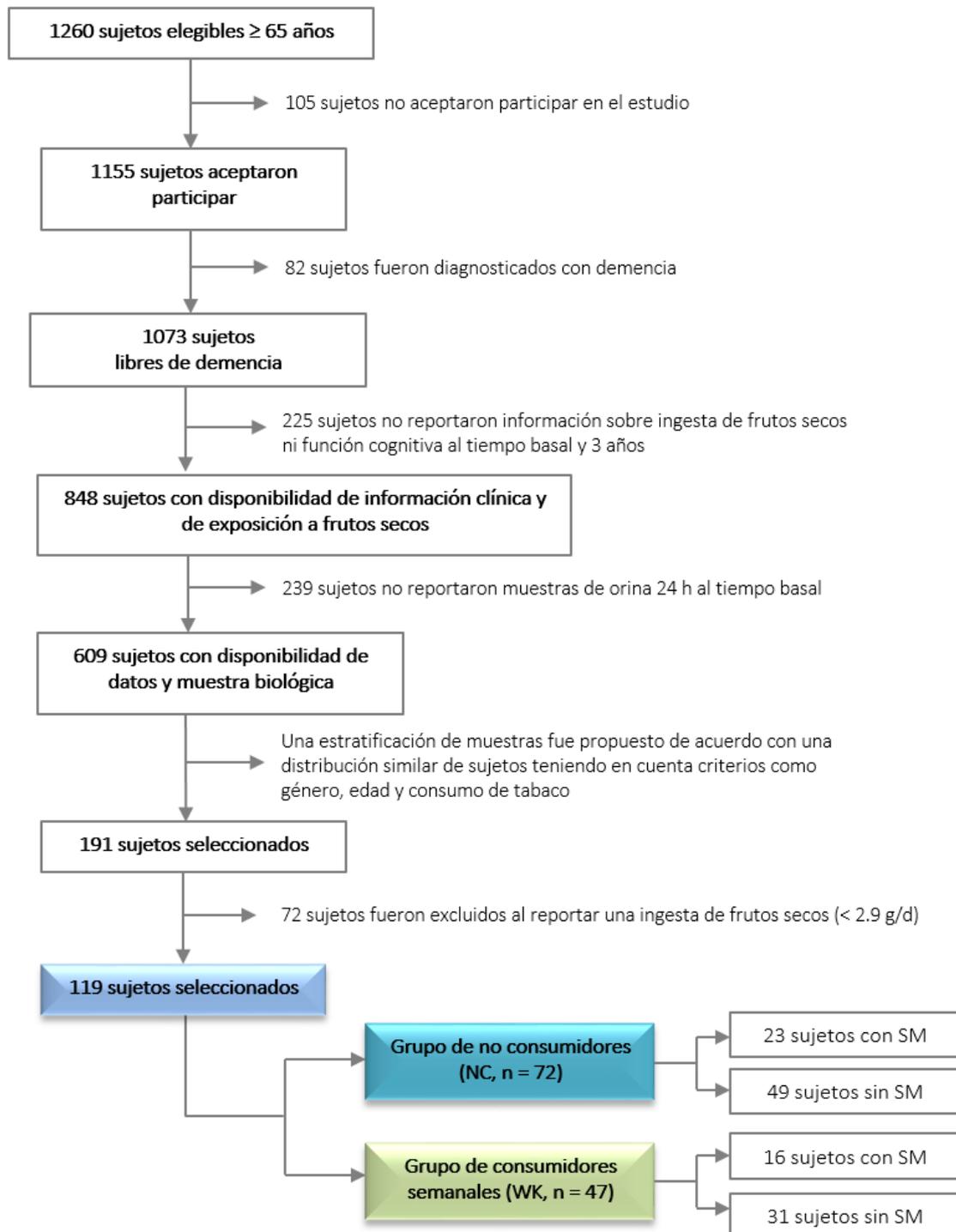


Figura 4.4. Esquema de diseño del estudio y descripción de la cohorte participante de acuerdo con la ingesta de frutos secos y el diagnóstico de síndrome metabólico (SM).

De los 1260 adultos mayores de 65 años elegibles al inicio del estudio, 412 sujetos fueron excluidos por no aceptar la participación en el estudio, reportar demencia y carecer de información clínica y registro dietético del consumo de frutos secos y, 239 sujetos más fueron excluidos por no reportar muestras de orina en los

biobancos. 609 sujetos fueron considerados elegibles con información clínica y dietética a tiempo basal. Esta muestra fue estratificada por género, edad y consumo de tabaco, lo cual permitió seleccionar una sub-muestra de 191 sujetos, los cuales posteriormente, fueron estratificados según frecuencia de ingesta de frutos secos. La estratificación de los grupos extremos en consumo de frutos secos: no consumidores (0 g/d, n = 72) y consumidores semanales (≥ 2.9 g/d, n = 47) fueron seleccionados como cohorte (n = 119) para la exploración del metaboloma urinario desde una aproximación no dirigida. El diagnóstico de síndrome metabólico fue asignado a aquellos participantes que presentaran al menos tres de los cinco componentes propuestos en los criterios armonizados (Alberti, et al. 2009) (ver apartado 2.3 de la presente Tesis Doctoral).

Las muestras biológicas de orina (24 h) fueron recogidas dentro de las tres semanas siguientes a la entrevista domiciliaria y, almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis.

Evaluación del estado clínico-antropométrico y de la ingesta dietética. La recolección de datos del estudio InCHIANTI inicia con entrevistas que fueron realizadas en los hogares de los participantes por tres entrevistadores experimentados, quienes además de obtener información socioeconómica y familiar, registraron información acerca del estilo de vida, actividad física y dieta. La descripción de la dieta fue reportada de acuerdo con el cuestionario de frecuencia de consumo alimentario previamente validado en el proyecto EPIC (Investigación Prospectiva Europea sobre Cáncer y Nutrición) en población italiana (Pisani, et al. 1997). Después de recibir una descripción detallada del protocolo del estudio durante la entrevista, los participantes firmaron un consentimiento que incluía el permiso para consultar las bases de datos administrativas pasadas y futuras, las historias clínicas, y para llevar a cabo diferentes análisis a partir de muestras biológicas almacenadas en el banco biológico del estudio. El entrevistador programó tres citas adicionales y explicó el procedimiento adecuado para la recogida de orina de 24 horas, el cual incluía evitar el consumo de ciertos alimentos (como carne y pescado) durante el día de la recolección de la muestra de orina. El mismo día que los participantes del estudio

llevaron al centro clínico la muestra de orina, fueron valorados por los especialistas, con el fin de aumentar la información registrada en su historia clínica que, en las posteriores visitas médicas, fue completada con los exámenes y pruebas diagnósticas correspondientes.

4.2 Análisis metabolómico de muestras de biológicas de plasma y orina

El protocolo utilizado para el análisis del metaboloma urinario fue previamente desarrollado y validado por el grupo de investigación (Llorach, et al. 2009; Tulipani, et al. 2011). Mientras que el protocolo analítico para la exploración del metaboloma plasmático, fue desarrollado, optimizado y validado durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral. A continuación se describe cada una de las etapas teniendo en cuenta el flujo de trabajo en nutrimetabolómica.

4.2.1 Recolección y preparación de la muestra

Las muestras biológicas como orina y plasma son las más utilizadas en estudios nutrimetabolómicos debido a la facilidad de recolección de estos biofluidos poco invasivos (Gibney, et al. 2005). Independiente del tipo de muestra biológica a analizar, las condiciones de almacenamiento antes de su preparación y durante la adquisición de datos deben cumplir con unos mínimos de calidad que garanticen la conservación de la composición bioquímica original en el material biológico analizado. De acuerdo con el *Chemical Analysis Working Group (CAWG)* de *Metabolomics Standards Initiative (MSI)*, estos criterios incluye el almacenaje de las muestras a menos -80°C antes de realizar su preparación y su mantenimiento entre 0° y 4°C durante la adquisición de datos (Sumner, et al. 2007). Se debe mantener la cadena de frío a través del cambio paulatino y controlado de la temperatura desde -80°C a 4°C .

En términos general, la preparación de una muestra en un análisis metabolómico no dirigido se caracteriza por:

-
- i). Ser tan simple como sea posible, con el mínimo número de pasos necesarios, para evitar la pérdida de información biológica importante durante el estudio;
 - ii). Extraer los metabolitos presentes en la muestra sin alterar su naturaleza bioquímica;
 - iii). Eliminar componentes que puedan afectar durante la adquisición de datos;
 - iv). Adecuar las muestras para garantizar la protección del equipo analítico durante el análisis en LC-ESI-MS con procedimientos como centrifugación y dilución y,
 - v). Concentrar las muestras para conseguir los límites de detección en el sistema LC-ESI-MS de metabolitos con bajas concentraciones en las muestras originales (en caso de ser necesario) (Dettmer, et al. 2007; Theodoridis, et al. 2012).

A continuación, se describe los procedimientos específicos en la preparación de los biofluidos analizados en esta Tesis Doctoral.

Plasma. El plasma es una matriz compleja que aporta información biológica relevante acerca de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de compuestos circulantes en el organismo (Rappaport, et al. 2014). La preparativa de este tipo de muestras, incluye procesos más complejos no necesarios en la preparación de muestras biológicas más simples como la orina. En el plasma no sólo se encuentran metabolitos, sino también proteínas y fosfolípidos que son necesarios removerlos para evitar el deterioro de la columna cromatográfica o efectos de supresión iónica, durante la adquisición de datos. Debido a la complejidad de esta matriz biológica, en la actualidad no existe un protocolo universalmente aceptado para la preparación de muestras de plasma. El grupo de investigación, previamente al desarrollo de esta Tesis Doctoral, realizó un primer análisis comparativo de diferentes técnicas de extracción de plasma, llegando a un protocolo inicial para la remoción conjunta de proteínas y fosfolípidos (Tulipani, et al. 2013). Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se profundizó en el trabajo de optimización del protocolo analítico para la exploración del metaboloma plasmático. Las muestras de plasma fueron descongeladas gradualmente hasta alcanzar una temperatura de 4°C, posteriormente fueron centrifugadas y 50 µL del sobrenadante fue sometido a extracción híbrida de desproteínización por precipitación con acetonitrilo al 1% de

ácido fórmico (ACN 1% AF) y remoción de fosfolípidos por extracción de fase sólida (SPE) mediante distintas placas. El filtrado fue evaporado, reconstituido y ubicado en la placa de inyección para la adquisición de datos. La atención se centró en la comparación de dos tecnologías para SPE (Ostro, Waters vs Phree, Phenomenex) y tres diluciones muestra/solvente durante la extracción (1:6; 1:9; 1:12). La elección de cada alternativa metodológica se evaluó a través de un árbol de decisión (Tulipani, et al. 2015).

Orina. En el caso de la preparación de las muestras de orina del estudio reportado en esta Tesis Doctoral, solamente fueron necesarios los procesos físicos de centrifugación y dilución (Theodoridis, et al. 2012), tal como se describe a continuación: las muestras fueron descongeladas gradualmente dentro del frigorífico hasta alcanzar una temperatura de 4°C. Posteriormente, fueron centrifugadas a 12.500 rpm durante 5 minutos. 50 µL del sobrenadante fue diluido en una proporción 1:1 con agua Milli-Q Gradiente A10 (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, Estados Unidos de América) en una placa de 96 pocillos. Esta placa fue vortexada e introducida directamente en el sistema LC-ESI-MS. El material biológico no utilizado fue re-etiquetado y almacenado nuevamente a -80°C.

4.2.2 Adquisición de datos: plataforma analítica LC-ESI-MS

La adquisición de datos metabólicos desde una aproximación no dirigida reportados en esta Tesis Doctoral fueron realizados a través de la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas con analizador híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (del inglés, *High-Performance Liquid Chromatography coupled to quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry, HPLC-q-ToF-MS*), a través del sistema Agilent HPLC serie 1200 RRLC acoplado a un sistema hídrico cuadrupolo tiempo-de-vuelo QSTAR Elite (AB Sciex) y equipado con una fuente *ESI*.

El primer paso en la adquisición de datos metabólicos consiste en la separación de los metabolitos presentes en una muestra biológica a través de un sistema de

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La cromatografía es una técnica analítica en la cual los componentes de una mezcla son separados en función a la afinidad fisicoquímica (por ejemplo, la polaridad) de estos compuestos con las dos fases presentes en el sistema: la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es una mezcla de solventes en la cual la muestra biológica generalmente se encuentra diluida. Durante una separación cromatográfica, la proporción en %v/v de la fase móvil puede variar en función del tiempo y, esta distribución se conoce como gradiente de elución. Por otra parte, la fase estacionaria se encuentra dentro de la columna cromatográfica y, se caracteriza por presentar polaridad opuesta a la de la fase móvil. En el mercado actual, se dispone de una gran variedad de materiales y tamaño de partículas que componen la fase estacionaria. Esta diversidad permite una selección más asertiva de la columna cromatográfica en función de la naturaleza fisicoquímica de los componentes de la mezcla y, por tanto, optimizar el sistema cromatográfico de manera que permita:

- i). Un aumento de la intensidad de la señal del pico;
- ii). Una baja supresión iónica;
- iii). Una mejora de la relación señal-ruido que se refleja en una mayor sensibilidad (Theodoridis, et al. 2012).

La mayoría de los estudios LC-MS desde una aproximación metabolómica no dirigida utilizan un gradiente cromatográfico de fase reversa (Theodoridis, et al. 2008). Esto significa que la fase móvil de naturaleza polar transporta la muestra a través de la fase estacionaria de naturaleza apolar. Las diferentes fuerzas intermoleculares de atracción y repulsión que se establecen entre los componentes de la mezcla y las fases determinan el tiempo que tarda cada compuesto en eludir a través de la columna. En la cromatografía de fase reversa los compuestos polares eluyen más rápido en comparación de los compuestos apolares, al ser retenidos en la columna por más tiempo por causa de su polaridad. El tiempo que tarda cada compuesto en eludir a través de la columna cromatográfica se conoce como **tiempo de retención** (del inglés, *retention time, RT*) y, corresponde con uno de los dos criterios que posteriormente serán utilizados para la identificación de los metabolitos.

La **espectrometría de masas** es una técnica de análisis cualitativo utilizado ampliamente en la caracterización y determinación de estructuras orgánicas. Durante la obtención de un espectro de masas, se da lugar a una serie de procesos químicos que destruyen la muestra impidiendo su recuperación. El fundamento de esta técnica analítica se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, que posteriormente son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) y, finalmente detectados a través de un dispositivo electrónico. En consecuencia, un espectro de masas es una representación bidimensional de un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes iones en función de la relación masa/carga (m/z). La presencia y abundancia de los iones en el espectro, identificados por su masa, será por tanto en función de la estructura química del compuesto. En términos generales, un espectrómetro de masas consta de cuatro partes. Cada una de ellas cumple con una función secuencial:

- i). Sistema de introducción de muestras: vaporiza los diferentes compuestos previamente separados en el sistema cromatográfico. Generalmente, estos compuestos presentan volatilidades diferentes;
- ii). Fuente de ionización: origina iones a partir de las moléculas neutras previamente volatilizadas y que se encuentran en fase gaseosa;
- iii). Analizador de masas: separa los iones en función de su relación masa/carga (m/z);
- iv). Sistema detector y registrador: como su nombre lo indica, detecta los iones formados y los registra de forma independiente.

Una vez los metabolitos eluyen desde el sistema cromatográfico al espectrómetro de masas, son volatilizados en el sistema de introducción de muestras y, posteriormente inyectados a la fuente de ionización, donde se forman los iones positivos o negativos de acuerdo con el modo de trabajo programado. En estudios metabólicos, la fuente de ionización más utilizada es la **ionización por electropulverización** (del inglés, *Electrospray Ionization, ESI*) (Dettmer, et al. 2007; Dunn, et al. 2013). En esta ionización, la mezcla disuelta en la fase móvil forma un aerosol de partículas ionizadas que se producen por la acción de un

campo eléctrico y de un gas nebulizador, que a altas temperaturas (400°C), evapora el solvente. En este proceso se puede dar una pérdida o ganancia de un protón (H⁺) en cada molécula ionizada, esto se produce por el tipo de modo operado, siendo modo negativo y positivo, en cuanto a pérdida o ganancia de un protón (H⁺), respectivamente. Para garantizar la mayor adquisición de datos metabólicos posible, se recomienda analizar los dos tipos de ionización para cada muestra biológica (Dettmer, et al. 2007).

A continuación, estas partículas ionizadas son transportadas hacia el analizador de masas, donde son separadas en función de su masa/carga (m/z). El analizador de masas utilizado en el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral corresponde al sistema híbrido de **cuadropolo-tiempo de vuelo** (del inglés, *quadrupole Time of Flight -q-ToF*), que son separados por una celda de colisión que permite la fragmentación de estos compuestos. La modalidad de trabajo de un analizador de masas cuadropolo puede ser de dos formas:

- i). Modo de escaneo o “*full scan*”, donde se analizan todas las relaciones masa/carga que se encuentran dentro de un intervalo. Modo utilizado en estudios metabólicos desde una aproximación no dirigida, mientras que;
- ii). Modo monitoreo de ion seleccionado “*selected ion monitoring*”, consiste en la determinación de una relación masa/carga específica, por tanto, responde al supuesto de la generación de una hipótesis previa acerca de los metabolitos analizados (enfoque de estudios metabólicos desde una aproximación dirigida).

Posterior al analizador cuadropolo, las partículas son fragmentadas a través de una celda de colisión y, dichos fragmentos son transportados al analizador de masas tiempo de vuelo. En este analizador los diferentes fragmentos son sometidos a una fuerza electromagnética uniforme que provoca una aceleración de los iones en función de su masa/carga, permitiendo que los fragmentos más ligeros lleguen primero al detector. En este momento, el detector registra los fragmentos en función al flujo o a la abundancia con la cual son expulsados por el analizador de masas.

En la **Tabla 4.1** se describen los principales parámetros durante la adquisición de datos para cada matriz biológica.

Tabla 4.1. Comparación entre diferentes parámetros en la adquisición de datos específicos en la exploración del metaboloma urinario y plasmático.

Parámetros en la adquisición de datos	Metaboloma urinario	Metaboloma plasmático
Cromatografía líquida de alta definición (HPLC)		
Volumen de inyección (μL)	15	5
Fase móvil		
Fase acuosa [A]	[H ₂ O 0.1% AF]	[H ₂ O 0.1% AF]
Fase orgánica [B]	[ACN 0.1% AF]	[MeOH]
Gradiente de elución (t, %B)	(0, 1), (4, 20), (6, 95), (7.5, 95), (8, 1), (12, 1)	(0, 0), (2, 0), (4.5, 85), (7, 100), (9.9, 100), (10, 0) (13, 0)
Volumen de flujo (mL/min)	600	600
Columna cromatográfica de fase		
Modelo	Luna® C18 (2) Phenomenex	Atlantis T3 Waters
Tamaño de partícula (μm)	5	5
Dimensiones (mm)	50 x 2.0	50 x 2.1
Espectrometría de masas (MS)		
Fuente de ionización	IS \pm 4000 V, DP 80 V, FP \pm 380 V, DP2 \pm 10 V, IRD 6, IRW 5	IS - 4000 V & IS + 4000 V, DP -60 V & DP + 70 V, FP -300 V & FP + 200 V, DP2 \pm 10 V, IRD 6, IRW 5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	400	400
Gas cortina	N ₂ (50 L/min)	N ₂ (50 L/min)
Calibración de equipo		
ESI+ (reserpina, 1 pmol/mL)	m/z = 195.0651 & 609.2818	m/z = 195.0651 & 609.2818
ESI- (ácido taurocólico, 1 pmol/mL)	m/z = 79.9568 & 514.2844	m/z = 79.9568 & 514.2844
Full scan ESI- (m/z)	70 - 700	70 - 850
Full scan ESI+ (m/z)	70 - 850	70 - 850

Durante el desarrollo del protocolo analítico para la validación del **metaboloma plasmático**, tres pasos críticos durante la adquisición de datos también fueron evaluados y validados. Estos pasos críticos incluyeron: 1). La valoración de cuatro columnas de separación cromatográfica de fase reversa (Luna, Phenomenex; Atlantis T3, Waters; Synergy Fusion, Phenomenex; Acquity HSS T3, Waters), 2). La combinación de cuatro sistemas de disolventes de elución y grados de calidad ([A] H₂O 0.1% AF/[B] ACN 0.1% AF; [A] H₂O 0.1% AF/[B] MeOH; [A] H₂O 0.1% AF/[B] MeOH 0.1% AF; [A] (ESI+) NH₄Ac 10 mM - (ESI-) NH₄For 10 mM/ [B] ACN 0.1%

AF), y, 3). La implementación de una modificación de la fase móvil orgánica post-columna (MeOH). Sobre la incorporación de una fase móvil orgánica post-columna en el sistema LC-MS, el objetivo de su implementación fue minimizar el efecto matriz y la supresión iónica. Un flujo constante de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ de MeOH fue inyectado en la interfaz de LC-MS, con el fin de reducir la proporción acuosa que llega al detector MS y mejorar la eficiencia de ionización. Esta optimización en la metodología analítica de muestras complejas como plasma a través de estudios metabolómicos no dirigidos, no se había reportado previamente y, se traduce en la mejora significativa de la intensidad de la señal de los metabolitos monitorizados en el cromatograma (Tulipani, et al. 2015).

Para garantizar la calidad de los datos obtenidos durante la adquisición y, monitorear constantemente la estabilidad del equipo, un conjunto de **controles de calidad** (del inglés, *Quality Control*, QC) fueron incluidos después de una secuencia previamente aleatorizada de 15 a 20 muestras biológicas inyectadas (Dettmer, et al. 2007; Gika, et al. 2012; Gika, et al. 2014). De acuerdo con la matriz biológica analizada en los estudios reportados en la presente Tesis Doctoral, los QC corresponden con una selección validada previamente en el grupo de investigación (ver **Tabla 4.2**) (Llorach, et al. 2009; Tulipani, et al. 2011; Tulipani, et al. 2015). Para evitar un posible sesgo en la comparación inter-método, todos los extractos resultantes de las diferentes técnicas de preparación de muestras fueron analizados en orden aleatorizado, excepto cuando no fuera posible (como en la comparación entre las diferentes columnas RF o en el análisis con o sin la fase móvil orgánica post-columna). Las muestras se dividieron en *sub-batch* homogéneos, donde aproximadamente cada 10 inyecciones de muestras de plasma se inyectaba muestras de controles de calidad (QCs, ~30% del total de las inyecciones). Antes del análisis, se inyectaron un mínimo de dos QC2 y diez muestras biológicas con el fin de comprobar la idoneidad del sistema y para acondicionar el sistema con la matriz biológica de la muestra. Analyst QS 2.0 software fue utilizado para la adquisición de datos y control del sistema (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Tabla 4.2. Controles de calidad (QC) utilizados en estudios metabolómicos para la exploración del metaboloma urinario y plasmático.

Control de calidad (QC)	Metaboloma urinario	Metaboloma plasmático
QC1	H ₂ O MilliQ	H ₂ O MilliQ
QC2	Solución acuosa de compuestos fenólicos (5 ppm): ácido 4-hidroxihipúrico, ácido hidroxindolacético, procianidina, epicatequina.	Solución acuosa de metabolitos endógenos y exógenos (5 ppm): L-citrulina, acetilcolina, L-carnitina, acetyl-L-carnitina, L-valina, L-isoleucina, L-leucina, L-fenilalanina, L-triptófano, ácido α -hidroxisobutírico, ácido 4-hidroxihipúrico, ácido gálico, (-)-epicatequina, ácido síringico, ácido sebácico, ácido glicoquenosodioxicolico, naringenina, ácido dodecanedioico, ácido palmítico y ácido esteárico.
QC3	Solución acuosa de metabolitos endógenos (5 ppm): L-citrulina, L-fenilalanina, desoxiguanosina, triptófano y, ácido glicoquenosodioxicolico.	Re-inyección de muestras de plasma aleatorias durante toda la secuencia del análisis.
QC4	Re-inyección de muestras de orina aleatorias durante toda la secuencia del análisis.	---
Estándar interno (IS)	L-fenilalanina ¹⁵ N	Ácido glicocólico (1- ¹³ C glicina); 1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfolina (control negativo)
Estándar externo (ES)	Ácido indolacético-d ₂	Acetil-d ₃ -L-carnitina, ácido indol-3-acético-d ₂

4.2.3 Análisis de datos

La complejidad y el volumen de los datos generados a través de una plataforma analítica como LC-MS en un estudio metabolómico no dirigido, requiere diferentes tratamientos matemáticos para extraer de ellos toda la información biológica que sea posible y, garantizar la fiabilidad de los biomarcadores identificados como discriminantes. A este conjunto de tratamientos matemáticos se conoce como análisis de datos y, requiere para su desarrollo, el uso de técnicas quimiométricas avanzadas como el análisis estadístico multivariante (Gürdeniz, et al. 2013).

La estrategia aplicada en el análisis de los datos adquiridos a través de la plataforma LC-MS en los estudios metabolómicos no dirigidos que se describen en esta Tesis Doctoral, fue realizada a través de tres etapas secuenciales: i). Pre-procesamiento de datos, ii). Tratamiento de datos y, iii). Análisis bioestadístico. Esta metodología ha sido desarrollada a partir de la experiencia del grupo de investigación (Llorach, et al. 2010; Llorach, et al. 2009; Tulipani, et al. 2011) y del estudio de metodologías descritas en la literatura científica (Bijlsma, et al. 2006; Smilde, et al. 2013; Yang, et al. 2015).

-
- **Pre-procesamiento de datos.** Esta etapa incluye una serie de procedimientos secuenciales como: filtración, detección, alineamiento y corrección de valores perdidos (en inglés, *missing value*) de los datos metabólicos, con el fin de obtener una matriz de datos “limpios” que representa a cada compuesto en dos dimensiones (relación masa/carga y tiempo de retención), a lo que se denomina señal de masa o “*feature*” (Castillo, et al. 2011). Una señal de masa es un término utilizado en la literatura para describir cualquier pico cromatográfico que puede tener o no una identidad establecida y, que se define como cualquier compuesto químico (no necesariamente un metabolito, sino un aducto, fragmento o isótopo relacionado a un metabolito) que reporta una relación de masa/carga (m/z) a un tiempo de retención (RT) específico (Sumner, et al. 2007).

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral el software MarkerView™ 1.2.1 (AB Sciex) fue utilizado para realizar la filtración, la detección y el alineamiento de los picos. Mientras que Microsoft Excel 2013 y el software SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos de América) fueron utilizados para la corrección de los valores perdidos en la matriz de datos.

i). El objetivo de la *filtración* es eliminar aquellas señales que no aportan información y son consideradas como ruido de base, por tanto, se trata de la corrección de la línea base. Este procedimiento se realiza a través del establecimiento de un umbral de intensidad (del inglés, *threshold*) que reduce el ruido químico (generado por el proceso de medida) y el ruido aleatorio (asociado al sistema de detección). Este procedimiento mejora el análisis y reduce posibles falsos positivos en el análisis estadístico.

ii). La *detección* (del inglés, *peak-picking*) consiste en la identificación de cada una de las señales de acuerdo con el tiempo de retención (RT) y la relación masa/carga (m/z) registradas a partir de la plataforma analítica LC-MS. Cada pareja m/z -RT corresponde a una señal de masa, que posteriormente serán consideradas como variables detectadas para cada muestra dentro de la matriz de datos “limpias”.

iii). El *alineamiento* es un método que permite ordenar y asociar las señales de masa que corresponden a un mismo metabolito con el fin de unificar datos procedentes de diferentes muestras.

Los valores perdidos (del inglés, *missing values*) pueden ser causados por diferentes razones:

- i). El pico estaba presente en la muestra/cromatograma, pero se pierde en la detección del pico;
- ii). El pico no estaba presente en la muestra/cromatograma; o
- iii). El pico estaba presente en la muestra/cromatograma, pero fue intensidad está por debajo del umbral.

La presencia de estos valores perdidos pueden afectar el análisis y generar falsos positivos, por tanto, es importante reducir al máximo su presencia. Las estrategias para la determinación de los valores perdidos en los estudios metabólicos no dirigidos desarrollados en esta Tesis Doctoral fueron construidas de acuerdo con publicaciones previas (Bijlsma, et al. 2006; Gürdeniz, et al. 2013; Yang, et al. 2015).

- **Tratamiento de datos.** El objetivo principal durante esta etapa consiste en minimizar al máximo las interferencias experimentales e instrumentales generadas durante la preparación de las muestras y la posterior adquisición de datos, esto con el fin de reducir el error sistémico que puede explicar la variabilidad entre las muestras por causas diferentes a las biológicas. Las operaciones que se aplican con mayor frecuencia en el tratamiento de datos son la transformación, el centrado y el escalado de los datos. El tratamiento de datos fue realizado con el software SIMCA 13.0 (Umetrics, Umeå, Sweden).

i). La *transformación* de datos consiste en la corrección de la heteroscedasticidad (variación de las señales que no es constante en todas las muestras) y el incremento de la simetría de su distribución. Por tanto, la transformación de los datos se utiliza para normalizar las variables con el fin de seguir una distribución normal. El método utilizado en los estudios metabólicos reportados en esta Tesis Doctoral fue la transformación logística.

ii). El *centrado* de datos consiste en la operación que traslada el centro de gravedad de un conjunto de datos en cero en vez de la media, este procedimiento se realiza con el fin de eliminar la importancia de determinadas señales.

iii). En el *escalado* de datos se divide cada una de las variables de una misma señal de masa por un factor (factor de escalado), con el objetivo de ajustar las diferentes señales de masa o metabolitos a una misma importancia, independiente de su concentración o abundancia. El método de escalado más reportado en estudios metabólicos es el escalado por Pareto, que consiste en utilizar como factor de escalado la desviación estándar de los mismos datos. Este método de escalado es el utilizado en los estudios metabólicos reportados en esta Tesis Doctoral.

- **Análisis bioestadístico.** La multidimensionalidad de los datos es una de las características potenciales más destacadas en un estudio metabólico no dirigido, puesto que permite desentramar información biológica importante que, con otro tipo de estudios, no es posible establecer. Sin embargo, esta característica se traduce en un conjunto de datos que contiene un número de variables (muy superior) con respecto al número de muestras y, que conduce a una matriz enorme y compleja difícil de interpretar. En este sentido, diversos métodos quimiométricos de tipo matemático, estadístico y representaciones gráficas o simbólicas, son empleados con el fin de reducir esta dimensionalidad y maximizar la información que puede ser extraída desde los datos espectrales adquiridos a través de análisis univariante, bivariante y multivariante (Eliasson, et al. 2011; Gromski, et al. 2015; Madsen, et al. 2010; Wheelock and Wheelock 2013).

Durante el pre-procesamiento y el tratamiento de los datos, diferentes métodos de interdependencia propios del **análisis multivariante** fueron aplicados con el fin de: 1). Realizar una evaluación inicial de la calidad de los datos adquiridos (PCA) y, 2). Seleccionar e identificar los biomarcadores discriminantes entre los grupos en estudio (OSC-PLS-DA y HCA) (Xi, et al. 2014).

El análisis multivariante se refiere al estudio de tres o más variables de forma simultánea que permite identificar aquellas características espectrales biológicamente relevantes, no establecidas por medio de técnicas de análisis estadístico uni- y bi-variante. Los **métodos de interdependencia** se caracterizan por no generar diferenciación entre variables dependientes e independientes y, se clasifican según la información de agrupamiento de los datos de que se dispone *a priori* en: i). **Métodos no supervisados**: en los cuales no se aporta información acerca de la clasificación de las muestras analizadas o, en caso de disponerse, la información es insuficiente. El objetivo de estos métodos no supervisados es poner de manifiesto tendencias que están ocultas en la matriz de datos que corresponden a los espectros de las muestras. Como ejemplos de métodos no supervisados se destaca el análisis de componentes principales (del inglés, *Principal Component Analysis*, PCA) y los análisis de cluster jerárquicos (del inglés, *Hierarchical Clustering Analysis*, HCA); ii). **Métodos supervisados**: se caracterizan por una categorización *a priori* en el colectivo de las muestras, por lo que los modelos generados utilizan esta información para análisis las muestras desconocidas. El análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (del inglés, *Partial Least Square Discriminant Analysis*, PLS-DA) es el ejemplo más utilizado de este tipo de métodos. En esencia, tanto métodos supervisados como no supervisados tienen por objetivo diferenciar entre clases de conjuntos de datos de alta complejidad, a pesar de su gran variabilidad dentro de la misma clase. A continuación, estos métodos de análisis multivariante se describirán brevemente.

Análisis de componentes principales (PCA). Esta técnica de análisis no supervisado fue utilizada para la evaluación inicial de los datos adquiridos del pre-procesamiento y el tratamiento en los estudios metabolómicos. Se clasifica dentro de los métodos de simplificación o reducción de dimensiones, ya que se aplica a un conjunto elevado de variables cuantitativas interrelacionadas con el fin de transformarlo y obtener un nuevo conjunto con menor número variables, en este caso ortogonales, como producto de combinaciones lineales de las variables originales, al que se denomina componentes principales (PC).

Este nuevo conjunto de variables se caracteriza por estar incorrelacionadas entre sí (Yamamoto, et al. 2014). En un PCA se realiza una síntesis de nuevas variables, mediante las cuales se pretende explicar la máxima variabilidad de los datos y revelar la estructura interna de los datos respecto a la varianza. En este sentido, el primer componente (PC1) describe la máxima varianza del conjunto de datos y, por tanto, las siguientes componentes explican de forma decreciente y excluyendo la componente anterior, la varianza de los datos. Un PCA también es considerado un análisis exploratorio de los datos al permitir identificar la distribución general de los datos y la detección de valores atípicos (del inglés, *outliers*). Los gráficos de dispersión obtenidos a partir de un PCA se conocen como “*scores-plot*” y “*loading-plot*” (ver **Figura 4.5**).

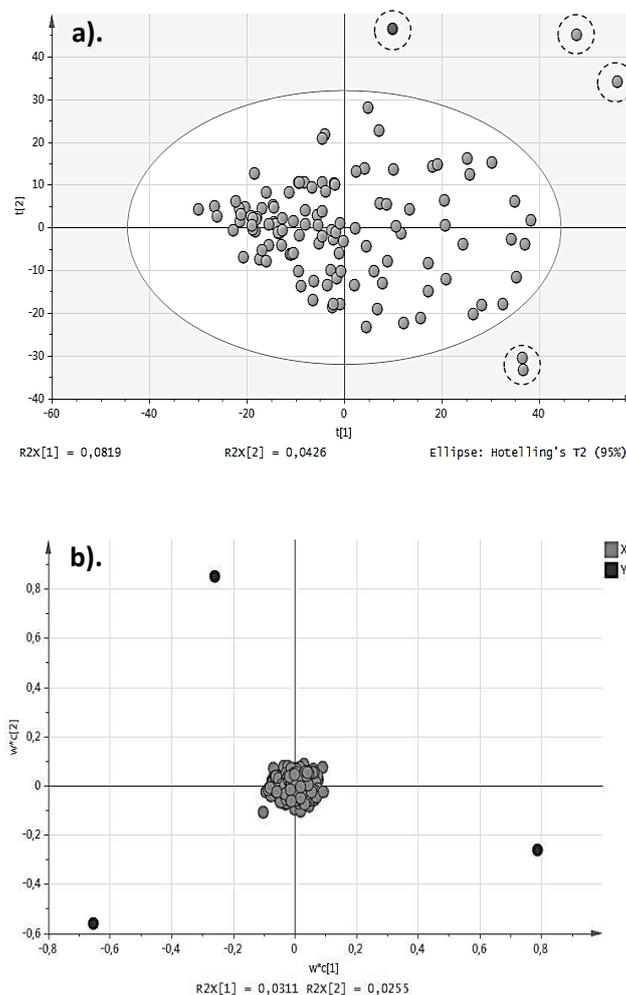


Figura 4.5. a). *Scores-plot*, a través de este gráfico es posible identificar casos atípicos (del inglés, *outliers*) señalados en los círculos de líneas punteadas y considerar su exclusión en futuros análisis. b). *Loading-plot*, la variable X representa la distribución de los metabolitos, mientras que la variable Y hace referencia a las clases con las cuales fueron creados los modelos.

La matriz de puntuaciones “*scores-plot*” expresa los datos originales transformados en los valores de las componentes principales, lo cual representa las muestras analizadas y, puede interpretarse como las diferencias y similitudes entre dichas muestras; mientras que, la matriz de cargas “*loading-plot*” contiene los coeficientes de transformaciones lineales de las variables originales que dan lugar a la nueva componente principal y, por tanto, corresponden a los metabolitos analizados en el proceso de proyección. En este sentido, la dirección en la cual se proyecta el “*loading-plot*” (que representan a los metabolitos o *señales de masa*) corresponde a la dirección en el “*scores-plot*” (que representa la agrupación de las muestras), de esta manera es posible establecer que metabolitos son responsables de la agrupación de las muestras en el PCA (Trygg, et al. 2007).

Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). A través de este análisis fue posible identificar los biomarcadores discriminantes según las clases generadas en los modelos reportados en los estudios de esta Tesis Doctoral. A diferencia de técnicas no supervisadas como PCA, en un PLS-DA se analizan datos que se caracterizan por muchas variables predictoras con problemas de multicolinealidad, de forma que consigue reducir las dimensiones de la matriz, establecer fronteras entre las clases y hacer un análisis discriminante que clasifica las nuevas muestras según el modelo confeccionado. Además, el algoritmo PLS-DA proporciona en estudios metabolómicos una alternativa para filtrar información no correlacionada con las clases previamente establecidas (por ejemplo, ingesta o no de frutos secos). En este sentido, el PLS-DA proyecta los datos medidos como variables X (biomarcadores detectados a través del análisis LC-MS) en espacios de pocas dimensiones que maximizan la separación entre los grupos previamente definidos (variables Y) en “*variables latentes*”. Estas variables latentes se ordenan de acuerdo con la varianza explicada en la variable Y. R^2 es un criterio que permite valorar la robustez del análisis PLS-DA, ya que estima la bondad de ajuste o porcentaje de variación explicada y, toma valores desde 0 a 1, donde valores cercanos a 1 indican que el modelo es capaz de clasificar correctamente las muestras en las clases previamente definidas.

Al igual que un PCA, el PLS-DA los resultados se visualizan a través de gráficos de dispersión “scores-plot” y “loading-plot”, los cuales presentan la misma funcionalidad que en los métodos no supervisados (ver **Figura 4.6**).

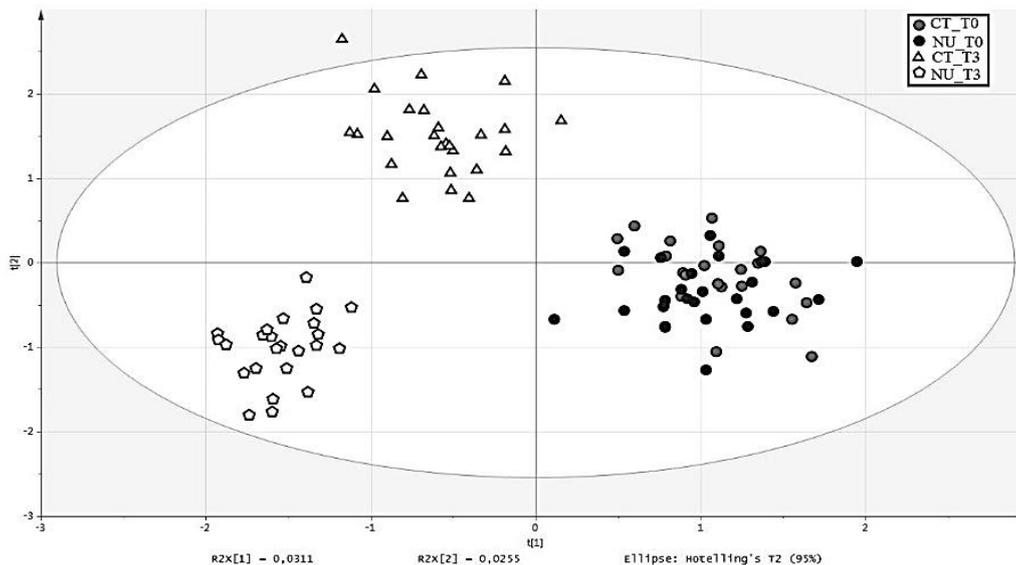


Figura 4.6. A través de un modelo PLS-DA es posible identificar las relaciones fundamentales entre las variables X (señales de masa) y las variables Y (clases con las cuales se construye el modelo).

Corrección ortogonal de las señales (OSC). Un error común en un análisis PLS-DA está asociado con el enmascaramiento de efectos por causa de variaciones no deseadas que no se relacionan con la variable Y, respuesta de interés. Para evitar estas perturbaciones, se hace necesaria la creación de un filtro multivariante OSC (del inglés, *Orthogonal Signal Correction*) antes de realizar un análisis PLS-DA. Este filtro consiste en eliminar la información de la matriz X que no está relacionada (es decir, es ortogonal) con la variable Y (Llorach, et al. 2009; Trygg, et al. 2007). En la presente Tesis Doctoral el filtro de corrección ortogonal de las señales fue aplicado en los dos estudios (OSC-PLS-DA), tanto en la exploración del metaboloma urinario como el plasmático, ambos estudios desde una aproximación no dirigida.

La validación de los modelos PLS-DA garantizan la predicción del modelo construido en caso de que nuevas muestras se deseen clasificar y ser asignadas a una clase específica. Para garantizar esta robustez del modelo, pruebas de

validación cruzada, pruebas de permutación y pruebas de doble validación cruzada fueron realizadas (Smilde, et al. 2013; Szymanska, et al. 2012).

En una **prueba de validación cruzada** (del inglés, *cross-validation*, *CV*) el conjunto de muestras es dividido aleatoriamente en dos grupos: i). Grupo de entrenamiento o “*training set*”, conjunto de datos con los cuales se crea el modelo y; ii). Grupo de validación o “*validation set*”, conjunto de datos con el cual se comprueba el modelo. Las pruebas de validación cruzada realizadas para los estudios metabolómicos reportados en esta Tesis Doctoral, fueron repetidos (iteraciones) con el fin de garantizar la robustez de los modelos. Como producto de esta validación se obtiene un valor Q^2 o error de predicción, que nos indica lo correcto que puede predecir una variable (o clase Y) cuando son introducidos nuevos valores en el modelo. El rango de valor de Q^2 puede variar de 0 a 1, donde 0 indica que el modelo no tiene capacidad predictiva y, 1 donde la capacidad predictiva es máxima (Westerhuis, et al. 2008) (ver **Figura 4.7**).

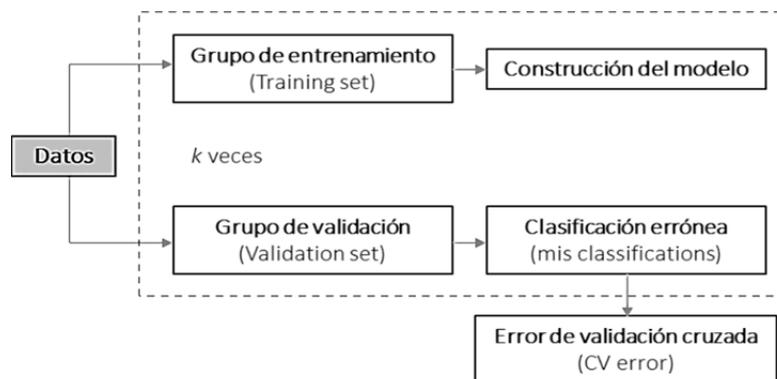


Figura 4.7. Esquema básico seguido a través de una validación cruzada (CV).

Tomada de: Smilde, et al. 2013.

Por otra parte, en una **prueba de permutación**, se evalúa si la clasificación de las muestras que se ha realizado para el modelo es mejor que cualquier otra clasificación escogida al azar (Bijlsma, et al. 2006; Westerhuis, et al. 2008). Durante esta prueba de permutación, que se realiza de forma iterativa n veces de forma predeterminada (que en el caso de los estudios reportados en esta Tesis Doctoral, $n=200$) se puede calcular un nuevo modelo a partir de la

clasificación aleatoria, el cual aporta nuevos valores R^2 y Q^2 , que son comparados con los valores obtenidos en el modelo real. El gráfico resultante representa en la parte superior derecha los valores R^2 y Q^2 originales y, en la parte inferior izquierda los valores R^2 y Q^2 finales obtenidos en la prueba de permutación (ver **Figura 4.8**).

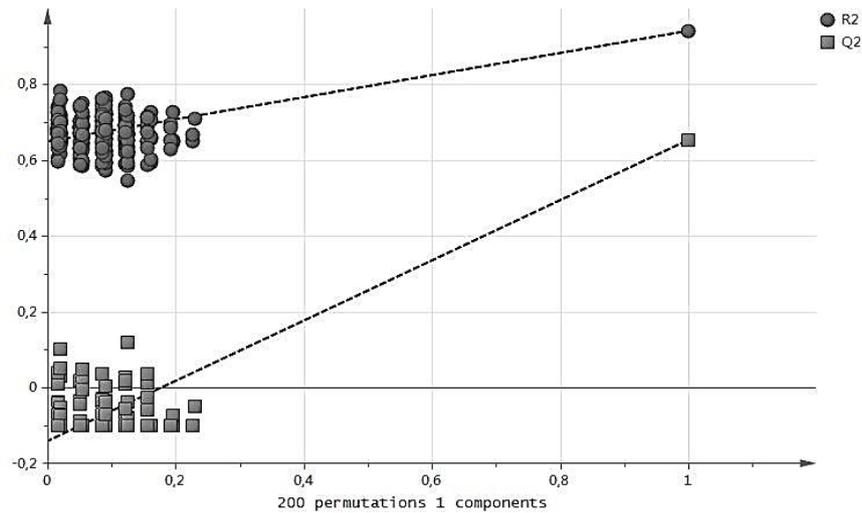


Figura 4.8. Gráfico resultante de las pruebas de permutación ($n = 200$), donde $R^2 = 0.608$ y $Q^2 = -0.138$.

Una prueba adicional de validación de los modelos fue realizada, se trata de una **prueba de doble validación cruzada**. En este caso, el grupo de entrenamiento o “*training set*” corresponde al 80% de las muestras, mientras que el grupo de validación o “*validation set*” corresponden al 20% de las muestras restantes. Al igual que en la prueba de validación cruzada, el modelo es creado con el grupo de entrenamiento y, validado con el resto de la población a través de 5 iteraciones.

Selección de variables discriminantes. Luego de garantizar la validez de los modelos creados, la selección de las variables discriminantes que explican la agrupación de las muestras previamente establecidas fue realizada, como un objetivo primordial, en el descubrimiento de biomarcadores en un estudio metabólico no dirigido. Esta selección de variables es posible a través de varias estrategias, como el valor VIP y el $p(\text{corr})$. Gráficamente es posible identificar estas variables discriminantes a través de un diagrama de

dispersión a dos o tres dimensiones donde se utilicen las variables VIP y $p(\text{corr})$ en los ejes.

Los **valores de la importancia de la variable en la proyección** (del inglés, *Variable Importance in the Projection, VIP*) son mediciones que representan la contribución de cada variable dentro del modelo PLS-DA. Lo cual significa que a mayor valor de VIP, mayor será la importancia de esta variable dentro del modelo (Xia, et al. 2013). De acuerdo con la literatura, la mayoría de los estudios metabolómicos normalmente reconocen a una variable como discriminante si presenta $VIP > 1$ (Eriksson 2006). El $p(\text{corr})$ es otro parámetro utilizado habitualmente en la selección de variables discriminantes. Este valor representa la correlación entre la variable X y el valor p o peso de cada metabolito dentro del modelo. Al igual que las correlaciones de Spearman o de Pearson, el $p(\text{corr})$ toma valores entre -1 y +1. En los estudios reportados en esta Tesis Doctoral, se considera valores como punto de corte en la selección de variables discriminantes, donde las variables con $p(\text{corr}) < 0$ se relacionan con efecto, mientras que señales de masa con $p(\text{corr}) > 0$ se asocian a la exposición a frutos secos.

La visualización de los valores VIP y $p(\text{corr})$ es posible a través de gráficos de dispersión como *S-plot (score plot)*. A través de un *S-plot* es posible representar tanto la covarianza como la correlación entre las señales de masa y, su alta o baja regulación según la designación de clase (o grupo) dentro de un modelo. Normalmente estos gráficos tienen forma de S, por este motivo su nombre (Wiklund, et al. 2008). Para disminuir la presencia de falsos positivos en los estudios reportados en esta Tesis Doctoral, se considera como punto de corte en la selección de variables discriminantes, a toda señal de masa que reporte valores de $VIP > 2$, $|p(\text{corr})| \geq 0.5$ y $|p| \geq 0.05$ (ver **Figura 4. 9**).

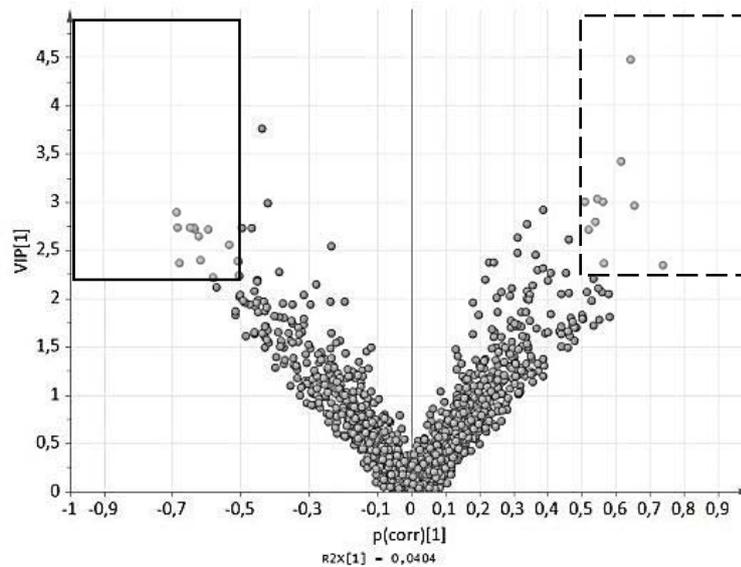


Figura 4.9. A través de gráficos de dispersión con VIP vs p (corr) es posible identificar tanto las señales de masa discriminantes en un modelo como su regulación. Los recuadros en líneas punteadas y lisas representan las señales de masa discriminantes de acuerdo con los puntos de corte y alta o baja regulación, respectivamente.

4.2.4 Identificación de biomarcadores

La identificación de biomarcadores es uno de los pasos más críticos y complejos durante el flujo de trabajo en nutrimetabolómica (Alonso, et al. 2015). Este paso requiere de un minucioso desarrollo con el fin de garantizar que las señales de masa detectadas como discriminantes correspondan con el metabolito específico. En otras palabras, sin una identificación correcta de biomarcadores podría decirse que un estudio metabolómico no tiene sentido, ya que no es posible interpretar química y biológicamente los metabolitos asociados a los cambios metabólicos analizados en el estudio (Bingol, et al. 2016; Wishart 2011).

En este contexto, se entiende por identificación de metabolitos a un proceso de análisis multifacético que tiene por objetivo la identificación definitiva o “supuesta” (del inglés, *putative*) de compuestos químicos de bajo peso molecular (15 a 1500 Da) en una muestra biológica (Wishart 2011). En metabolómica no dirigida, este objetivo es aún más ambicioso, ya que incluye la identificación de metabolitos con diferentes clases químicas, polaridades, naturaleza endógena o exógena, e incluso, moléculas que posiblemente no se encuentren en las bases de

datos espectrales disponibles para la identificación de metabolitos. Sumner *et al.* 2007 proponen cuatro niveles de identificación de metabolitos a partir de un estudio metabolómico (Sumner, et al. 2007):

- Nivel I: compuestos positivamente identificados. Incluye la comprobación del patrón de fragmentación y, de la relación m/z y tiempo de retención con el estándar comercial. Con esta identificación es posible establecer el nombre químico del metabolito, su estructura molecular y, su número CAS o identificador InChi (Coles, et al. 2005).
- Nivel II: compuestos “supuestamente” identificados. Corresponde a la identificación de metabolitos a través de la comparación del patrón de fragmentación y, relación m/z y tiempo de retención con información reportada en bases de datos espectrales o literatura científica.
- Nivel III: compuestos “supuestamente” identificados en una clase química. Corresponde únicamente a la identificación y clasificación del compuesto en una clase química específica. Por ejemplo, al clasificar un lípido como fosfolípidos o triglicéridos.
- Nivel IV: compuestos desconocidos. Aunque no son identificados ni clasificados dentro de una clase química específica, las señales de masa asociadas a este metabolito pueden correlacionarse como aductos, isómeros, etc. Estos metabolitos que no han sido descritos en la literatura científica ni reportados en bases de datos espectrales previamente, pueden ser “nuevos” biomarcadores potenciales (Bowen and Northen 2010; Wishart 2009).

En un estudio metabolómico no dirigido con datos adquiridos a través de la plataforma LC-ESI-MS, cada señal de masa identificada como discriminante en los pasos anteriores proporciona la siguiente información relevante para la caracterización molecular: i). Relación masa/carga (m/z); ii). Tiempo de retención (RT) y, en algunos casos, iii). Patrones de fragmentación. Además, durante la ionización por electropulverización en el espectrómetro de masas es posible que un mismo metabolito pueda formar múltiples tipos de iones, entre ellos, los aductos. La formación de estos aductos depende del modo de ionización, siendo la adición de Na⁺ o K⁺ en la estructura de la molécula las formas más comunes en el

modo de ionización positiva (Dunn, et al. 2013). Teniendo en cuenta esta información, se aplican diferentes estrategias como el análisis bioestadístico, la comparación de información espectral obtenida a nivel experimental con repositorios disponibles en bases de datos de libre acceso, diferentes fuentes de literatura científica y, la realización de experimentos MS/MS, para garantizar la identificación adecuada de los metabolitos y reducir significativamente los falsos positivos en este proceso.

Un primer paso en la identificación de metabolitos, consistió en la confirmación de las diferencias estadísticamente significativas entre las señales de masa discriminantes según los grupos o clases de acuerdo con los modelos construidos. Esta comparación fue desarrollada a través de **análisis univariante** (SPSS 21.0, SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos de América), el cual es un análisis estadístico realizado a una sola variable presente en dos o más grupos. De acuerdo con la distribución normal de la variable entre los grupos, los datos pueden ser tratados con pruebas paramétricas (en aquellos casos que la variable presenta una distribución normal) o pruebas no paramétricas (cuando la variable sigue una distribución no normal). En el caso de variables normales se trabaja con la media, mientras que en el caso de variables no normales se trabaja con la mediana. La comparación entre dos grupos (independientes o relacionados) a través de pruebas paramétricas se realiza por medio de un test *T de Student*, mientras que en pruebas no paramétricas se realiza a través del test de *Mann-Whitney* y el test de *Wilcoxon*, según sean muestras independientes o relacionadas, respectivamente. Cuando existen más de dos grupos de comparación, cuya variable presenta una distribución normal, se realiza una ANOVA. En el caso de pruebas no paramétricas con más de dos grupos, el test de *H de Kruskal-Wallis* o el test de *W de Kendall* son realizadas, según sean muestras independientes o relacionadas, respectivamente.

Una vez seleccionadas las señales de masa con diferencias estadísticamente significativas y, se procede a establecer las posibles relaciones entre ellas a partir de un **análisis de clúster jerárquicos (HCA)**. Esta técnica no supervisada permite agrupar los datos como similares o diferentes, de acuerdo con un cálculo de distancias entre ellos. Generalmente, las determinaciones de estas distancias se

realizan a través de correlaciones de *Pearson* y el método de *Ward*. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, HCA fueron creados para establecer las correlaciones entre diferentes *señales de masa* que presentan el mismo tiempo de retención y pueden corresponder a aductos o isotopos de un mismo metabolito (ver **Figura 4.10**).

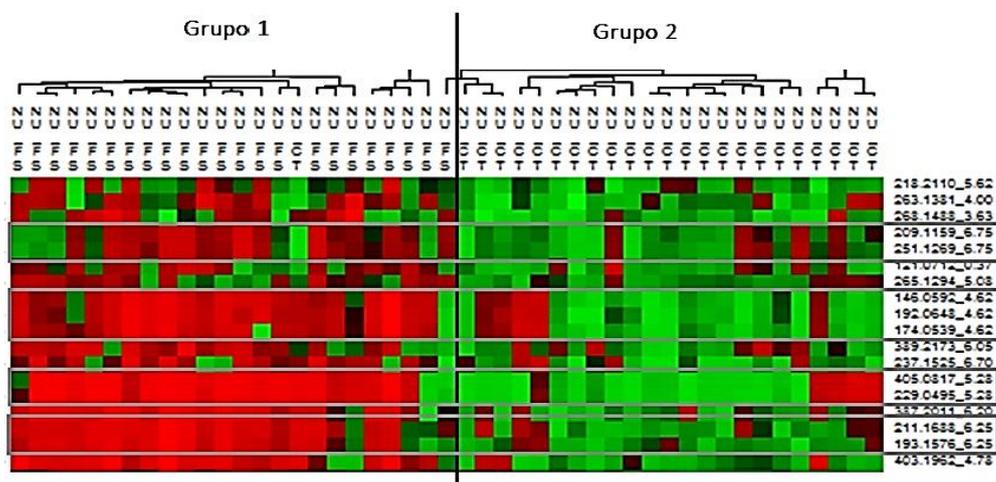


Figura 4.10. El análisis jerárquico de clúster (HCA) permite, a través de una representación gráfica de mapa de colores, identificar posibles asociaciones entre diferentes señales de masa y, de esta manera optimizar los procesos de identificación de biomarcadores.

Teniendo en cuenta las posibles asociaciones entre las diferentes señales de masa, se inició una búsqueda minuciosa en diferentes bases de datos espectrales y en literatura científica, con el fin de caracterizar a estos compuestos. Algunas bases de datos online de libre acceso utilizadas fueron las siguientes: MAIT, KEGG, MassBank, MZedDB, PubChem, LIPIDMAPS, Metabolite and Tandem MS Database (METLIN), Manchester Metabolomics Database (MMD), Golm Metabolome Database (GMD) y HMDB (Mitchell, et al. 2014). Sin embargo, la manera más adecuada de confirmar la identidad química de los biomarcadores (nivel I) es a través de estrategias de metabolómica dirigida, como MS/MS. Asimismo, de acuerdo con el nivel de evidencia reportada en la identificación los biomarcadores pueden ser clasificados desde nivel I (máximos criterios de identificación) a nivel IV reportados como metabolitos desconocidos (Sumner, et al. 2007).

4.2.5 Interpretación biológica

En este paso final se da respuesta a la pregunta de investigación de acuerdo con los biomarcadores discriminantes identificados previamente y, abre nuevas hipótesis acerca de las implicaciones de los biomarcadores discriminantes identificados previamente en un contexto biológico y clínico. Estos metabolitos al ser el producto de diversos procesos bioquímicos en el organismo, permiten, a través de su seguimiento, el reconocimiento de las rutas metabólicas a través de las cuales se presentan alteraciones en el sistema biológico como consecuencia de una anomalía metabólica (en el caso de enfermedad) o a la exposición (por ejemplo, tras la ingesta de un determinado alimento). Por tanto, la identificación de los perfiles de los metabolitos es el andamio de apoyo en la interpretación biológica de la metabolómica, lo cual permite obtener un marco general acerca de los cambios metabólicos que caracterizan a una condición específica, como lo es la respuesta a una ingesta.

Con el fin de lograr una interpretación biológica contundente, establecer los posibles mecanismos biológicos implicados a partir de los biomarcadores identificados y, evaluar las posibles relaciones entre la información metabolómica reportada y datos clínicos o de ingesta correspondientes a la población participante en cada estudio, diferentes estrategias fueron utilizadas en los estudios reportados en esta Tesis Doctoral:

- Una primera estrategia consiste en la búsqueda exhaustiva de bibliografía científica relacionada con los biomarcadores identificados, esta estrategia permitió comparar los resultados obtenidos y establecer concordancia o divergencia de acuerdo con diversos factores como son el diseño del estudio, las técnicas analíticas empleadas, la tipología del estudio *in vitro* o *in vivo*, las características de la población (edad, estado clínico, género, entre otros) y, el control de la dieta, entre otros factores. Un estado de arte robusto permite la generación de nuevas hipótesis a la luz de los resultados obtenidos.

- Otra estrategia interesante fue la visualización de los biomarcadores identificados dentro de rutas metabólicas específicas, esto es posible a través del uso de bases de datos como KEGG y MetaCore® que permiten ubicar un metabolito dentro de un contexto biológico específico (Scalbert, et al. 2014a; Zhang and Watson 2015). Esta estrategia además de la visualización de los metabólicos en un escenario biológico, permite identificar conexiones con otras entidades biológicas como metabolitos, enzimas, proteínas, transcriptomas o géneros y, de esta manera establecer mecanismos de acción asociados a la regulación de los biomarcadores discriminantes.
- Una tercera estrategia consistió en valorar la capacidad predictiva y discriminante de los biomarcadores de exposición alimentaria con respecto al registro dietético a través de la construcción de curvas ROC. El análisis de curva ROC o curva de rendimiento diagnóstico (del inglés, *receiving operating characteristics*) es considerado ampliamente como el método más objetivo y estadísticamente válido para la evaluación de biomarcadores (Obuchowski, et al. 2004; Xia, et al. 2013). Se fundamenta en la capacidad para evaluar el poder discriminatorio y predictivo de una prueba diagnóstica binaria a través de parámetros como la **sensibilidad** y la **especificidad**, con el objetivo de clasificar correctamente a los sujetos dentro de un grupo, por ejemplo, sujetos sanos vs sujetos enfermos o consumidores vs no consumidores. La sensibilidad es la capacidad que posee un modelo logístico (variable Y binaria) para identificar y predecir correctamente los casos positivos (verdaderos positivos, del inglés *true positives*, *TP*), por ejemplo, clasificar correctamente un biomarcador como discriminante de un grupo de consumidores; mientras que, la especificidad es la capacidad del modelo para clasificar correctamente a los casos negativos (verdaderos negativos, del inglés *true negatives*, *TN*), por ejemplo, clasificar correctamente a los controles o no consumidores con aquellos que no reportan un determinado biomarcador. El cálculo de estos parámetros se realiza a través de las siguientes ecuaciones:

$\text{Sensibilidad} = \frac{TP}{(TP + FN)}$	$\text{Especificidad} = \frac{TN}{(TN + FP)}$
--	---

Donde, *TP* son casos verdaderos positivos; *FN* son falsos negativos, es decir, casos que se reportan como negativos cuando son positivos; *TN* son casos verdaderos negativos y; *FP* son falsos positivos, es decir, casos que se reportan como positivos cuando en realidad son negativos.

La curva ROC es una representación gráfica de los parámetros sensibilidad (variable dependiente, Y) y especificidad (variable independiente, X) de un modelo, prueba diagnóstica o biomarcador (ver **Figura 4.11**). De acuerdo con el contexto de esta Tesis Doctoral, se considera que un biomarcador presenta un alto poder predictivo y discriminante cuando su sensibilidad es igual a 1 y su especificidad es igual 0 (1-especificidad). Esta forma de cuantificar el poder discriminatorio y predictivo se realiza a través de la determinación del área bajo la curva (del inglés, *Area Under the Curve, AUC*), que de acuerdo con el rango de valores, es posible clasificar la capacidad discriminante de un biomarcador (Xia, et al. 2013) o un conjunto de biomarcadores (Garcia-Aloy, et al. 2014), como:

- Excelente = 0.9 – 1.0.
- Buena = 0.8 – 0.9.
- Regular = 0.7 – 0.8.
- Pobre = 0.7 – 0.6.
- Mala = 0.6 – 0.5.

Según la ecuación:

$$d = \sqrt{[(1 - Sn)^2 + (1 - Sp)^2]}$$

Donde, *d* es la distancia de cada uno de los puntos de corte en la curva ROC, *Sn* se refiere a la sensibilidad y, *Sp* a la especificidad.

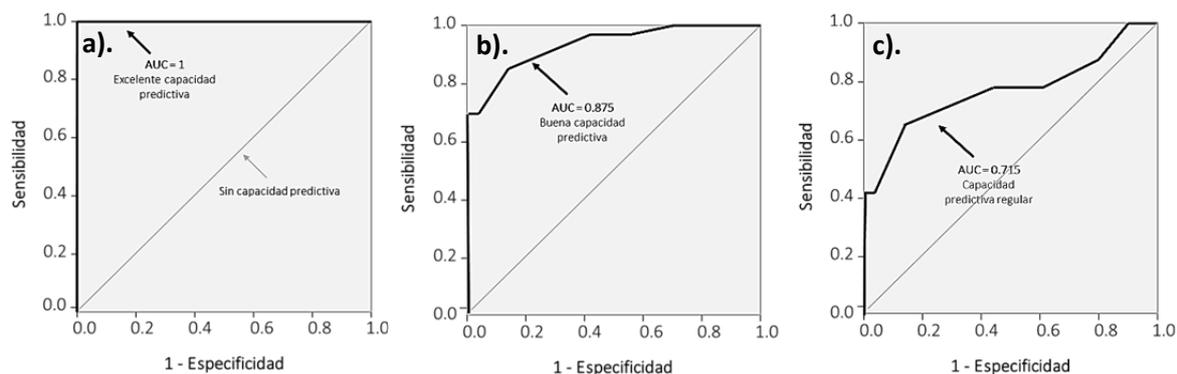


Figura 4.11. Ejemplos de diferentes curvas ROC que representan la capacidad predictiva de la prueba de acuerdo con el AUC, como a). Excelente, b). Buena y, c). Regular.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, la visualización de las curvas ROC y el análisis de significancia estadística entre los grupos se utilizó a través de la librería *pROC* del paquete estadístico Rstudio 3.0.1 Inc. (Robin, et al. 2011).

- Otra estrategia fundamental en la interpretación biológica de los biomarcadores nutricionales en el contexto de la salud consiste en verificar eventuales asociaciones directas/inversas entre los productos de metabolismo (biomarcadores) y el estado clínico (parámetros clínicos y bioquímicos) de los sujetos en estudio, con el fin de elucidar nuevas aproximaciones acerca del efecto real de la alimentación en la salud. Esta aproximación fue posible a través de **análisis bivariante (análisis de correlaciones)**. En el contexto de esta Tesis Doctoral, el análisis de correlaciones fue empleado para establecer asociaciones entre biomarcadores de exposición a los frutos secos y parámetros clínicos y antropométricos relacionados con el síndrome metabólico.

A través de una correlación se pretende examinar la dirección y la magnitud de la asociación entre dos variables cuantitativas, lo cual permite establecer el comportamiento de una variable cuando se modifica la otra. La dirección se representa a través de los signos (-) y (+), como inversa o directa, respectivamente. Una asociación negativa o inversa significa que cuando una

aumenta, la otra disminuye, mientras que una asociación positiva o directa, significa que las dos variables aumentan de la misma manera. Para determinar la magnitud o grado de asociación entre las dos variables se calcula un *coeficiente de correlación*. Los coeficientes de correlación que se utilizan con mayor frecuencia son: i). Coeficiente de *Pearson* (r , paramétrico) que evalúa la adecuación de los valores a una línea recta que define idealmente la asociación y, ii). Coeficiente de *Spearman* (ρ , no paramétrico) que mide cualquier tipo de asociación, sin el condicionante lineal. En ambos casos, las dos variables no se clasifican como dependiente e independiente, ya que son mutuamente intercambiables.

Los valores que puede tomar una correlación varían entre -1 y +1 y, al ser una medida abstracta, es adimensional y, por tanto, no posee unidades. De acuerdo con los valores de los coeficientes, se considera que:

- r ó $\rho < 0$: existe una correlación negativa.
 - r ó $\rho = 0$: no existe asociación.
 - r ó $\rho > 0$: existe una correlación positiva.
 - $|r$ ó $\rho| < 0.30$: existe una asociación débil.
 - $0.30 \leq |r$ ó $\rho| \leq 0.70$: existe una asociación moderada.
 - $|r$ ó $\rho| > 0.70$: existe una asociación fuerte.
- Una última estrategia fue valorar la capacidad predictiva de un biomarcador de ingesta o un conjunto de biomarcadores de ingesta con respecto al consumo habitual reportado en métodos tradicionales de seguimiento de la ingesta como lo es el FFQ en estudios de cohorte. Métodos de dependencia multivariante como el **modelo de regresión censurado** o **modelo Tobit** es una alternativa eficaz debido a información reportada en el instrumentos de medición de la ingesta como el FFQ. En este modelo de regresión, la variable dependiente es continua y responde básicamente al supuesto que existe una variable latente “no observable”, la cual se origina al analizar datos de variables dependientes censuradas, como el caso del consumo de un alimento, donde se considera censura el valor 0, lo cual implica no consumo. La determinación de datos semi-

cuantitativos propios del uso de tecnologías analíticas avanzadas como es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) en estudios metabolómicos desde una aproximación no dirigida, corresponden a mediciones continuas determinadas en un rango de límites de detección, tanto inferiores como superiores. Estos límites pueden hacer que, a pesar que el metabolito o conjunto de metabolitos objeto de estudio presente (n) una distribución determinada, los valores obtenidos en las muestras no sean representativos. La censura no es una característica intrínseca de la distribución de la variable (en nuestro caso del metabolito) objeto de estudio, sino un defecto de los datos de la muestra, que si no estuvieran censurados constituirían una muestra representativa de la población de interés no censurada.

5. RESULTADOS

5.1 Desarrollo metodológico para el análisis de muestras de plasma

Actualmente no existe un protocolo estandarizado y globalmente aceptado para la exploración del metaboloma plasmático a través de una aproximación metabolómica no dirigida, por lo tanto, un paso previo imprescindible para la exploración de la huella metabólica plasmática fue el desarrollo y la validación de una metodología analítica para la preparación de las muestras de plasma y la posterior adquisición de datos por HPLC-ESI-q-ToF-MS.

Los diferentes escenarios metodológicos probados y validados durante el desarrollo de esta metodología analítica fueron publicados en la revista *Analytical Chemistry* indexada en el *Journal Citation Reports* con un factor de impacto de 5.636 (2014) y situada en el primer decil (D1) y primer cuartil (Q1) de la categoría de CHEMISTRY, ANALYTICAL (4/74).

Sara Tulipani, Ximena Mora-Cubillos, Olga Jáuregui, Rafael Llorach, Eduardo García-Fuentes, Francisco J Tinahones, Cristina Andres-Lacueva. New and Vintage Solutions to Enhance the Plasma Metabolome Coverage by LC-ESI-MS Untargeted Metabolomics. The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation. *Analytical Chemistry*, 2015, 87, 2639–2647. DOI: 10.1021/ac503031d.

El desarrollo de este protocolo analítico incluyó la evaluación y puesta a punto de cinco aspectos metodológicos cruciales dentro de las dos etapas más críticas del proceso analítico: preparativa de las muestras biológicas (fase 1 y 2) y adquisición de datos (fases 3, 4 y 5) a través de la comparación entre diferentes métodos para cada caso (ver **Figura 5.1**).

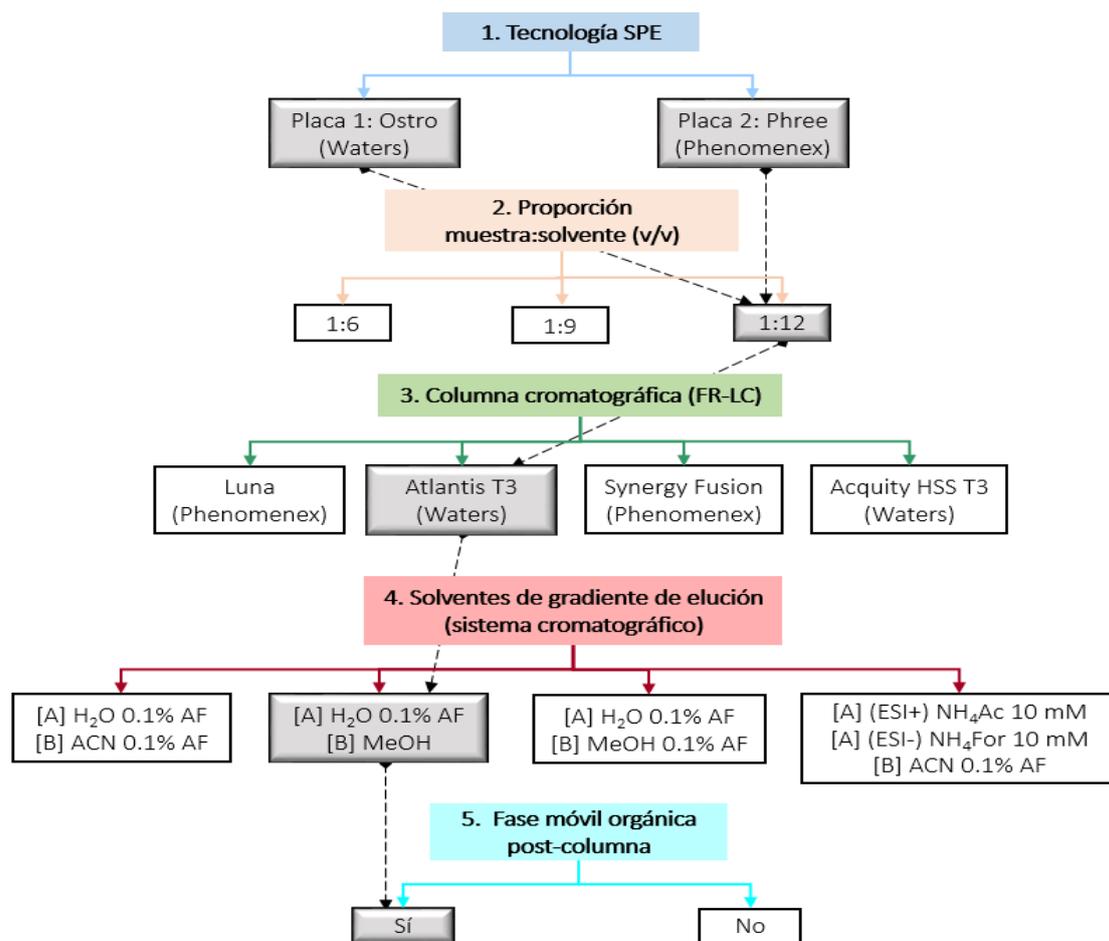


Figura 5.1. Descripción del flujo de trabajo seguido en el desarrollo del protocolo analítico. Los cuadros en color gris representan la opción con mayor rendimiento y las líneas punteadas la secuencia de decisión que dio lugar a la siguiente etapa del protocolo.

Tomado de: Tulipani, et al. 2015.

Durante la preparativa de la muestra biológica, se evaluó el rendimiento óptimo tanto de las placas de extracción por fase sólida por tecnología SPE (fase 1) como la relación óptima de solvente con respecto al volumen de muestra analizada (fase 2). En la adquisición de datos a través del sistema LC-MS, se probaron tres sistemas diferentes para la optimización del método: cuatro columnas de separación cromatográfica fueron comparadas (fase 3), cuatro sistemas de gradientes de elución fueron valorados (fase 4) y la adición de una fase móvil orgánica post-columna (fase 5) para la disminución del efecto matriz, también fue evaluado. En la **Tabla 5.1** se resumen los principales criterios metodológicos evaluados en cada una de estas etapas a través de la comparación entre métodos.

Tabla 5.1. Clasificación de criterios metodológicos evaluados en el desarrollo y la validación del protocolo analítico.

Etapas de optimización	Criterios de comparación	Tipos de muestras y herramientas	Clasificación ^a			
			Placa 1 (Ostro)	Placa 2 (Phree)		
Técnica de extracción de muestra	1. Tecnología SPE					
	Perfil residual de fosfolípidos	Plasma de referencia (0 µg/mL)	+++	+++		
	Efectos residuales de supresión iónica	QC2 y plasma de referencia	++	+++		
	Recuperación de metabolitos estándares	Plasma de referencia (0 y 1 µg/mL)	++	+++		
	Detección de cambios a escala ≤ 5 µg/mL	Plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	+++	++		
	Detección de cambios metabolómicos en plasma real	Plasma humano de estudio de intervención	+++	++		
	2. Proporción muestra:solvente (v/v)		1:6, v/v	1:9, v/v	1:12, v/v	
Extractabilidad de los metabolitos	Plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	+	+	++		
Forma del pico de elución temprana	Plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	++	++	++		
Reproducibilidad de la técnica	Plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	++	++	+++		
Adquisición de datos: sistemas LC y ESI	3. Columna cromatográfica (FR-LC)		Luna C18	HSS T3	Synergy	Atlantis T3
	Capacidad de retención para los compuestos altamente polares	Plasma de referencia (0 µg/mL) y mezcla QC2/POL y plasma de referencia (0 µg/mL)	+	++	++	+++
	Reproducibilidad de la técnica	QC2 y plasma de referencia (0 µg/mL)	+++	+	+++	+++
	4. Solventes de gradiente de elución (sistema cromatográfico)		[A] H₂O 0.1% AF [B] ACN 0.1% AF	[A] H₂O 0.1% AF [B] MeOH	[A] H₂O 0.1% AF [B] MeOH 0.1% AF	[A] (ESI+) NH₄Ac 10 mM [A] (ESI-) NH₄For 10 mM [B] ACN 0.1% AF
	Detección de metabolitos	QC2 y plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	++	+++	++++	+
	Forma del pico, anchura y simetría	QC2 y plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	+++	+++	+++	++
	5. fase móvil orgánica post-columna		Sí	No		
Detección de metabolitos	QC2 y plasma de referencia (0, 1 y 5 µg/mL)	+++	++			
Detección de cambios metabólicos en tiempo real	Plasma humano de estudio de intervención	+++	++			

^a Las puntuaciones están en el rango de + a ++++ de acuerdo con los criterios de evaluación.

5.1.1 Técnica de extracción de muestras de plasma

En un estudio previo realizado en el grupo de investigación, se ha propuesto como método de preparativa de muestras de plasma, el método de extracción híbrido que consiste en la desproteinización por precipitación de un solvente ácido (ACN 1% AF) seguido de la remoción de fosfolípidos mediante una extracción por fase sólida (Tulipani, et al. 2013). Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este estudio se buscó mejorar las condiciones para minimizar el efecto matriz por medio de la selección de una placa de extracción que mejor retención de fosfolípidos reporte y, el establecer las condiciones óptimas de dilución muestra:solvente (v/v) para la precipitación de proteínas. Dos placas (de 96

pocillos) de **extracción por fase sólida** fueron probadas independientemente. La placa 1 corresponde a Ostro de la casa comercial Waters y, la placa 2 a Phree, de la casa comercial Phenomenex. La evaluación del efecto matriz fue realizada en primer lugar comparando el perfil de fosfolípidos residuales en las muestras de plasma luego de ser sometidos a la extracción por ambas placas, y con respecto a técnicas tradicionales de extracción por desproteinización (ACN, MeOH, MeOH: EtOH 1: 1 v/v). Con este propósito, cada extracto de plasma se analizó aplicando un alto potencial de fragmentación en la fuente (+90 V) y se monitoreó la intensidad de señal correspondiente a cationes de fosfato trimetilamonio-etil liberados por residuales (liso)fosfolípidos aún presentes en los extractos XIC del rango m/z: 184.0700 – 184.0750 modo ESI+). En segundo lugar, se utilizaron experimentos de infusión post-columna permanente de metabolitos estándares de la mezcla de QC2. En comparación con enfoques más convencionales (es decir, adición de estándares individuales), la técnica de infusión post-columna es, de hecho, la herramienta más adecuada para la evaluación del efecto matriz en los protocolos de LC-MS no dirigidos, ya que permite evaluar los fenómenos de supresión de la señal que se producen en el cromatograma de forma continua, independientemente de un tiempo de retención específico (Stahnke, et al. 2009). Otros criterios utilizados para evaluar el rendimiento en la extracción de las muestras de plasma, fue la capacidad para detectar la recuperación (*recovery*) de la mezcla de QC2 de metabolitos adicionados a concentración definida a muestras de plasma.

La reproducibilidad de la extracción se comprobó a través de una serie de extracciones repetidas independientes (≥ 3 repeticiones por técnica). En todos los casos, se añadieron la mezcla de estándares acuosos marcados isotópicamente a las muestras antes (IS) y después (ES) de la extracción con una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La reproducibilidad de la extracción fue evaluada a través del coeficiente de variación de las intensidades de los picos entre las repeticiones y, la comparación de la forma de los picos cromatográficos según la proporción de dilución. La eliminación exitosa de los fosfolípidos de las muestras también se confirmó mediante la inclusión del control negativo lisofosfatidilcolina (1-O-estearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) en la mezcla.

La intensidad reportada de fosfolípidos residuales detectados en un intervalo de tiempos de retención comprendido entre 5.8 a 8.5 min fueron significativamente superiores muestras extraídas con métodos convencionales en comparación con los extractos obtenidos por precipitación de proteínas con el uso de placas SPE, esto significa reducción de fenómenos de supresión de la señal en la zona de elución de fosfolípidos, así como disminución del efecto matriz con el uso de placas de SPE en comparación a los métodos tradicionales.

Teniendo en cuenta la recuperación de los estándares (mezcla de QC2 incluidos en plasma de referencia), el uso de la placa 2 (placa Phree) se asoció con una mejor eficiencia de extracción general (ver **Tabla 5.2**). Sin embargo, la intensidad de los analitos detectados mostró una significativa variación en comparación de los resultados obtenidos con la placa Ostro que evidenciaron diferencias no tan marcadas. Para evitar resultados poco concluyentes, se utilizó el análisis univariante para comparar las dos tecnologías SPE de extracción con el fin de detectar variaciones cuantitativas en una escala de $\leq 5 \mu\text{g/mL}$. Como resultado de la prueba de t-Student, se obtuvo que el uso de la placa de Ostro reveló un aumento en la capacidad para detectar diferencias estadísticamente significativas en plasma de referencia con y sin adición de QC2. Lo cual significa que, una aparente reducción en la recuperación de los metabolitos no necesariamente puede estar asociada con una pérdida de información biológicamente relevante.

Tabla 5.2. Comparación de eficacia entre placas de extracción (Ostro y Phree) de muestras de plasma de referencia con metabolitos a diferentes concentraciones (0 y 1 µg/mL).

Metabolito (analito)	% de repuración		0 µg/mL						1 µg/mL						QC2(ac)			
	Plate 1 (Ostro)	Plate 2 (Phree)	Placa 1 (Ostro)		Placa 2 (Phree)		T de Student ^a		Placa 1 (Ostro)		T de Student ^b		Placa 2 (Phree)		T de Student ^b		Sin placa	
			Media	CV	Media	CV	p	FC	Media	CV	p	FC	Media	CV	p	FC	Media	CV
L-citrulina	22.00	95.20	0.30	18.00	0.60	24.00	0.10	0.60	1.20	16.00	0.02	1.90	0.50	27.00	0.07	0.70	48.00	16.00
Acetilcolina	0.20	1.80	0.10	55.00	0.40	9.00	0.00	0.20	0.10	128.00	0.63	1.70	0.30	17.00	0.54	1.10	300.00	6.00
L-carnitina	21.80	86.70	13.30	1.00	22.90	2.00	0.00	0.60	18.80	6.00	0.00	1.40	28.20	16.00	0.11	0.80	439.00	12.00
L-valina	59.20	82.20	37.10	5.00	42.10	9.00	0.10	0.90	42.50	5.00	0.02	1.10	43.50	8.00	0.67	1.00	76.00	7.00
L-(iso)leucina	27.60	135.10	99.20	1.00	106.00	3.00	0.02	0.90	117.70	8.00	0.03	1.20	112.80	10.00	0.36	0.90	233.00	4.00
L-fenilalanina	41.80	101.20	37.80	7.00	39.20	7.00	0.54	1.00	44.20	5.00	0.02	1.20	45.80	11.00	0.11	0.90	154.00	5.00
L-triptófano	37.60	vp	80.70	13.00	83.80	8.00	0.69	1.00	100.20	6.00	0.03	1.20	93.10	8.00	0.19	0.90	283.00	5.00
Ácido α-hidroxiisobutírico	vp	vp	1.30	25.00	1.30	19.00	0.90	1.00	1.30	15.00	0.98	1.00	1.20	3.00	0.57	1.10	35.00	7.00
Ácido 4-hidroxihipúrico	24.20	53.70	0.00	-	0.00	-	1.00	-	1.60	16.00	0.00	-	1.60	24.00	0.00	0.00	36.00	7.00
Ácido gálico	vp	vp	0.00	-	0.00	-	1.00	-	3.40	9.00	0.00	-	1.60	12.00	0.00	0.00	87.00	3.00
Epicatequina	15.40	1.90	0.00	-	0.00	-	1.00	-	0.00	-	1.00	-	0.00	-	1.00	-	68.00	6.00
Ácido siríngico	vp	vp	0.00	-	0.00	-	1.00	-	0.00	-	1.00	-	0.00	-	1.00	-	10.00	5.00
Ácido glucoquenosoxicólico	31.00	101.50	4.90	12.00	3.80	18.00	0.11	1.30	19.30	8.00	0.00	3.90	15.50	6.00	0.00	0.20	153.00	22.00
Naringinina	42.10	119.80	0.00	-	0.00	-	1.00	-	0.00	-	0.44	-	1.70	14.00	0.00	0.00	50.00	13.00
Ácido palmítico	vp	vp	1.30	23.00	4.00	20.00	0.01	0.30	1.20	22.29	0.54	0.90	3.20	36.32	0.40	1.20	1.33	21.00

^a Comparación de las intensidades de los metabolitos a 0 µg/mL entre placas (Ostro vs Phree) a través de la prueba t de Student (p, valor de significancia < 0.05; FC, factor de cambio). ^b Comparación de las intensidades de los metabolitos a diferentes concentraciones (0 y 1 µg/mL) para cada placa a través de la prueba t de Student (p, valor de significancia < 0.05; FC, factor de cambio). El símbolo (-) representa metabolito no detectado y la abreviatura (vp) valores perdidos.

El análisis multivariante de los datos confirmó la presencia de diferencias relevantes entre muestras, según el procedimiento de extracción. En la **Figura 5.2** se muestra un PCA de plasma de referencia a diferentes concentraciones, tras la extracción de la placa Ostro vs Phree y, el efecto de la presencia frente a la ausencia de la modificación de fase móvil orgánica post-columna.

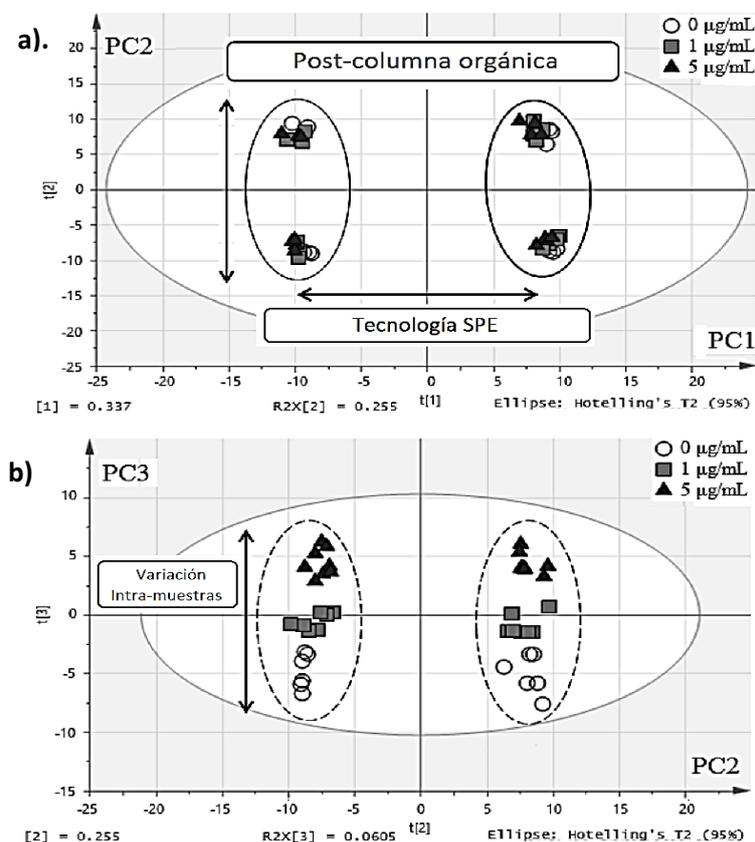


Figura 5.2. PCA de muestras de plasma a diferentes concentraciones en modo ESI+.

- a). Representa la discriminación entre las tecnologías SPE (Ostro vs Phree) (PC1, círculos línea continua) y, el uso o no de una fase móvil orgánica post-columna (se representa por PC2, círculos de línea discontinua). b). Representa la variación entre muestras según diferentes concentraciones (PC3, círculo con líneas punteadas).

Para obtener una comparación definitiva, el estudio nutricional se utilizó para evaluar la magnitud de los cambios metabólicos detectados en plasma humano real, de acuerdo a la tecnología de extracción de muestra utilizada durante la preparación de la muestra (análisis multivariante supervisado). No se observó diferencias significativas en el número de señales de masa identificadas luego de una ingesta de cacao en muestras preparadas a través de las dos placas de extracción y con la presencia de la fase móvil orgánica post-columna (ver **Figura 5.3**).

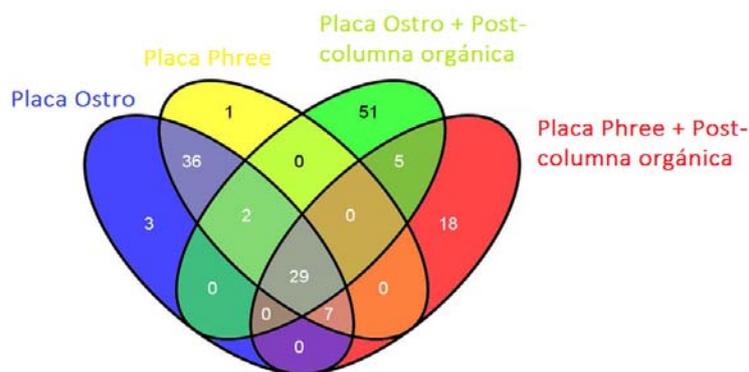


Figura 5.3. Diagrama de Venn donde se observa el número de señales de masa detectadas (nivel de significancia ($p > 0.05$) y valor de correlación significativa ($p(\text{corr}) > 0.5$)) luego de una ingesta con cacao en muestras de plasma humano. Comparación entre placas de extracción (Ostro vs Phree) y uso de fase móvil orgánica post-columna.

Los metabolitos más comunes identificados previamente tras la ingesta aguda de cacao como teobromina, cafeína y decanoilcarnitina (Llorach, et al. 2013; Tulipani, et al. 2013), se detectaron en ambos tipos de extractos de plasma. Sin embargo, parámetros de calidad de los modelos (O)PLS-DA como p-valor, R y Q de intercepto y, $Q^2_{(\text{cum})}$ para muestras extraídas con la placa Ostro mostraron mayor robustez que los modelos (O)PLS-DA de las muestras extraídas con la placa Phree. Por estas razones, se concluye que la placa Ostro presenta mayor rendimiento de extracción al evidenciar cambios sutiles en las variaciones de los metabolitos detectados a través del análisis comparativo en esta primera etapa del flujo de trabajo en metabolómica no dirigido (ver **Tabla 5.1**).

En cuanto a la proporción óptima entre volumen de muestra:solvente (v/v), tres relaciones de dilución diferentes fueron probadas (1:6, 1:9 y 1:12). Las tres relaciones de dilución fueron evaluadas a través de la eficacia de la extracción de metabolitos en el plasma de referencia (con y sin la mezcla de QC2 adicionados) valorando criterios como detección de picos cromatográficos relativos a metabolitos conocidos (QC2) (ver **Tabla 5.3**), intensidad y cambios de intensidad máxima entre las diferentes muestras. La reproducibilidad de la extracción fue evaluada a través del coeficiente de variación de las intensidades de los picos entre las repeticiones y, la comparación de la forma de los picos cromatográficos según la proporción de dilución.

Tabla 5.3. Efecto de la relación del factor de dilución (muestra:solvente) durante la extracción en la detección del pico, la reproducibilidad de la intensidad del pico (CV) y, la capacidad para discriminar de manera significativa entre las muestras con metabolitos a diferentes concentraciones.

Metabolito (analito)	Modo de ionización	Intensidad del pico ^a						p -value		
		1:6 (v/v)		1:9 (v/v)		1:12 (v/v)		Relación intensidad de pico (1:12 vs 1:6, %) ^b	(0 vs 5 µg/mL) ^c	
		Media	CV (%)	Media	CV (%)	Media	CV (%)		1:6 (v/v)	1:12 (v/v)
L-triptófano	ES-	12.80	12.50	9.20	18.00	8.50	17.10	67.00	1.30E-04	4.90E-04
Ácido α-hidroxiisobutírico	ES-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Ácido 4-hidroxihipúrico	ES-	15.60	20.70	10.00	29.50	9.40	16.20	61.00	5.72E-08	2.79E-07
Ácido gálico	ES-	nd	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Epicatequina	ES-	18.60	18.50	12.20	16.00	11.60	19.30	62.00	1.86E-07	1.09E-06
Ácido siríngico	ES-	0.80	30.10	0.20	105.90	0.30	29.10	36.00	7.46E-06	6.41E-03
Ácido sebácico	ES-	65.80	13.50	49.60	16.00	45.10	11.30	69.00	8.86E-09	1.71E-08
Ácido glucoquenodesoxicólico	ES-	124.00	12.50	97.30	15.70	92.20	11.80	74.00	5.83E-09	3.15E-08
Naringinina	ES-	28.80	12.20	23.50	11.90	24.80	8.60	86.00	3.29E-10	1.94E-09
Ácido dodecanedioico	ES-	111.90	9.10	83.90	10.90	77.00	4.20	69.00	9.10E-12	6.91E-12
Ácido palmítico	ES-	3.60	18.70	4.00	15.70	4.40	17.50	122.00	2.37E-01	9.42E-01
Ácido sebácico	ES-	0.70	42.10	1.20	31.40	1.50	25.80	217.00	6.18E-01	6.06E-01
L-carnitina	ES+	6.40	7.30	nt	nt	6.40	5.30	100.00	4.71E-03	4.55E-03
Acetil-L-carnitina	ES+	6.20	8.80	nt	nt	5.70	6.90	91.00	6.79E-05	1.54E-05
L-valina	ES+	13.70	4.00	nt	nt	12.80	13.00	93.00	9.30E-04	1.94E-01
L-(iso)leucina	ES+	16.10	5.90	nt	nt	16.00	9.30	99.00	1.70E-03	3.88E-03

^a Intensidades de señal de metabolito en plasma humano de referencia. ^b Relación de la intensidad del pico de cada metabolito estándar obtenida mediante el uso de la proporción 1:12 vs 1:6 (v/v). Mayor proporción del 57% significa una mayor capacidad de extracción con la proporción orgánica más alta durante la extracción. ^c Comparación de los picos detectados a diferentes concentraciones y factores de dilución a través de la prueba t de Student (p-valor). Las abreviaturas (nd) significa picos no detectados y, (nt) significa prueba no realizada en ESI+.

El uso de la proporción orgánica más alta durante la preparación de la muestra (1:12, v/v) no se asoció con una pérdida significativa de la detección de metabolitos, por el contrario, se asoció con la capacidad de extracción más alta en casi todos los compuestos monitoreados (intensidades de pico) y, sugirió una ligera mejora de la reproducibilidad de extracción con un coeficiente de variación más bajo entre las intensidades de los picos reportados por triplicado. Además, no se observó distorsión en la forma de los picos de elución temprana. Por todas estas razones, el uso del factor más alto de dilución (1:12) durante la extracción de las muestras de plasma se consideró como la opción más adecuada de acuerdo con la capacidad de extracción, la dilución de la muestra y el porcentaje final de extractos orgánicos en las muestras (ver **Tabla 5.1**).

5.1.2 Adquisición de datos: puntos críticos en la selección de columnas cromatográficas y fases móviles

En esta parte del desarrollo del protocolo analítico, diferentes columnas LC, disolventes orgánicos de elución y modificación de la fase móvil orgánica post-columna fueron probados y validados. En consonancia con la opción de mantener un análisis de un sólo paso, cuatro formatos de **columnas de fase reversa** con diferentes composiciones químicas de sílice se compararon. El rendimiento de cada columna se evaluó con ≥ 450 inyecciones de muestra aleatorias, mediante la comparación de la capacidad de retención (media de RT y factor k de metabolitos estándar QC2 que muestran una amplia gama de coeficientes de partición, $\log P$ - 3.19 a +8.23) y, la reproducibilidad técnica del análisis (a través de la estabilidad de la presión y, la reproducibilidad del tiempo de retención por CV).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el uso de la columna de Atlantis T3 proporcionó el mejor rendimiento cromatográfico en términos de retención superior de los metabolitos polares (2 veces más alto el factor k mediante el uso de la columna tradicional basado en C18, para los compuestos con un $\log P < 0$) con efectos insignificantes en el elución de la mayoría de las especies no polares monitoreados, así como en la velocidad de análisis global. La columna también mostró una buena reproducibilidad del tiempo de retención (variación RT < 5 s)

(ver **Tabla 5.4**) y mayor estabilidad de presión durante la separación cromatográfica (variación de presión < 5 % en un máximo de 800 inyecciones). En comparación con el uso de una columna de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) (BEH amida, Waters), la capacidad de retención y el poder de resolución de compuestos polares con isomerismo estructural como glucosa y fructosa-6 fosfato fue baja ($k < 1$), coherente con la naturaleza reversa de la fase estacionaria. Sin embargo, la mejora en la detección del pico obtenido por cromatografía HILIC no fue directamente relacionado con el aumento de la capacidad de retención en todas las especies polares monitorizadas, es decir, mayor sensibilidad para la D-fructosa-1,6-bisfosfato y el ácido cítrico, L-láctico, oxálico, maléico, pirúvico y propiónico mediante el uso de separación por fase reversa como se muestra en la **Tabla 5.4**.

Por otra parte, con el fin de mejorar la ionización ESI, dos estrategias fueron propuestas. Una primera consistió en establecer la relación óptima entre los **componentes de las fases móviles** del sistema cromatográfico y, una segunda, en evaluar el impacto de una **fase móvil orgánica post-columna** (100 μ L/min MeOH en la interfase del sistema LC-MS) con el fin de reducir la proporción acuosa antes de llegar al detector MS y mejorar la eficiencia de la ionización por electropulverización. Cuatro combinaciones de fase móvil se ensayaron tanto en modo negativo como en positivo, las cuales no sólo difieren en la naturaleza de la fase acuosa [A] y la fase orgánica [B], sino también en la calidad del disolvente comparando el rendimiento desde calidad LC-MS hasta disolventes de alta pureza como grado (U)HPLC-MS. La detección de metabolitos (intensidades de los picos), la forma del pico, anchura y simetría y, la extensión de los cambios en el metaboloma plasmático humano real detectados en el estudio de caso metabolómico fueron utilizados para la comparación inter-métodos ESI.

Tabla 5.4. Tiempo de retención y reproducibilidad de metabolitos endógenos y exógenos comúnmente presentes en las muestras de plasma (mezcla QC2).

Metabolitos	RT	Luna C18	HSS T3	Synergi Fusion	Atlantis T3
		(Phenomenex)	(Waters)	(Phenomenex)	(Waters)
L-citrulina	Media	0.30	0.33	0.32	0.38
	CV (%)	1.65	1.78	0.00	1.26
	k^a	0.16	0.12	0.23	0.32
Acetilcolina	Media	0.32	0.37	0.33	0.44
	CV (%)	0.30	1.09	3.13	1.11
	k^a	0.21	0.28	0.26	0.51
L-carnitina	Media	0.29	0.32	0.28	0.35
	CV (%)	0.35	0.94	1.23	1.46
	k^a	0.11	0.10	0.07	0.22
Acetil-L-carnitina	Media	0.33	0.52	0.35	0.56
	CV (%)	0.02	0.03	0.72	0.95
	k^a	0.25	0.78	0.34	0.91
L-valina	Media	0.35	0.43	0.37	0.51
	CV (%)	0.27	2.55	0.67	0.62
	k^a	0.34	0.49	0.42	0.76
L-(iso)leucina	Media	0.73	0.66	0.53	0.86
	CV (%)	1.38	0.76	1.53	3.66
	k^a	1.78	1.27	1.04	1.97
L-fenilalanine	Media	1.38	2.34	1.11	2.47
	CV (%)	0.06	3.13	3.84	0.88
	k^a	4.29	7.06	3.27	7.50
Ácido α -hydroxiisobutírico	Media	0.93	0.76	0.79	1.08
	CV (%)	0.62	0.66	0.70	0.53
	k^a	2.54	1.63	2.01	2.72
Ácido 4-hidroxihipúrico	Media	2.96	3.47	2.80	4.55
	CV (%)	0.84	0.43	0.20	0.11
	k^a	10.35	10.96	9.71	14.68
Ácido gálico	Media	1.20	1.09	1.33	1.86
	CV (%)	1.42	0.88	0.88	0.63
	k^a	3.61	2.77	4.10	5.40
Epicatequina	Media	4.38	4.58	4.44	4.85
	CV (%)	0.11	0.11	0.12	0.09
	k^a	15.77	14.78	15.99	15.72
Ácido siríngico	Media	4.33	4.55	4.40	4.88
	CV (%)	0.12	0.00	0.12	0.12
	k^a	15.58	14.69	15.84	15.83
Ácido glucoquenodesoxicólico	Media	5.51	5.69	5.48	5.77
	CV (%)	0.09	0.14	0.09	0.00
	k^a	20.12	18.62	20.01	18.90
Naringinina	Media	5.20	5.33	5.25	5.50
	CV (%)	0.00	0.09	0.00	0.09
	k^a	18.92	17.37	19.11	17.98
Ácido palmítico	Media	7.60	7.77	7.01	7.72
	CV (%)	0.17	0.22	0.11	0.16
	k^a	28.13	25.78	25.85	25.63

^a Factor de retención (capacidad). El volumen muerto en la columna fue calculado por el tamaño de las columnas.

El rendimiento de la configuración de mayor éxito RP-LC-MS fue finalmente en comparación con el uso de una columna HILIC (columna XBridge BEH amida 100 × 2,1 mm, 4 micras, Waters) en términos de capacidad de retención, reproducibilidad y, sensibilidad de detección MS (mezcla POL). En cuanto a los componentes de las fases móviles, aunque se identificaron efectos sobre la respuesta de la señal dependiente al compuesto, el uso de MeOH no acidificado como fase orgánica [B] evidenció las intensidades de señal de iones moleculares más fuertes, en ambos modos de ionización (ver **Figura 5.4**). En modo ESI-, el uso de MeOH no acidificado incrementó las intensidades de los picos hasta 25 veces en comparación con la fase orgánica de referencia utilizada en protocolos previamente validados (ACN 0.1% AF) (Tulipani, et al. 2011). Además, los efectos de ensanchamiento de los pico con el uso de MeOH (Keunchkarian, et al. 2006) fueron insignificantes en relación con la ganancia en la mejora de la intensidad del pico observado y, no se evidenciaron efectos durante el pre-procesamiento de datos. En conclusión, el uso de MeOH calidad UHPLC-MS como fase orgánica [B] evidenció un aumento de entre 2 y 37 veces en las intensidades de los picos, en comparación con la fase orgánica a base de ACN 0.1% AF en modo ESI- (ver **Figura 5.4**).

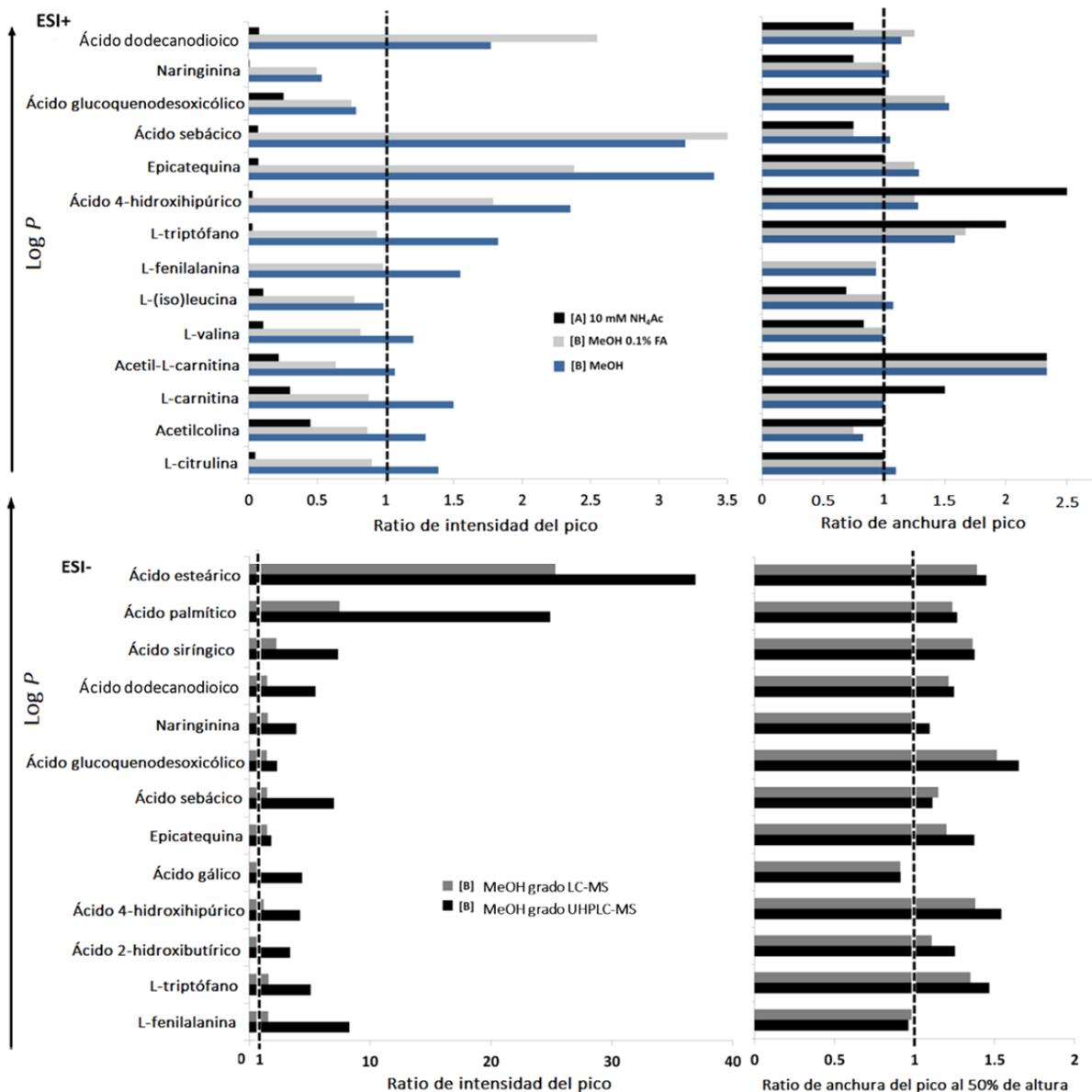


Figura 5.4. Relaciones de intensidades de metabolitos detectados según diferentes sistemas de fase móvil. Son expresadas como la media de al menos tres repeticiones en ESI+ y cuatro en ESI-.

El uso de la fase móvil orgánica post-columna antes de la detección MS fue un determinante fuerte en la variación de las muestras. De hecho, la adición de fase orgánica post-columna se asoció constantemente con un aumento significativo de la intensidad de la señal de masa para todos los metabolitos monitorizados de elución hasta dos tercios de la cromatograma, lo que llevó a una mayor capacidad para detectar hasta cambios a escalas de baja concentración (1 µg/mL) en muestras de plasma de referencia con o sin adición de la mezcla de QC2. Además, no se observó una disminución en la intensidad de la señal de metabolitos de

elución tardía ni la pérdida de detección de pico en el rango de concentración supervisado (1-5 $\mu\text{g/mL}$), lo que sugirió que el efecto de dilución del volumen adicional de fase móvil no afectó drásticamente la detección de metabolitos (efecto de dilución). El ensanchamiento de los picos (supuestamente esperado debido a la introducción volumen muerto) fue de nuevo insignificante y no se asoció con la pérdida de detección de picos. Por el contrario, la modificación de la fase móvil orgánica post-columna de la fase móvil mejoró la detección de cambios biológicos significativos que ocurren en el metaboloma plasmático después de una intervención dietética aguda con cacao (muestras de plasma humano reales).

Para verificar el impacto del uso de esta solución analítica en la mejora de la eficiencia del sistema ESI y en la detección de diferencias metabolómicas sutiles entre las clases de muestras reales, se comparó el número de biomarcadores detectados en el plasma después de una ingesta aguda de cacao, en ausencia o presencia de la modificación de la fase móvil orgánica post-columna. La **Figura 5.5** muestra un SUS-plot en el cual se comparan las señales de masa significativas detectadas por los dos modelos (M1, con la modificación de fase móvil orgánica post-columna y, el M2 sin modificaciones de la fase móvil). A pesar que los biomarcadores más fuertes asociados a la ingesta de cacao (teobromina y cafeína) fueron detectados independientemente del uso de la fase móvil orgánica post-columna (Llorach, et al. 2013; Tulipani, et al. 2013), otros biomarcadores como el ácido glicoquenosoxico y el aminoácido L-(iso)leucina se detectaron únicamente con el uso de la fase móvil orgánica post-columna. La mayoría de las señales de masa discriminantes asociadas a la ingesta de cacao con uso de la fase móvil orgánica post-columna no fueron identificadas previamente, lo que dificulta evaluar plenamente el alcance de la mejora del funcionamiento del método.

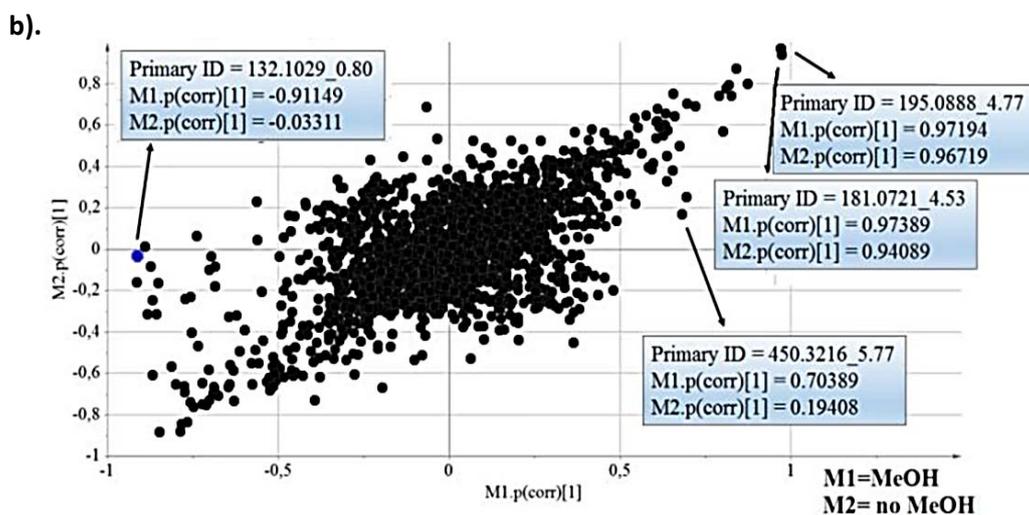
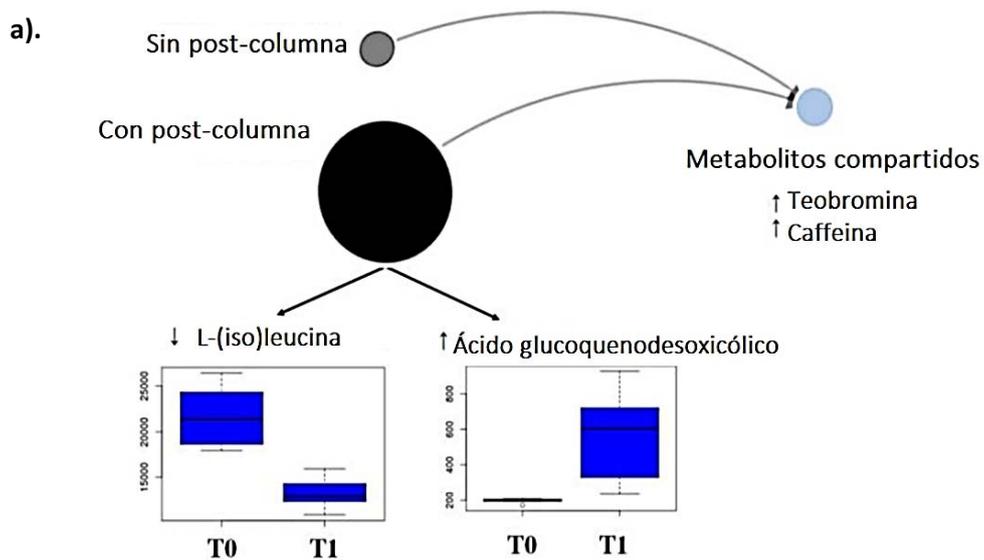


Figura 5.5. Metabolitos identificados con la modificación de la post-columna orgánica. a). Diagrama relacional (MetaXCMS) y de cajas (XCMS) de los metabolitos detectados en plasma después de una intervención dietética aguda de cacao mediante el uso o no la modificación orgánica de post columna de la fase. b). Comparación de modelos en los dos modelos (M1 y M2) a través de un SUS-plot (SIMCA).

New and Vintage Solutions To Enhance the Plasma Metabolome Coverage by LC-ESI-MS Untargeted Metabolomics: The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation

Sara Tulipani,^{†,‡} Ximena Mora-Cubillos,[†] Olga Jáuregui,[§] Rafael Llorach,[†] Eduardo García-Fuentes,^{||,⊥} Francisco J Tinahones,^{‡,⊥} and Cristina Andres-Lacueva^{*,†}

[†]Biomarkers & Nutrimetabolomic Lab, Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA, Campus Torribera, Pharmacy Faculty, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

[‡]Biomedical Research Institute (IBIMA), Service of Endocrinology and Nutrition, Malaga Hospital Complex (Virgen de la Victoria), Campus de Teatinos s/n, University of Malaga, 29071 Malaga, Spain

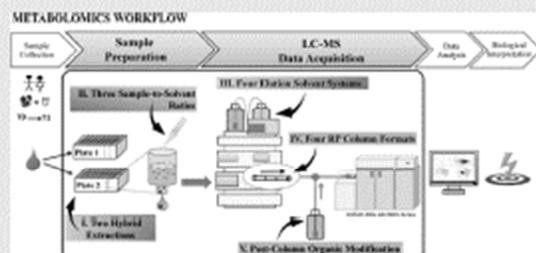
[§]Scientific and Technological Centres of the University of Barcelona (CCIT-UB), 08028 Barcelona, Spain

^{||}Biomedical Research Institute (IBIMA), Service of Endocrinology and Nutrition, Hospital Regional Universitario, Plaza del Hospital Civil s/n, University of Malaga, 29071 Malaga, Spain

[⊥]CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), 28029 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Although LC-MS untargeted metabolomics continues to expand into exciting research domains, methodological issues have not been solved yet by the definition of unbiased, standardized and globally accepted analytical protocols. In the present study, the response of the plasma metabolome coverage to specific methodological choices of the sample preparation (two SPE technologies, three sample-to-solvent dilution ratios) and the LC-ESI-MS data acquisition steps of the metabolomics workflow (four RP columns, four elution solvent combinations, two solvent quality grades, postcolumn modification of the mobile phase) was investigated in a pragmatic and decision tree-like performance evaluation strategy. Quality control samples, reference plasma and human plasma from a real nutrimetabolomic study were used for intermethod comparisons. Uni- and multivariate data analysis approaches were independently applied. The highest method performance was obtained by combining the plasma hybrid extraction with the highest solvent proportion during sample preparation, the use of a RP column compatible with 100% aqueous polar phase (Atlantis T3), and the ESI enhancement by using UHPLC-MS purity grade methanol as both organic phase and postcolumn modifier. Results led to the following considerations: submit plasma samples to hybrid extraction for removal of interfering components to minimize the major sample-dependent matrix effects; avoid solvent evaporation following sample extraction if loss in detection and peak shape distortion of early eluting metabolites are not noticed; opt for a RP column for superior retention of highly polar species when analysis fractionation is not feasible; use ultrahigh quality grade solvents and "vintage" analytical tricks such as postcolumn organic enrichment of the mobile phase to enhance ESI efficiency. The final proposed protocol offers an example of how novel and old-fashioned analytical solutions may fruitfully cohabit in untargeted metabolomics protocols.



Untargeted metabolomics continues to expand to exciting life science application domains^{1–3} fuelled by progress in high-resolution liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS), bioinformatics tools for data processing, and by recent huge investments (<http://commonfund.nih.gov/Metabolomics/fundedresearch>). However, methodological maturity has not yet been reached, thus hindering field's progress and application to epidemiology.⁴ The growing number of metabolomic studies and initiatives aimed to solve methodological concerns (Figure S-1, Supporting Information)^{5–13} and set objective criteria for method optimization^{14,15} have not yet converged into the definition of unbiased, standardized and globally accepted

analytical protocols. Certainly, the ambitious challenge of a comprehensive read-out of the metabolome complicates method performance evaluation, since the clear-cut criteria established for the validation of targeted LC-MS/MS protocols¹⁶ are hardly applicable to this different approach (nonquantitative, and nonspecific for a selected cluster of metabolites).

Received: August 14, 2014

Accepted: February 2, 2015

Published: February 2, 2015

Like any targeted liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) bioanalysis, untargeted liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) metabolomics suffers from matrix effects responsible for ion suppression phenomena, which in turn hamper metabolome coverage, mass accuracy and analytical reproducibility.^{17,18} Particularly, in the case of complex biomatrices (i.e., blood fluids), inadequate sample preparation and LC-MS data acquisition procedures are known major sources of ion suppression,^{8,10–12} but discussion on how to overcome specific methodological hindrances related to these two steps of the workflow still appears fairly limbo. Regarding sample preparation, for instance, the vast majority of the attempts to optimize the sample extraction procedures still focus on a partial removal of blood-interfering components (namely proteins),^{19,20} instead of searching for the most satisfactory compromise between the exhaustive removal of all the species responsible for matrix effects and nonselective metabolite extraction (metabolome coverage).^{19–21} In addition, an ideal sample preparation method should be as simple as possible, with the minimal number of steps required. In contrast, laborious and potentially “risky” steps such as sample evaporation and reconstitution prior to LC-MS analysis are often incorporated into the procedure, but evidence of the real benefits obtained has not yet been established in untargeted studies.²²

Regarding the LC-MS data acquisition phase, the main challenge lies in the detection of thousands of known and unknown components in a wide range of chemistries, molecular masses, dynamic concentration range and MS responses, possibly in a single analysis. Reverse phase (RP)-LC is considered the most suitable analytical tool for ESI-MS high-throughput analysis of heterogeneous samples,²³ but the nonretention of highly polar metabolites generally poses a chromatographic challenge (coelution of many chemical species at the solvent front, competition in the use of the energy available for ionization at the source of the MS, thus mutual ion suppression phenomena). The choice to resort to dual analysis (i.e., RP/HILIC) has been much widespread so far,¹¹ with no apparent consideration of its environmental impact (generation of hazardous chemical waste) and reduced applicability to large-scale studies (sample, time, labor and solvent consumption). Nevertheless, new RP column formats designed to promote superior retention of highly polar ionic species are currently available, and may lead to a satisfactory separation of a wide metabolite chemical diversity without the need for ion pairing agents or analysis fractionation. Furthermore, the combination of new chromatographic solutions with the careful selection of mobile phases and the use of “vintage” analytical tricks traditionally used to enhance ESI efficiency in RP-LC (i.e., the postcolumn organic modification of mobile phases) has not been explored so far in untargeted metabolomics.^{8,17,24–27}

In the present study, the response of the plasma metabolome coverage to specific methodological choices of the sample preparation (two SPE technologies, three sample-to-solvent dilution ratios) and the LC-ESI-MS data acquisition steps of the metabolomics workflow (four RP columns, four elution solvent combinations, two solvent quality grades, postcolumn modification of the mobile phase) was investigated in a pragmatic and decision tree-like performance evaluation strategy. Quality control samples, reference plasma and human plasma from a real nutrimental study were used for intermethod comparisons, injected in a batch-designed randomized sequence order. To overcome the not-so-simple process of method

performance evaluation in untargeted metabolomics, uni- and multivariate data analysis approaches were independently applied.

EXPERIMENTAL SECTION

Figure 1 shows the different methodological scenarios tested in a simplified decision tree-like flowchart. The main criteria and tools used for method performance evaluation are listed in Table 1.

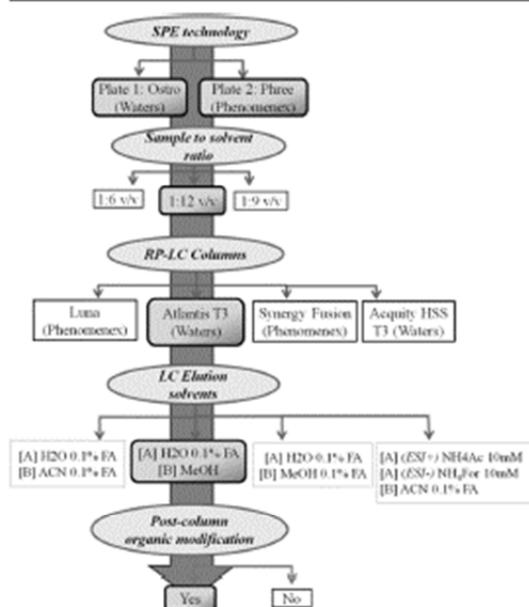


Figure 1. Decision tree-like flowchart showing the methodological scenarios tested in the study.

Samples. Three sample types were used for comparison among the different methodological set-ups: aqueous standard metabolite mixes, reference plasma, and individual human plasma samples collected during a dietary intervention study. An aqueous standard mix (QC2) composed by metabolites representative of the plasma metabolome chemical variety was prepared, including six amino acids, two carnitines, three organic acids, two acyl glycine conjugates, an ester of acetic acid and choline, two fatty acids and two flavonoid compounds (details in Table S-1, Supporting Information). A second standard mix of twenty-one highly polar metabolites ($\text{LogP} \ll 0$, POL mix) was also prepared for comparison between RP and HILIC chromatographic performance (details in Table S-1, Supporting Information). Aqueous solutions of isotopically labeled compounds were also prepared for use as internal (IS) and external standard (ES) mix during sample extraction (details in the Supporting Information).

Commercial reference plasma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was used in a first-pass method performance evaluation, to avoid biological variability among compared samples. Plasma was alternatively spiked with milli-Q water (unspiked) and with the QC2 mix (1 and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final standard concentrations), to evaluate the capacity of the tested methodological set-ups to detect known expected quantitative differences among spiked

Table 1. Ranking of the Analytical Options According to the Proposed Evaluation Criteria

sample extraction performance evaluation	criteria for method comparison	sample type, tools	ranking					
			Ostro plate	Phree plate				
sample extraction performance evaluation	SPE technology	residual total phospholipid profile (XIC at m/z 184.07, ESI+)	reference plasma (raw)	+++	+++			
		residual ion suppression effects (postcolumn infusion experiments ^a)	QC2 mix, reference plasma	++	+++			
		standard metabolite recovery (peak intensity ratios, % ^b)	reference plasma (raw, spiked)	++	+++			
		detection of ≤ 5 $\mu\text{g/mL}$ -scale changes ^{b,c,d}	reference plasma (raw, spiked)	+++	++			
		detection of real-life metabolomic changes ^{c,f}	plasma from human intervention study	+++	++			
		sample-to-solvent dilution ratio			1:6, v/v	1:9, v/v	1:12, v/v	
		metabolite extractability ^{b,c,d}	reference plasma (raw, spiked)		+	+	++	
		early eluting peak shape ^b	reference plasma (raw, spiked)		++	++	++	
		technical reproducibility (peak signal intensity CV) ^c	reference plasma (raw, spiked)		++	++	+++	
		LC and ESI performance evaluation	RP-LC columns		Luna C18	HSS T3	Synergy	Atlantis T3
retention capacity of highly polar metabolites (k' factor ^b)	QC2/POL mix, reference plasma (unspiked)			+	++	++	+++	
technical reproducibility (pressure stability, RT reproducibility ^b)	QC2 mix, reference plasma (unspiked)			+++	+	+++	+++	
LC elution solvents ^f				System 1	System 2	System 3	System 4	
metabolite detection ^c	QC2 mix, reference plasma (raw, spiked)			++	+++	++++	+	
peak shape, width and symmetry ^b	QC2 mix, reference plasma (raw, spiked)			+++	+++	+++	++	
postcolumn organic modification					yes	no		
metabolite detection ^c	QC2 mix, reference plasma (raw, spiked)			+++		++		
detection of real-life metabolomic changes ^{c,f}	plasma from human intervention study	+++		++				

^aScores are in the range of + to ++++ against the evaluation criteria. ^bPeak signal intensities, Analyst 2.0 software, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. ^cUVA: t test pairwise comparisons between sample classes (MarkerView TM 1.2.1. software). ^dMVA: PCA, PCA-DA (SIMCA-P+ 13.0 software, Umetrics). ^eMVA: PCA, PCA-DA, (O)PLS-DA (SIMCA-P+ 13.0 software, Umetrics). ^fXCMS online. ^gMobile phase combination 1 (ESI \pm): [A] H₂O 0.1% FA, [B] ACN 0.1% FA. Mobile phase combination 2 (ESI \pm): [A] H₂O 0.1% FA, [B] MeOH 0.1% FA. Mobile phase combination 3 (ESI \pm): [A] H₂O 0.1% FA, [B] MeOH. Mobile phase combination 4 (ESI+): [A] 10 mM NH₄Ac, [B] ACN 0.1% FA. (ESI-): [A] 10 mM NH₄ [B] ACN 0.1% FA.

and unspiked reference samples. Human plasma samples from a previously described nutritional intervention study^{12,28} were finally used to assess the influence of specific methodological choices in a real metabolomic study (plasma collected before and 2-h after an acute intake of a cocoa-based drink). The choice of the case study was not casual, but pushed by criteria of logic functionality, to easily orient the evaluation of the different methodological options according to the detection of expected biomarkers of cocoa intake.

Sample Extraction Performance Evaluation. 96-well Plate SPE Technologies. Plasma (50 μL) was subjected to an in-plate hybrid extraction method consisting of deproteinization by acidic solvent precipitation (ACN 1% FA) followed by phospholipid SPE-mediated removal¹². Two 96-well plates were independently used for sample SPE (plate 1: Ostro, Waters; plate 2: Phree, Phenomenex) according to the respective manufacturer's suggestions.

Sample cleanup from matrix effects was first evaluated by comparing the residual total phospholipid profile of plasma samples extracted through the two 96-well plates, compared to samples subjected to traditional deproteinization techniques

alone (organic extraction with ACN, MeOH, MeOH:EtOH 1:1 v/v).¹² This was carried out by monitoring the XIC at m/z 184.070–184.075 (ESI+ mode), corresponding to the yield of trimethylammonium-ethyl phosphate cations released from the residual (lyso)phospholipids still present in the extracts, when applying high-energy declustering potential for in-source fragmentation (+90 V).

Experiments of permanent postcolumn infusion of QC2 standard metabolites were then used. Compared to more conventional approaches (i.e., individual standards addition), the postcolumn infusion technique is in fact a more suitable tool for the evaluation of matrix effects in untargeted LC-MS protocols, because it gives information on signal suppression/enhancement phenomena occurring throughout the whole chromatogram, independently of a specific retention time^{29,30} (details in the Supporting Information).

The recovery of QC2 standard metabolites spiked in plasma, the capacity to detect subtle quantitative differences in reference plasma (raw versus spiked) and metabolomic changes in human plasma following an acute cocoa intake were also used to compare the sample extraction performance of the two plates.

To check for extraction reproducibility, repeated independent extractions (≥ 3 technical replicates) of each biological sample were carried out. In all cases, aqueous isotopically labeled standard mix were added to the sample matrices before (IS) and after (ES) the extraction (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final standard concentration), to check for extraction reproducibility and analytical stability during LC-MS data acquisition. The successful removal of phospholipids from the samples was also confirmed by including a lysophosphatidylcholine molecule (1-O-stearoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine) in the IS mix (negative control).

Sample-to-Solvent Dilution Ratio (v/v). Three sample-to-solvent dilution ratios (1:6, 1:9 and 1:12 v/v) were then evaluated during the extraction process, according to the plate manufacturer suggestions. For this experiment, reference plasma samples (raw, spiked) were used, and the three dilution ratios were evaluated in terms of the extraction efficiency of the standard metabolites spiked in plasma (peak detection, peak intensities, peak intensity changes among sample classes, $p < 0.05$), the extraction reproducibility (CV of peak intensities among technical replicates) and the shape of the early eluting peaks according to the organic percentage of the extracts.

Chromatographic and Electrospray Ionization Performance Evaluation. LC Columns, Elution Solvents and Postcolumn Organic Modification. In line with the choice of maintaining a single-step analysis, four RP column formats with different silica chemistries were first compared (details in "Columns", Supporting Information), ranging from a traditional HPLC C18-based stationary phase to three (U)HPLC columns designed for superior retention of highly polar ionic species. Column performance was evaluated upon a no. ≥ 450 randomized sample injections, by comparing the retention capacity (mean RT and k factor of QC2 standard metabolites showing a wide range of partition coefficients, $\log P -3.19 - +8.23$) and the technical reproducibility of the analysis (column back pressure, across-run pressure stability, RT reproducibility by retention time CV).

For ESI enhancement purposes, four mobile phase combinations were then tested (ESI+ and ESI-), differing in the nature of the aqueous [A] and organic [B] phases and in the solvent quality (LC-MS versus ultrahigh performance (UHP)LC-MS purity grade) (details in "Mobile Phases", Supporting Information). Second, the impact of a postcolumn organic enrichment of the mobile phase was also tested by adding a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ MeOH flow at the LC-MS interface, so as to reduce the aqueous proportion reaching the MS detector and enhance ESI efficiency (15% increase of organic final concentration). Metabolite detection (peak signal intensities), peak shape, width and symmetry, and the extent of real-life plasma metabolome changes detected in the metabolomics case study were used for intermethod comparison of ESI performance. The performance of the most successful RP-LC-MS setup was finally compared to the use of a HILIC column (XBridge BEH Amide column 100 \times 2.1 mm, 4 μm , Waters) in terms of retention capacity and reproducibility, and MS detection sensitivity (POL mix).

The not-mentioned operating conditions for LC-ESI-qToF-MS data acquisition were set as previously described¹² (Supporting Information). To avoid possible bias in intermethod comparison, all extracts resulting from different sample preparation were analyzed in a unique batch-designed and randomized run sequence order, except when not feasible (i.e., comparison among different RP columns, analysis with or without the postcolumn organic modifier). Samples were subdivided into homogeneous sub-batches (~ 10 injections

each) separated by the regular analysis of QC samples ($\sim 30\%$ of the total runs). For system suitability check, the following quality control (QC) samples were analyzed throughout the data acquisition: QC1, Milli-Q water samples; QC2 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final standard concentration); QC3, randomly selected biosamples repeatedly injected along the sequence of analysis. Blank extractions (solvent only) were also injected at the beginning of the sequence, to verify any eventual solvent-dependent mass features not to be considered during comparative analysis. Prior to analysis, a minimum of two QC2 and ten biological samples were injected, respectively to check for system suitability and for system conditioning with the sample matrix.

Analyst QS 2.0 software was used for data acquisition and system control (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Chemometric Data Analysis. Before statistical analysis, data preprocessing was carried out using MarkerView 1.2.1. software (AB Sciex, Toronto, Ontario, Canada). Data were \log_{10} transformed and Pareto-scaled to approach a normal distribution, and data quality assured as previously described.¹² Data reproducibility was a common requirement for all the conditions tested.³¹ The analytical variability across the runs was then evaluated by monitoring the standard metabolite components of QC2 samples injected over time. Since several of the tested parameters may modify LC and MS response of the QC2 metabolites (i.e., RT shifts and variation in mass signal intensities depending on the different columns, mobile phases and organic modifier), the entire analysis sequence was divided into smaller unmatchable sequences of experiments, and data quality assurance was carried out in intraexperiment separate evaluations (details in "System suitability check", Supporting Information).

Subsequently, UVA (t test for pairwise sample comparisons, $p < 0.05$) and MVA (PCA, PCA-DA, OPLS-DA) were applied to the different data sets for comparative analysis, as previously described,^{12,32} by using both commercial (MarkerView TM 1.2.1., AB Sciex, Toronto, Ontario, Canada; SIMCA P+ v13, Umetrics, Umeå, Sweden) and online tools (XCMS).³³ PCA score plots, S- and SUS-plots, box plots and relational diagrams were helpful for data comparison and visualization.³⁴ Finally, the in-house R-based MATT package³⁵ was used for the computationally assisted identification of significant metabolites up- or down-regulated in the nutrimental case study.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows an overview ranking of the methodological options tested, according to the proposed evaluation criteria.

Sample Extraction Performance Evaluation. 96-well Plate SPE Technologies. The first three criteria used to compare the performance of the two SPE plates were not able to show a clear-cut difference between the sample extraction technologies. In fact, a similar sample cleanup was observed, with negligible levels of residual phospholipids compared to extracts obtained by sample protein precipitation alone (Figure S-2, Supporting Information), resulting in low signal suppression phenomena at the phospholipid elution zone (5.8–8.5 min of the chromatographic run). Similar infusion profiles were also observed, with minimal matrix effects (Figure S-3, Supporting Information). Two suppression zones in the chromatogram (i.e., negative fluctuations in the matrix profiles at $\sim 0-0.5$ and 6–7 min) were more accentuated in extracts obtained by the Ostro plate, possibly due to less efficient removal of salts (front solvent) and late-eluting components from the matrix, respectively. However, none of the mass features that were differentiating the extracts in those specific areas corresponded to metabolites of the infused

QC2 mix, and were considered as artifactual features (signals from chemical impurities, background noise).

Considering the standards recovery (QC2 metabolites spiked in reference plasma), the use of the Phree plate appeared to be associated with an overall enhanced extraction efficiency (percentage recovery in Table S-2, Supporting Information). However, recoveries varied more depending on the analyte monitored than on the SPE technology used, so not to lead to conclusive results (Figure S-4, Supporting Information). Univariate analysis was then used to compare the two extraction technologies upon the capacity to detect subtle quantitative variation in the plasma metabolome ($\leq 5 \mu\text{g/mL}$ -scale changes). In this case, the use of the Ostro plate revealed an increased capacity to detect statistically significant differences between raw versus spiked reference plasma (*t* test results in Table S-2, Supporting Information), suggesting that an apparent reduced metabolite recovery may not necessarily be associated with a loss of biologically relevant information. Multivariate analysis of the data confirmed the presence of relevant differences among sample extracts, according to the extraction procedure. Figure 2

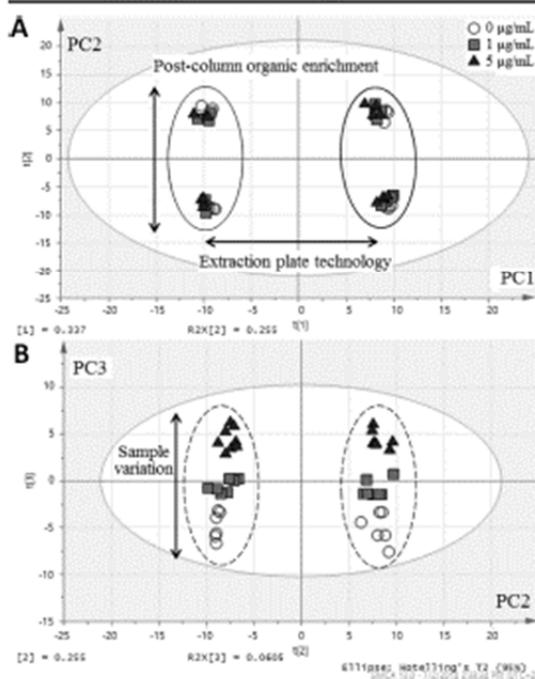


Figure 2. PCA scores plots of plasma samples subjected to extraction by plate 1 versus 2 (discriminated by PC1, solid line circles) and analyzed with or without postcolumn organic modification (discriminated by PC2, dashed line circles); ESI+ mode. Sample classes (plasma unspiked (0) and spiked with QC2 mix at 1 and 5 $\mu\text{g/mL}$ final concentration) were only discriminated by PC3.

shows a PCA scores plot of raw versus spiked reference plasma, extracted by the SPE plate 1 versus 2, and analyzed in presence versus absence of the postcolumn mobile phase modification (ESI+ mode). Because the first two PCs of the PCA scores space give the direction of the maximum spread of the data, the exploratory analysis clearly showed how the extraction plate and the postcolumn organic modification of the mobile phase were

much stronger determinants of sample variation than the differences among sample classes (similar results in ESI+ mode, Figure S-5, Supporting Information).

To obtain a definitive comparison, the nutritional case study was used to assess the extent of metabolomic changes detected in real plasma, according to the sample extraction technology used during sample preparation (supervised multivariate analysis). No difference was observed in the number of significant mass features of cocoa intake between the two extraction plates, with a high extent of data overlapping (Figure S-6, Supporting Information). The most common metabolites expected to be up- and down-regulated following the acute intake of cocoa (i.e., theobromine, caffeine, decanoylcarnitine) were detected in both types of plasma extracts, and confirmed our previous observations.^{12,27} However, more robust (O)PLS-DA models were obtained by submitting samples to extraction with the Ostro plate (*p*-value, *R* and *Q* intercepts in Table S-3, Supporting Information). For these reasons, and because the final goal of the application of any metabolomic method is to highlight even subtle metabolite up- and down-regulation in comparative analysis, the Ostro plate finally gave the greatest extraction performance (Table 1).

Sample-to-Solvent Dilution Ratio (v/v). Table S-4 (Supporting Information) shows the comparative analysis between the different sample-to-solvent dilution ratios tested during extraction. The three ratios were first compared according to the capacity to extract known expected mass features from spiked plasma samples (peak detection, peak intensities and CV depending on the organic proportion during extraction) and the capacity to highlight subtle differences between raw and spiked samples (*t* test pairwise comparisons, *p*-value). The use of the highest organic proportion during sample preparation (1:12 sample-to-solvent ratio, v/v) was not associated with a significant loss of metabolite detection, possibly expected due to the greater final sample dilution. The highest solvent proportion was associated with a higher extractability of almost all the monitored compounds (ratio of peak intensities, Table S-4, Supporting Information), and appeared to slightly improve extraction reproducibility across samples (lower peak intensity CV, Table S-4, Supporting Information). Finally, no peak shape distortion of the early eluting metabolites was noticed to hamper mass feature detection (Figure S-7, Supporting Information), although no solvent replacement was carried out by evaporation prior to LC-MS analysis.

For all these reasons, the use of the highest sample dilution factor was considered the best compromise between extractive capacity, sample dilution and final organic percentage in the extracts (Table 1).

Chromatographic and Electrospray Ionization Performance Evaluation. RP Columns. The use of the Atlantis T3 column provided the best chromatographic performance in terms of superior retention of polar metabolites (2-fold higher *k* factors than by using the traditional C18-based column, for compounds with $\log P < 0$) with negligible effects on the elution of the most nonpolar species monitored and so on the global analysis speed. The column also showed good retention time reproducibility (RT variation < 5 s) (Table S-5, Supporting Information), lower column back pressure and higher across-run pressure stability (pressure variation $< 5\%$ across up to 800 injections) (Table S-6, Supporting Information). In comparison to the use of a hydrophilic interaction chromatography (HILIC) column (BEH Amide, Waters), the retention capacity and resolution power of polar compounds with structural isomerism

(i.e., glucose and fructose-6-phosphate) was low ($k < 1$), consistent with the RP nature of the stationary phase. However, peak detection enhancement obtained by HILIC chromatography was neither directly related to the increased retention capacity nor common to all the polar species monitored (i.e., higher sensitivity for D-fructose 1,6-bisphosphate, citric, L-lactic, oxalic, maleic, pyruvic and propionic acids by using RP separation, as shown in Table S-5, Supporting Information). Consequently, these findings did not support a clear-cut improvement by the use of fractionation analysis (RP/HILIC), and confirmed that many factors other than column chemistry can be modulated in order to enhance sensitivity in MS.

Elution Solvents. Although the effect on signal response was found to be compound dependent, the use of nonacidified MeOH as organic phase [B] gave the strongest molecular ion signal intensities, in both ionization modes (Figure S-8, Supporting Information). Particularly, in ESI⁻ mode, the use of MeOH increased peak intensities up to 25-fold compared to the reference organic phase used in previously validated protocols (ACN 0.1% FA).³² Moreover, peak broadening effects putatively expected with the use of MeOH³⁶ were negligible in respect of the gain in peak intensity enhancement observed (Figure S-8, Supporting Information), and were neither shared by all the monitored metabolites nor detrimental for peak detection during data preprocessing.

Finally, the use of UHPLC-MS quality grade MeOH gave between a 2- and 37-fold increase in peak intensities, compared to the ACN-based organic phase (Figure S-8, Supporting Information, ESI⁻ mode).

Postcolumn Mobile Phase Modification. The organic enrichment of the mobile phase prior to the MS detection was a strong determinant of sample variation (Figure 2). In fact, it consistently associated with a significant enhancement of mass signal intensities for all the monitored metabolites eluting up to two-thirds of the chromatogram (Figure 3), leading to an increased capacity to detect up to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -scale changes between raw and spiked reference plasma samples. A decrease in

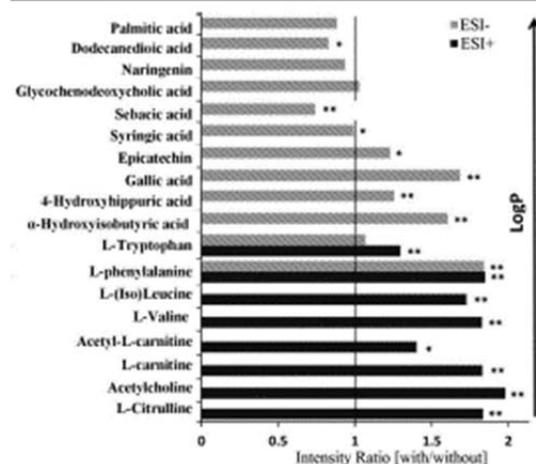


Figure 3. Ratios of mass signal intensities obtained with vs without the use of postcolumn modification of the mobile phase (*, significant differences, $p < 0.05$; **, highly significant differences, $p < 0.01$). Intensities were expressed as mean of five technical replicates. CV ranged from 1 to 21%.

mass signal intensities was not common among the late-eluting metabolites, and loss of peak detection did not occur at the concentration range monitored (1–5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), suggesting that the diluting effect of the extra volume of mobile phase infused did not dramatically affect metabolite detection (dilution effect). Furthermore, peak broadening (putatively expected due to dead volume introduction) was again negligible and not associated with the loss of peak detection. Finally, the postcolumn organic modification of the mobile phase also enhanced the detection of significant biological changes occurring in the plasma metabolome after an acute dietary intervention.

To verify the impact of using this analytical solution in the enhancement of ESI efficiency and the detection of subtle metabolomic differences among real sample classes, the number of biomarkers detected in plasma following an acute intake of cocoa, in the absence or presence of the postcolumn modification of the mobile phase, was compared. Figure 4 shows a SUS-plot

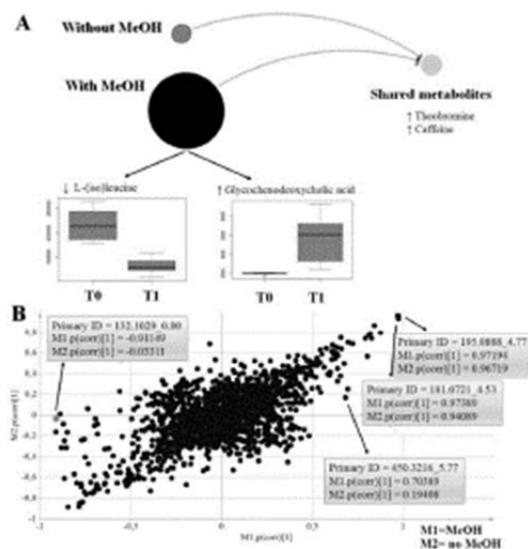


Figure 4. (A) Relational diagram matching the extent of metabolomic changes detected in plasma after an acute dietary intervention by using or not the postcolumn organic modification of the mobile phase (metaXCMS). Uniquely identified metabolites significantly down- (left) and up-regulated (right) following the intervention are shown (boxplots, XCMS). (B) SUS-plot comparing the two models (SIMCA). Mass features far from the diagonal were uniquely detected by the mobile phase modification (model 1).

comparing the significant mass features detected by the two models (model 1, with mobile phase modification; model 2, without mobile phase modification). As shown in the figure, although the strongest biomarkers of cocoa intake were detected independently on the use of postcolumn addition (mass features found on the plot diagonal represent shared biomarkers, i.e., theobromine and caffeine), other previously described metabolites were uniquely detected through the organic modification of the mobile phase (mass features far from the diagonal, i.e. up-regulation of glycochenodeoxycholic acid, down-regulation of L-(iso)leucine).^{22,37} Nevertheless, the majority of the cocoa-associated discriminant mass features observed following

postcolumn organic modification kept unidentified, hampering to fully evaluate the extent of method performance enhancement.

CONCLUSION

Although being excellent samples for assessing pathophysiological deviations in both endogenous and exogenous metabolism, blood fluids are as informative as challenging samples.³⁸ Inadequate preparation and LC-MS analysis of these complex biomatrices are major sources of ion suppression phenomena, which in turn adversely affect the most crucial prerequisite for untargeted metabolomics, such as metabolome coverage, mass accuracy, and data reproducibility. However, there is still no consensus on how to overcome specific analytical hindrances and make large-scale untargeted studies feasible. Even the method performance evaluation process is not fully standardized, due to the difficulty in defining validation criteria to cover the specific problems associated with untargeted analysis of (mostly unknown) compounds. Although the concept of method optimization is not viable in untargeted metabolomics, the joint finishing of sample extraction procedure, chromatographic separation and electrospray ionization still forms the necessary basis to develop a successful and robust LC-ESI-qToF-MS (qToF, quadrupole time-of-flight) methodology, and reach a balanced compromise between metabolome coverage and feasibility.

In the present work, we investigated the response of the plasma metabolome coverage to specific methodological choices related to sample preparation, chromatographic separation and ESI process enhancement procedures in RP-LC-MS data acquisition.

The best sample extraction performance was obtained when combining sample hybrid extraction with high organic proportion. During sample preparation, both a partial removal of undesired interference or a too drastic nonselective cleanup of the samples would lead to poor metabolome coverage and compromise the detection of subtle metabolite variation in comparative analysis.^{8,19–21} In a previous work, we observed that the selective removal of phospholipid-based matrix effects is a more successful alternative for plasma sample preparation than deproteinization alone¹² (the “less is more” concept). In the present work, two in-plate hybrid extraction technologies were compared, and conventional criteria for extraction efficiency evaluation were not definitive in making lean toward one or the other plasma preparation procedure. Nevertheless, the observed findings suggested that an apparent reduced recovery of specific standard metabolites is not necessarily associated with a loss of biologically relevant information, confirming that established criteria for the optimization and validation of targeted LC-MS/MS bioanalysis should be integrated with untargeted approaches for method performance evaluation, in order to get closer to the real objectives of the analytical protocols.

Although no solvent removal/replacement was carried out after sample extraction and prior to LC-MS analysis, neither significant loss of metabolite detection nor early eluting peak shape distortion were observed in our study, suggesting that extract evaporation and reconstitution steps may not be truly necessary following the proposed sample preparation protocol. Extract evaporation followed by reconstitution is commonly incorporated in sample preparation procedures, generally justified by solvent removal/replacement and low-sensitivity issues (concentration purposes). However, concerns about introducing these potentially “risky” steps are widely shared (risk of incomplete solubilization of the dry residues and losses of

hydrophobic and volatile species, increased ion suppression due to pre-concentration of interferences, reduced sample throughput due to considerable time consumption), and no evidence has been produced so far of the actual benefits in terms of metabolome coverage.²² Furthermore, the sample-to-solvent ratio giving the highest final plasma dilution and greatest organic proportion was associated with a higher extractability of the monitored metabolites, without compromising peak detection and shape. The tested ratios were chosen upon the plate manufacturer suggestions and consistently with the challenge of minimizing ion suppression phenomena while bypassing subsequent sample concentration. Although the best dilution ratio is not an absolute parameter to extrapolate for application to different extraction procedures, our findings suggested that sample dilution may be a valuable choice to reduce matrix effects and enhance metabolome coverage.

The use of Atlantis T3 RP column compatible with 100% initial aqueous phase was then found the best option to maximize retention of polar metabolites. The replacement of acidified ACN with nonacidified MeOH as organic phase [B] gave the strongest molecular ion signal intensities, in both ionization modes. Although acidification of both mobile phases of the elution gradient is a common technique in LC-UV analysis, in order to avoid major baseline disruptions when working at low-absorbance wavelengths (i.e., 210 nm), this rule does not apply in LC-MS data acquisition, allowing the best binary systems to be chosen in view of the ionization enhancement. Besides showing the best spray solvent characteristics in terms of volatility and surface tension (low dielectric constant and viscosity), MeOH is also known to facilitate lipid elution and avoid accumulation in the column (i.e., as acetone), which may further contribute to the minimization of matrix effects.²⁷ Furthermore, compared to harmful solvents such as ACN, MeOH is a more “environmentally friendly” alternative in terms of workers, processes and environment safety (i.e., ecotoxicity),³⁹ and its replacement in LC applications should be encouraged as a “greener” option.^{40,41} The purity grade of the solvents used in mobile phase preparation revealed to be an even more crucial factor in mass signal detection, although at least LC-MS purity grade solvents were used. These findings underlined the importance of checking the levels of contaminants in the solvent, such as plasticizers and surfactants, which are very often readily ionizable and can compete for charge with the metabolites.⁴²

Finally, the postcolumn modification of the mobile phase by organic enrichment confirmed to be a pragmatic solution to increase the ionization efficiency without influencing the chromatographic separation, although no applications in RP-LC-ESI-MS untargeted metabolomics have been described until now. Other postcolumn solvents apart from methanol were not considered in our flowchart, for several reasons. The use of the same solvent for both mobile phase and postcolumn enrichment of the phase has been suggested as preferable, and the use of nonacidified MeOH as organic phase [B] gave the strongest molecular ion signal intensities in both ESI modes. Both MeOH and ACN are considered as adequate as postchromatography organic modifiers, but they do not differ strongly in decreasing the droplet surface tension in the ESI source, and so in helping ionic evaporation. However, MeOH shows some peculiar advantages in respect to acetonitrile, such as a higher vapor pressure and a lower surface tension, which facilitate even more solvent evaporation.

Summarizing the results of the present work led to the following considerations: plasma samples should be submitted to

hybrid extraction for removal of interfering components, to minimize all the major sample-dependent matrix effects; solvent evaporation following sample extraction may be avoided if no peak shape distortion of early eluting metabolites is noticed; a RP column for superior retention of highly polar species should be chosen when analysis fractionation is not feasible, ESI efficiency may be enhanced by using UHPLC-MS quality grade solvents and "vintage" analytical tricks, such as postcolumn organic enrichment of the mobile phase. The final proposed protocol offers an example of how novel and old-fashioned analytical solutions should fruitfully cohabit in untargeted metabolomics protocols, and deserves consideration for the rapid and simple LC-ESI-MS untargeted fingerprinting of large-scale complex biomatrices.

We are aware of the internal limitations of the work. To simplify the process of method performance evaluation, only those factors expected to mostly impact the metabolome coverage (SPE technology, postcolumn organic modification of the mobile phase) were finally tested upon real samples, to compare the capacity to detect known biomarkers of cocoa intake. Thus, several specific comparative analysis were carried out on reference plasma samples only (raw, spiked). Although the standard metabolites monitored were representative of a wide range of chemistries, molecular masses, dynamic concentration range and MS responses (39 metabolites in the QC2/POL mix, $70 < m/z < 800$, $-9 < \log P < 4$), there is no guarantee that the behavior of the thousands of variables constituting the whole metabolome can be extrapolated from a smaller number of compounds. Second, data on the direct comparison between sample dilution versus evaporation/reconstitution are not presented in this work, so further analysis will be required to get a definitive evaluation.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Cristina Andrés-Lacueva. Address: Biomarkers & Nutrimetabolomic Lab., Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA, Campus Torribera, Pharmacy Faculty, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: candres@ub.edu. Phone: +34 934034840. Fax: +34934035931.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by PI-0557-2013 project (Fundación Progreso y Salud, Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta de Andalucía); PI13/01172 Project (Plan N de I+D+i 2013-2016) cofunded by ISCII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); the JPI HDHL FOOTBALL (PCIN-2014-133-MINECO-Spain), and ISCIII-CIBEROBN. We also thank the award of 2014SGR1566 from the Generalitat de Catalunya's Agency AGAUR. S.T., R.L. and X.M.-C., respectively, acknowledge the Juan de la Cierva, Ramon y Cajal (MINECO) and the predoctoral FI-DGR 2012 (AGAUR) fellowships.

■ REFERENCES

- (1) Aboud, O. A.; Weiss, R. H. *Clin Chem.* **2013**, *59*, 138–146.
- (2) Lehmann, R. *Clin Chem.* **2013**, *59*, 1294–1296.
- (3) Rhee, E. P.; Gerszten, R. E. *Clin Chem.* **2012**, *58*, 139–147.
- (4) Gika, H. G.; Wilson, I. D.; Theodoridis, G. A. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *966*, 1–6.
- (5) Barri, T.; Dragsted, L. O. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *768*, 118–128.
- (6) Yin, P.; Peter, A.; Franken, H.; Zhao, X.; Neukamm, S. S.; Rosenbaum, L.; Lucio, M.; Zell, A.; Haring, H. U.; Xu, G.; Lehmann, R. *Clin Chem.* **2013**, *59*, 833–845.
- (7) Kamlage, B.; Maldonado, S. G.; Bethan, B.; Peter, E.; Schmitz, O.; Liebenberg, V.; Schatz, P. *Clin Chem.* **2014**, *60*, 399–412.
- (8) Calbani, F.; Careni, M.; Elviri, L.; Mangia, A.; Zagnoni, I. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 289–294.
- (9) Fiehn, O.; Robertson, D.; Griffin, J.; van der Werf, M.; Nikolau, B.; Morrison, N.; Sumner, L. W.; Goodacre, R.; Hardy, N. W.; Taylor, C.; Fostel, J.; Kristal, B.; Kadlurah-Daouk, R.; Mendes, P.; van Ommen, B.; Lindon, J. C.; Sansone, S. A. *Metabolomics* **2007**, *3*, 175–178.
- (10) Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-Maitland, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Haselden, J. N.; Nicholls, A. W.; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; Goodacre, R. *Nature Protoc.* **2011**, *6*, 1060–1083.
- (11) Ivanisevic, J.; Zhu, Z. J.; Plate, L.; Tautenhahn, R.; Chen, S.; O'Brien, P. J.; Johnson, C. H.; Marletta, M. A.; Patti, G. J.; Sizzak, G. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6876–6884.
- (12) Tulipani, S.; Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Andres-Lacueva, C. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 341–348.
- (13) Want, E. J.; O'Maille, G.; Smith, C. A.; Brandon, T. R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Sizzak, G. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 743–752.
- (14) Sarafian, M. H.; Gaudin, M.; Lewis, M. R.; Martin, F. P.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Dumas, M. E. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5766–5774.
- (15) Naz, S.; Vallejo, M.; Garcia, A.; Barba, C. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1353*, 99–105.
- (16) Horwitz, W. A. I.; *Official Methods of Analysis of AOAC International*; AOAC International: Gaithersburg, MD, **2003**.
- (17) Annesley, T. M. *Clin Chem.* **2003**, *49*, 1041–1044.
- (18) Callahan, D. L.; Elliott, C. E. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1055*, 57–70.
- (19) Lahaie, M.; Mess, J. N.; Furtado, M.; Garofolo, F. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1011–1021.
- (20) Ismael, O. A.; Zhang, T.; Jenkins, R. G.; Karnes, H. T. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 3303–3316.
- (21) Petkovic, M.; Schüller, J.; Müller, M.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.; Amhold, J. *Anal. Biochem.* **2001**, *289*, 202–216.
- (22) Fernández-Peralbo, M. A.; Laque de Castro, M. D. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2012**, *41*, 75–85.
- (23) Theodoridis, G. A.; Gika, H. G.; Want, E. J.; Wilson, I. D. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 7–16.
- (24) Napoli, K. L. *Clin Chem.* **2009**, *55*, 1250–1252.
- (25) Annesley, T. M. *Clin Chem.* **2007**, *53*, 1827–1834.
- (26) Raina, R.; Etter, M. L. *Anal. Chem. Insights* **2010**, *5*, 1–14.
- (27) Gray, M. J.; Jahani, S.; Low, G. K. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1219*, 83–92.
- (28) Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Jauregui, O.; Monagas, M.; Andres-Lacueva, C. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5060–5068.
- (29) Stahnke, H.; Reemtsma, T.; Alder, I. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2185–2192.
- (30) Wang, S.; Cyronak, M.; Yang, E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 701–707.
- (31) Gika, H. G.; Macpherson, E.; Theodoridis, G. A.; Wilson, I. D. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *871*, 299–305.
- (32) Tulipani, S.; Llorach, R.; Jauregui, O.; Lopez-Urriarte, P.; Garcia-Aloy, M.; Bullo, M.; Salas-Salvado, J.; Andres-Lacueva, C. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 5047–5058.
- (33) Patti, G. J.; Tautenhahn, R.; Sizzak, G. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 508–516.

- (34) Wildund, S.; Johansson, E.; Sjoström, L.; Mellerowicz, E. J.; Edlund, U.; Shockcor, J. P.; Gottfries, J.; Moritz, T.; Trygg, J. *Anal. Chem.* **2007**, *80*, 115–122.
- (35) Fernandez-Albert, F.; Llorach, R.; Andres-Lacueva, C.; Perera, A. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 1937–1939.
- (36) Keunchkarian, S.; Reta, M.; Romero, L.; Castell, C. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1119*, 20–28.
- (37) Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Tulipani, S.; Garcia-Aloy, M.; Monagas, M.; Andres-Lacueva, C. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 962–973.
- (38) Psychogios, N.; Hau, D. D.; Peng, J.; Guo, A. C.; Mandal, R.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Krishnamurthy, R.; Eisner, R.; Gautam, B.; Young, N.; Xia, J.; Knox, C.; Dong, E.; Huang, P.; Hollander, Z.; Pedersen, T. L.; Smith, S. R.; Bamforth, F.; Greiner, R.; McManus, B.; Newman, J. W.; Goodfriend, T.; Wishart, D. S. *PLoS One* **2011**, *6*, e16957.
- (39) Alfonsi, K.; Colberg, J.; Dunn, P. J.; Fevig, T.; Jennings, S.; Johnson, T. A.; Kleine, H. P.; Knight, C.; Nagy, M. A.; Perry, D. A.; Stefaniak, M. *Green Chem.* **2008**, *10*, 31–36.
- (40) Giorgianni, F.; Cappiello, A.; Beranova-Giorgianni, S.; Palma, P.; Trufelli, H.; Desiderio, D. M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 7028–7038.
- (41) Discenza, L.; D'Arienzo, C.; Olah, T.; Jemal, M. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 1583–1589.
- (42) Roberts, L. D.; Souza, A. L.; Gerszten, R. E.; Clish, C. B. In *Current Protocols in Molecular Biology*; Ausubel, F. M., Ed.; John Wiley & Sons: New York, 2012; Chapter 30, Unit 30.2, pp 1–24.

5.2 Estudio EFINUT

Los resultados de este estudio han sido publicados en la revista *Molecular Nutrition & Food Research* indexada en el *Journal Citation Reports* con un factor de impacto de 4.603 (2014) y situada en el primer decil (D1) y primer cuartil (Q1) de la categoría de FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (4/123).

Ximena Mora-Cubillos, Sara Tulipani, Mar Garcia-Aloy, Mònica Bulló, Francisco J Tinahones, Cristina Andres-Lacueva. Plasma metabolomic biomarkers of mixed nuts exposure inversely correlate with severity of metabolic syndrome. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2015, 59, 2480–2490. DOI: 10.1002/mnfr.201500549.

Dos objetivos principales se abordaron en este estudio. Por una parte, identificar biomarcadores plasmáticos de exposición a frutos secos en sujetos diagnosticados con síndrome metabólico que siguieron una intervención de 30 g/d de una mezcla de frutos secos durante 12 semanas. En un segundo momento, evaluar las posibles asociaciones entre dichos biomarcadores plasmáticos y criterios diagnósticos de síndrome metabólico más severos en los sujetos participantes en este estudio.

5.2.1 Análisis descriptivo de los participantes del estudio

Cincuenta hombres y mujeres participaron en este estudio, 25 sujetos en el grupo frutos secos (grupo NU) y 25 sujetos en el grupo control (grupo CT), tal como se informó previamente en la metodología (ver apartado 4.1.1). Tres sujetos (dos del grupo CT y uno del grupo NU) fueron excluidos del estudio durante la adquisición de datos, por motivo de hemólisis de las muestras biológicas (Yin, et al. 2013). El grupo de intervención con frutos secos reportó una edad promedio de 52.7 ± 8.5 años y un 62% de hombres, mientras que el grupo control reportó como edad promedio 51.0 ± 8.4 años y un 52% fueron hombre. En la **Tabla 5.5** se describen las características clínicas, antropométricas y bioquímicas de los 47 sujetos participantes incluidos en este estudio, así como la comparación entre dichos

parámetros luego de la intervención (12 semanas después). En ninguno de los casos se observó una diferencia significativa entre los dos grupos al inicio de la intervención, ni se reportaron cambios estadísticamente significativos en la diagnosis de síndrome metabólico, asociados al consumo de frutos secos. Sin embargo, cambios significativos fueron observados en parámetros clínicos como disminución de presión sistólica y diastólica en grupo NU luego de la intervención, aunque disminución en presión diastólica también fue reportada como significativa en grupo CT. En ambos grupos se observó una disminución en parámetros clínicos asociados a obesidad como son IMC, peso y grasa corporal. Sin embargo, efectos asociados al consumo de frutos secos y parámetros bioquímicos como insulina en ayunas y HOMA-IR fueron reportados como estadísticamente significativos ($p < 0.05$) únicamente en el grupo NU.

En estado basal, no se observaron diferencias significativas en la composición de la dieta en términos de energía y macronutrientes dentro de cada grupo (ver **Tabla 5.6**). Sin embargo, luego de las 12 semanas de intervención, fueron reportados cambios significativos e inversos en parámetros como ingesta de grasas totales (incluidas grasas saturadas, monoinsaturadas y poliinsaturadas) entre los dos grupos de intervención, es decir, mientras que en el grupo NU se observó un aumento de grasas totales, una disminución de la ingesta de grasas saturadas y un aumento de grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas (cambio estadísticamente significativo para esta última $p < 0.001$), en el grupo CT se observa una disminución en la ingesta de grasas totales, incluidas las grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas asociadas con efectos beneficiosos para la salud (McCombie, et al. 2009; Nestel, et al. 2014; Oh da and Walenta 2014).

Tabla 5.5. Características de parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos al tiempo basal y después de 12 semanas en paralelo para cada grupo de intervención.

Criterios	Grupo NU (n = 24)			Grupo CT (n = 23)			Efecto del tratamiento
	Basal	12 semanas	p-valor	Basal	12 semanas	p-valor	p-valor
Componentes del síndrome metabólico^a							
Elevada circunferencia de cintura [n (%)]	21 (87.5)	18 (75.0)	0.267	18 (81.8) ^f	14 (63.6) ^f	0.176 ^b	0.592 ^b
Triglicéridos elevados [n (%)]	23 (95.8)	22 (91.7)	0.551	18 (81.8) ^f	19 (82.6)	0.945 ^b	0.472 ^b
Reducción de colesterol HDL [n (%)]	16 (66.7)	14 (58.3)	0.551	15 (65.2)	16 (69.6)	0.753 ^b	0.608 ^b
Presión arterial elevada [n (%)]	22 (91.7)	20 (83.3)	0.383	17 (73.9)	18 (78.3)	0.730 ^b	0.955 ^b
Elevada glucemia basal en ayunas [n (%)]	18 (75.0)	20 (83.3)	0.477	15 (65.2)	16 (69.6)	0.753 ^b	0.576 ^b
Total casos con síndrome metabólico	24 (100.0)	22 (91.7)	0.149	23 (100.0)	22 (95.7)	0.550^b	0.601^b
Parámetros antropométricos y bioquímicos asociados a síndrome metabólico							
Circunferencia de cintura (cm)	105.63 ± 7.93	101.95 ± 8.80	0.001	100.86 ± 8.83 ^d	98.08 ± 7.64 ^d	0.004 ^d	0.499 ^a
Presión arterial sistólica (mm Hg)	144.54 ± 15.54	138.79 ± 16.60	0.015	138.75 ± 19.05 ^d	126.75 ± 14.85	0.000 ^d	0.078 ^a
Presión arterial diastólica (mm Hg)	85.79 ± 8.04	83.13 ± 9.39	0.031	82.34 ± 10.01	77.14 ± 11.11	0.242 ^d	0.242 ^a
Glucosa en ayunas (mmol/L)	5.77 ± 0.49	5.74 ± 0.44	0.609	5.81 ± 0.60	5.80 ± 0.67	0.786 ^d	0.786 ^a
c-HDL (mmol/L)	1.14 ± 0.22	1.14 ± 0.24	0.923	1.12 ± 0.27	1.12 ± 0.71	0.522 ^d	0.533 ^a
Triglicéridos en ayunas (mmol/L)	1.55 ± 0.70	1.52 ± 0.72	0.747	1.58 ± 0.87	1.76 ± 1.33	0.569 ^d	0.511 ^a
Otros parámetros antropométricos y bioquímicos							
IMC (kg/m ²)	31.50 ± 2.80	30.70 ± 2.70	0.002	29.60 ± 3.10	29.00 ± 2.90	0.001 ^d	0.563 ^a
Peso corporal (kg)	86.70 ± 13.80	84.50 ± 13.20	0.002	79.40 ± 10.90	77.70 ± 10.40	0.002 ^d	0.479 ^a
Índice cintura-cadera	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.061	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.10	0.673 ^d	0.243 ^a
Grasa corporal (kg)	31.40 ± 7.40	29.20 ± 7.20	<0.001	27.10 ± 8.00	25.50 ± 7.40	0.002 ^d	0.379 ^a
Grasa corporal (%)	36.10 ± 6.10	34.10 ± 7.40	0.001	33.90 ± 8.30	32.70 ± 8.10	0.008 ^d	0.283 ^a
Impedancia (Ohms)	482.20 ± 53.40	479.80 ± 67.40	0.697	491.00 ± 68.90	487.10 ± 74.00	0.468 ^d	0.853 ^a
Glicemia 120 min (mmol/L) ^e	9.30 ± 2.80	9.10 ± 2.70	0.634	9.10 ± 2.40	8.80 ± 1.900	0.782 ^d	0.842 ^a
Insulina (µU/mL) ^e	8.10 ± 3.70	5.90 ± 2.30	0.007	6.10 ± 4.10	6.70 ± 5.70	0.402 ^d	0.011 ^a
HOMA-IR ^e	2.10 ± 1.00	1.50 ± 0.60	0.007	1.60 ± 1.20	1.80 ± 1.60	0.421 ^d	0.011 ^a
Colesterol total (mmol/L)	5.30 ± 0.70	5.20 ± 0.70	0.435	5.70 ± 1.30	5.00 ± 1.30	0.006 ^d	0.023 ^a
c-LDL (mmol/L)	3.40 ± 0.70	3.30 ± 0.60	0.357	3.70 ± 1.00	3.20 ± 1.10	0.004 ^d	0.025 ^a
c-VLDL (mmol/L)	0.80 ± 0.30	0.80 ± 0.30	0.942	0.90 ± 0.50	0.80 ± 0.40	0.653 ^d	0.685 ^a
Gasto de Energía Basal (kcal/d)	1714.50 ± 288.40	1698.60 ± 355.80	0.645	1622.70 ± 240.40	1622.60 ± 218.00	0.998 ^d	0.699 ^a
Actividad física (kcal/d)	449.30 ± 540.50	337.90 ± 247.60	0.295	387.50 ± 320.50	482.70 ± 586.90	0.449 ^d	0.206 ^a
PCR (mg/L)	1.70 ± 1.40	1.80 ± 1.30	0.739	2.50 ± 2.30	4.10 ± 5.20	0.109 ^d	0.140 ^a
IL-6 (ng/L)	5.80 ± 9.30	3.20 ± 3.90	0.121	8.10 ± 19.50	10.00 ± 25.20	0.313 ^d	0.073 ^a
IL-18 (pg/mL)	118.80 ± 63.90	95.40 ± 47.50	0.014	103.80 ± 63.20	88.80 ± 45.40	0.066 ^d	0.476 ^a
Adiponectina (µg/mL)	6.10 ± 3.60	6.80 ± 3.00	0.466	6.50 ± 3.40	6.80 ± 4.40	0.805 ^d	0.871 ^a
PAI-1	8.10 ± 3.90	7.80 ± 3.60	0.575	7.60 ± 3.00	8.30 ± 4.60	0.483 ^d	0.373 ^a
ICAM-1	634.20 ± 242.30	530.00 ± 147.90	0.073	660.50 ± 380.80	547.40 ± 254.80	0.745 ^d	0.381 ^a
VCAM (µg/L)	1091.50 ± 395.30	1052.00 ± 398.20	0.664	1210.20 ± 683.50	1258.30 ± 751.30	0.521 ^d	0.456 ^a
MCP1	239.10 ± 830	218.10 ± 70.30	0.022	255.40 ± 107.90	207.60 ± 73.70	0.018 ^d	0.194 ^a
Dienos conjugados	1.30 ± 0.50	1.20 ± 0.40	0.089	1.3 ± 0.40	1.20 ± 0.40	0.161 ^d	0.632 ^a
LDL-ox (U/L)	70.20 ± 22.60	62.80 ± 190	0.084	66.90 ± 26.10	64.50 ± 22.70	0.554 ^d	0.381 ^a
Sodio (mmol/L)	139.80 ± 2.30	139.40 ± 1.70	0.412	139.20 ± 1.80	138.90 ± 2.20	0.501 ^d	0.778 ^a
Potasio (mmol/L)	4.50 ± 0.50	4.40 ± 0.40	0.438	4.40 ± 0.50	4.40 ± 0.40	0.805 ^d	0.647 ^a
Creatinina (µmol/L)	78.20 ± 15.30	75.50 ± 14.00	0.097	73.30 ± 15.90	72.80 ± 15.30	0.772 ^d	0.324 ^a
Ácido úrico (µmol/L)	369.80 ± 85.80	363.00 ± 87.50	0.493	326.40 ± 77.10	323.00 ± 88.30	0.752 ^d	0.807 ^a
Hemoglobina (g/L)	14.30 ± 1.40	14.50 ± 1.30	0.263	13.80 ± 1.40	13.30 ± 1.40	0.018 ^d	0.008 ^a
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	7.40 ± 2.60	6.50 ± 1.70	0.045	7.00 ± 2.10	6.70 ± 2.10	0.502 ^d	0.161 ^a
Albumina (g/L)	43.20 ± 3.80	42.20 ± 3.60	0.130	41.50 ± 4.80	39.20 ± 4.70	0.022 ^d	0.367 ^a

^a Los criterios y valores umbrales para el diagnóstico de síndrome metabólico de acuerdo con publicaciones previas (Alberti, et al. 2009). ^b Significancia (p < 0.05) según prueba de chi-cuadrado para variables categóricas. ^c Sólo 22 casos fueron analizados. ^d Diferencias intra-grupo estadísticamente significativas (p < 0.05 o p < 0.01) fueron realizadas mediante la prueba de muestras pareadas. ^e Diferencias inter-grupo (grupo NU vs grupo CT) estadísticamente significativas (p < 0.05), mediante T de Student de muestras no pareadas.

A pesar de no reportarse como estadísticamente significativos, la ingesta de carbohidratos aumentó en el grupo CT mientras que disminuyó en el grupo NU. En ambos grupos la ingesta de fibra aumentó, aunque no se reportó como significativo en ninguno de los casos.

Tabla 5.6. Energía y nutrientes al inicio del estudio (basal) y después de la intervención de frutos secos (12 semanas) en sujetos con síndrome metabólico.

Variable	Grupo NU (n = 24)			Grupo CT (n = 23)			Efecto del tratamiento
	Basal ^a	12 semanas	<i>p</i> -valor ^b	Basal ^a	12 semanas	<i>p</i> -valor ^b	<i>p</i> -valor ^c
Energía (kcal/d)	2112.00 ± 558.60	1895.70 ± 579.00	0.017	1981.60 ± 476.70	1596.00 ± 480.00	0.001	0.162
Carbohidratos (%)	41.20 ± 7.00	41.00 ± 7.10	0.870	42.80 ± 6.20	45.50 ± 7.30	0.144	0.178
Proteínas (%)	18.80 ± 3.20	19.30 ± 3.90	0.451	18.80 ± 3.50	21.30 ± 3.30	0.012	0.098
Grasas totales (%)	35.70 ± 6.00	36.80 ± 6.70	0.353	35.90 ± 5.50	31.30 ± 7.20	0.030	0.003
Saturadas	10.50 ± 2.50	8.50 ± 3.00	0.011	10.50 ± 2.60	8.10 ± 3.00	0.001	0.657
Monoinsaturadas	16.80 ± 4.20	17.50 ± 3.60	0.241	17.20 ± 3.50	15.00 ± 4.30	0.005	0.003
Poliinsaturadas	5.30 ± 1.70	7.40 ± 1.50	0.001	5.00 ± 1.30	4.90 ± 1.70	0.660	0.001
Alcohol	4.30 ± 5.70	2.90 ± 4.50	0.004	2.60 ± 4.30	2.00 ± 4.70	0.461	0.374
Fibra (g/d)	20.60 ± 7.80	22.40 ± 8.10	0.318	19.90 ± 9.10	22.30 ± 22.20	0.636	0.910

^a No se evidenciaron cambios significativos intra-grupo al inicio de la intervención. ^b Diferencias intra-grupo estadísticamente significativas ($p < 0.05$ o $p < 0.01$) fueron evaluadas mediante la prueba de muestras pareadas. ^c Diferencias inter-grupo (grupo NU vs grupo CT) estadísticamente significativas ($p < 0.05$) fueron evaluadas mediante T de Student de muestras no pareadas.

5.2.2 Análisis del metaboloma plasmático

Con el objetivo de identificar los biomarcadores de exposición a frutos secos y explorar los cambios que se producen en el metaboloma plasmático de sujetos con síndrome metabólico tras la intervención, se aplicó el flujo de trabajo característico en el análisis metabolómico no dirigido impulsado por LC-ESI-q-ToF-MS a través del protocolo analítico previamente validado (Tulipani, et al. 2015).

5.2.2.1 Evaluación de la calidad de la adquisición de los datos

La reproducibilidad de la extracción y la estabilidad del sistema LC-MS en modo ESI- durante la adquisición de los datos fueron comprobados mediante la intensidad del pico del estándar interno (IS) y la intensidad del pico de la mezcla de estándares externos (ES) en las muestras de plasma ($CV < 1\%$ en el análisis). Este seguimiento y control evitó la necesidad de normalización de los datos utilizados en análisis posteriores.

La calidad y la estabilidad del sistema LC-MS fueron comprobadas a través del seguimiento continuo de los controles de calidad (mezcla de QC2), los cuales

fueron inyectados cada 15 muestras de plasma, aproximadamente. En la **Tabla 5.7** se observan las variaciones en el tiempo de retención, el área de los picos y la precisión de masa detectadas para cada uno de los metabolitos de la mezcla de QC2.

Tabla 5.7. Variación en el tiempo de retención, el área del pico y la masa detectada en muestras acuosas de QC2 inyectadas aleatoriamente.

Metabolitos (QC2)	Fórmula molecular	Masa teórica vs masa detectada [M - H] ⁺			Tiempo de retención (min)		Intensidad (área del pico)	
		Masa exacta teórica	Masa detectada (media)	Error (mDa)	Media	Cambio (max - min)	Media	CV (%)
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.017	289.077	-5.33	5.35	0.02	1807.74	7.53
Ácido 4-hidroxihipúrico	C ₉ H ₉ NO ₄	194.045	194.045	0.85	4.73	0.03	764.50	6.87
Ácido dodecanedioico	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	229.144	229.136	7.69	6.47	0.02	1689.91	5.83
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169.014	169.015	-0.95	1.89	0.04	525.58	12.40
Ácido glucoquenodesoxicólico	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	448.307	448.315	-8.32	6.98	0.03	2333.63	6.76
L-fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164.071	164.072	-0.38	2.45	0.05	69.71	10.39
L-triptófano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.082	203.083	-0.77	4.78	0.03	180.75	8.71
Naringinina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.061	271.056	4.31	6.11	0.02	2540.32	6.13
Ácido sebáico	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	201.113	201.107	5.48	6.16	0.05	1535.51	5.37
Ácido siringico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.055	197.046	-0.93	5.41	0.02	130.19	22.33
Ácido α-hidroxiisobutírico	C ₄ H ₈ O ₃	103.040	103.039	0.30	1.23	0.03	719.74	5.33

A través de los resultados reportados en la tabla anterior, se establecen los criterios de calidad propuestos para el pre-procesamiento de los datos (detección y alineación de picos) de acuerdo con el protocolo de análisis en metabolómica: desplazamiento de tiempo de retención ≤ 0.09 min y desviación en la detección de masa en modo ESI- de 0.05 Da, al no superar 10 mDa de error en la masa detectada (ver **Tabla 5.8**). La variación de la intensidad de la señal fue satisfactoria (áreas de los picos con CV < 20%) a excepción de un metabolito con una respuesta muy baja a la ionización (Llorach, et al. 2010; Tulipani, et al. 2015).

Tabla 5.8. Parámetros utilizados en el pre-procesamiento de los datos a través del software MarkerView™ 1.2.1 (AB Sciex, Toronto, Ontario, Canadá).

Parámetro	Descripción	Valor
Detección del pico (peak finding)	Subtraction offset (scans)	15
	Subtraction multiplication factor	1.5
	Minimum spectral peak width (ppm)	1
	Minimum retention time peak width (scans)	3
	Noise threshold	5
Alineación del pico (peak alignment)	Retention time tolerance (min)	0.09
	Mass tolerance (Da)	0.05
	Intensity threshold	5
	Maximum number of peaks	5000

5.2.2.2 Análisis de datos e identificación de metabolitos

Antes de realizar el análisis bioestadístico, el conjunto de datos obtenidos del pre-procesamiento fue filtrado con el objetivo de eliminar cualquier señal de masa que no apareciera en más del 35% de las muestras de cada una de las tres siguientes clases de muestras en estudio: muestras basales (T0) de ambos grupos al inicio del estudio, muestras del grupo NU luego de las 12 semanas de intervención (NU_T3) y muestras de sujetos del grupo CT después de la intervención (CT_T3) (Rothwell, et al. 2014).

Las diferencias en el metaboloma plasmático debido a los factores de exposición de frutos como la dieta (NU vs CT) y el tiempo de la recolección de las muestras de plasma (T0 vs T3) fueron exploradas tras la aplicación de un filtro ortogonal de corrección al conjunto de datos (filtro OSC) por medio de un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). El filtro OSC aplicado al procesado de datos eliminó 11 componentes y mostró el mantenimiento de un 43% de la variación no ortogonal del conjunto de datos original.

Tres modelos fueron construidos, un primer modelo de tres clases para evaluar la presencia de una variación significativa en el metaboloma plasmática al inicio del estudio y después de la intervención (M1: T0 vs CT_T3 vs NU_T3) (ver **Figura 5.6**), un segundo modelo que evaluó la variación en el tiempo del metaboloma plasmático en el grupo NU (M2: T0 vs NU_T3) y, un tercer modelo con el fin de evaluar únicamente las señales de masa discriminantes producto de la exposición a los frutos secos luego de la intervención (M3: CT_T3 vs NU_T3).

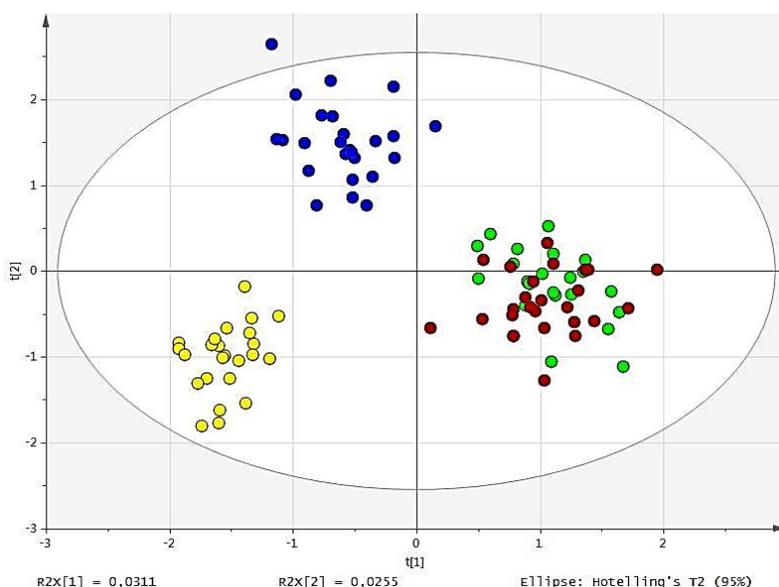


Figura 5.6. OSC-PLS-DA plot del M1. Los colores indican las diferentes muestras de plasmas: muestras de NU_T3 (color amarillo), muestras de CT_T3 (color azul) y muestras superpuestas de CT_T0 y NU_T0 (color verde y rojo, respectivamente).

La capacidad predictiva de cada uno de los modelos PLS se evaluó mediante el parámetro de bondad de ajuste (R^2X), la proporción de la varianza de la variable de respuesta que se explica por el modelo (R^2Y), la validación cruzada y las pruebas de permutación ($n = 200$; trama y CV ANOVA) (ver **Tabla 5.9**).

Tabla 5.9. Resumen de los parámetros de aseguramiento de la calidad para los modelos OSC-PLS-DA.

Modelo ^a	Número de clases	Número de componentes	$R^2X(\text{cum})^b$	$R^2Y(\text{cum})^b$	$Q^2(\text{cum})^b$	R intercepto ^c	Q intercepto ^c	p^d
1	3 (T0 vs CT_T3 vs NU_T3)	2	0.057	0.886	0.669	0.562	-0.223	8.92E-35
2	2 (T0 vs NU_T3)	1	0.04	0.942	0.744	0.645	-0.147	1.83E-24
3	2 (CT_T3 vs NU_T3)	1	0.047	0.928	0.621	0.709	-0.152	2.07E-10

^a La generación de los filtros OSC eliminó 11 componentes con (valor propio > 2), manteniendo el 43% de variación no ortogonal en el conjunto de datos original. ^b $R^2X(\text{cum})$ y $R^2Y(\text{cum})$ son la variación acumulada de modelado en la matriz X y Y, respectivamente. $Q^2(\text{cum})$ es la variación predicha acumulado en la matriz Y. ^c Se obtiene de la prueba de permutación ($n=200$). ^d Valor de ANOVA basado en los residuos de predicción con validación cruzada. Los modelos se consideraron significativos con $p < 0.001$.

Como una prueba de calidad final, el conjunto de datos se dividió aleatoriamente en cinco sub-muestras de igual tamaño (20% de las muestras en cada uno), cuatro de los cuales fueron usados como conjunto de entrenamiento y, el conjunto

restante fue considerado como validación. Este proceso se repitió cinco veces, cada sub-muestra se utiliza como el conjunto de validación al menos una vez, y se calcularon los individuos clasificados correctamente en cada conjunto de validación (%) (ver **Tabla 5.10**).

Tabla 5.10. Resumen de los parámetros para evaluar la calidad del modelo OSC-PLS-DA después de la eliminación de las muestras de validación (20%).

Conjunto de entrenamiento (80%)	No. ^a	R ² X(cum) ^b	R ² Y(cum) ^b	Q ² (cum) ^b	p-valor	Individuos correctamente clasificados				
						Conjunto de validación total (%)	Grupo T0 (%)	Grupo CT_T3 (%)	Grupo NU_T3 (%)	Probabilidad de Fisher
1	2	0.071	0.864	0.647	8.18E-25	88.24	100	60	100	1.50E-05
2	2	0.0745	0.851	0.651	7.93E-24	94.12	100	75	100	5.90E-06
3	2	0.0715	0.867	0.589	2.23E-21	94.12	88.89	100	100	5.90E-06
4	2	0.0706	0.856	0.601	9.76E-22	100	100	100	100	1.80E-07
5	2	0.0729	0.859	0.645	2.78E-26	88.89	88.89	75	100	1.00E-05
Media ± DS ^c	2	0.0721 ± 0.0016	0.8594 ± 0.0063	0.6266 ± 0.029	6.43E-22	93.074	95.56	82	100	7.40E-06

^a Componentes seleccionados. ^b R²X(cum) y R²Y(cum) son la variación acumulada de modelado en la matriz X y Y, respectivamente. Q²(cum) es la variación predicha acumulado en la matriz Y. ^c Valores de R²X(cum), R²Y(cum) y Q²(cum) corresponden a media y desviación estándar (DS).

A través de la visualización de un gráfico de dispersión con ejes p vs p(corr), conocido como *S-plot*, fue posible identificar las señales de masa discriminantes asociadas al efecto (p(corr) < -0.5) y a la exposición (p(corr) > 0.5) tras la ingesta de frutos secos (ver **Figura 5.7**).

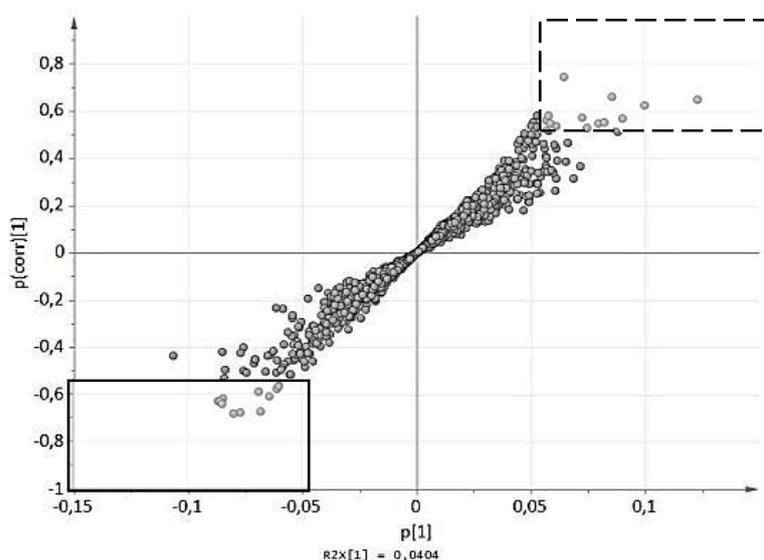


Figura 5.7. *S-plot* para la selección de las señales de masa discriminantes de la huella metabólica plasmática de sujetos con síndrome metabólico tras la ingesta de frutos secos durante 12 semanas. Los recuadros en líneas punteadas y lisas representan las señales de masa discriminantes de acuerdo con los puntos de corte y alta o baja regulación, respectivamente.

La importancia de las señales de masa en la discriminación entre clases se visualizó mediante los valores VIP. Para evitar falsos positivos, las señales de masa que explican la separación de clases se seleccionaron mediante la combinación de la VIP de corte ($VIP \geq 2$), el peso (p) de cada metabolito en el modelo estadístico ($|p| \geq 0.05$) y su correlación con la designación de la clase de modelado ($|p(\text{corr})| \geq 0.5$) como fue descrito previamente (Tulipani, et al. 2011). Un total de 23 señales de masa discriminantes fueron las responsables de establecer la variación en las huellas metabólicas producto de la exposición a frutos secos (ver **Figura 5.8**).

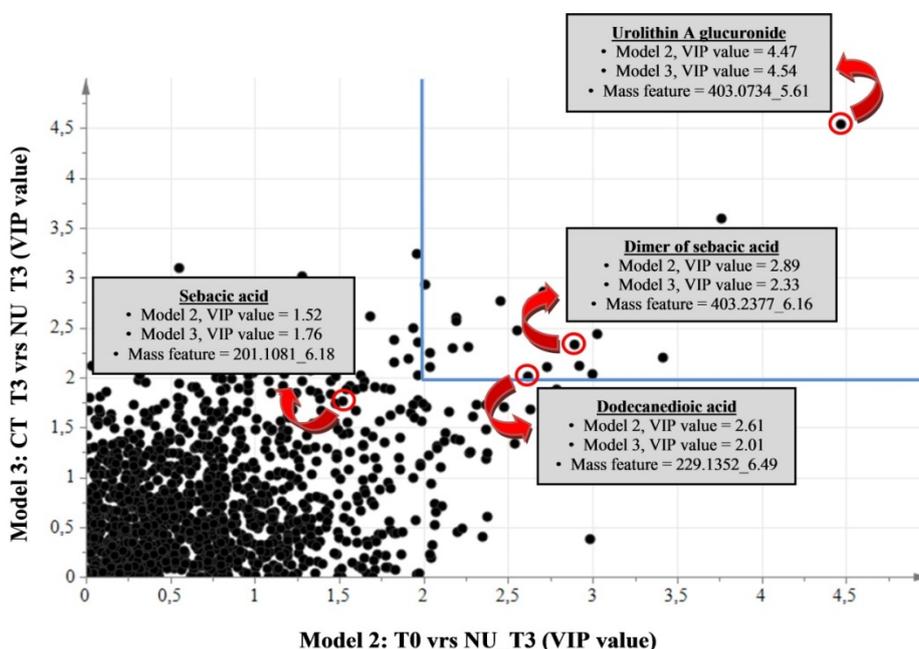


Figura 5.8. Representación de los valores VIP del M2 (T0 vs NU_T3) y el M3 (CT_T3 vs NU_T3). Las líneas azules representan las señales de masa con valor $VIP \geq 2$ en ambos modelos. Urolitina A glucurónido, ácido dodecanodioico y ácido sebácico (monómero y dímero) son ejemplos de algunos biomarcadores discriminantes (círculos rojos).

Luego de la selección de las señales de masa discriminantes, se inició el proceso de identificación de metabolitos. En primer lugar, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico de dos vías basado en la correlación de Pearson y el método de distancia de Ward's para determinar eventuales grupos de señales de masa procedentes del mismo metabolito (es decir, como fragmentos moleculares, aductos, ^{13}C isótopos) y reducir así las señales de masa consultados (PermutMatrix software 1.9.3) (ver **Figura 5.9**).

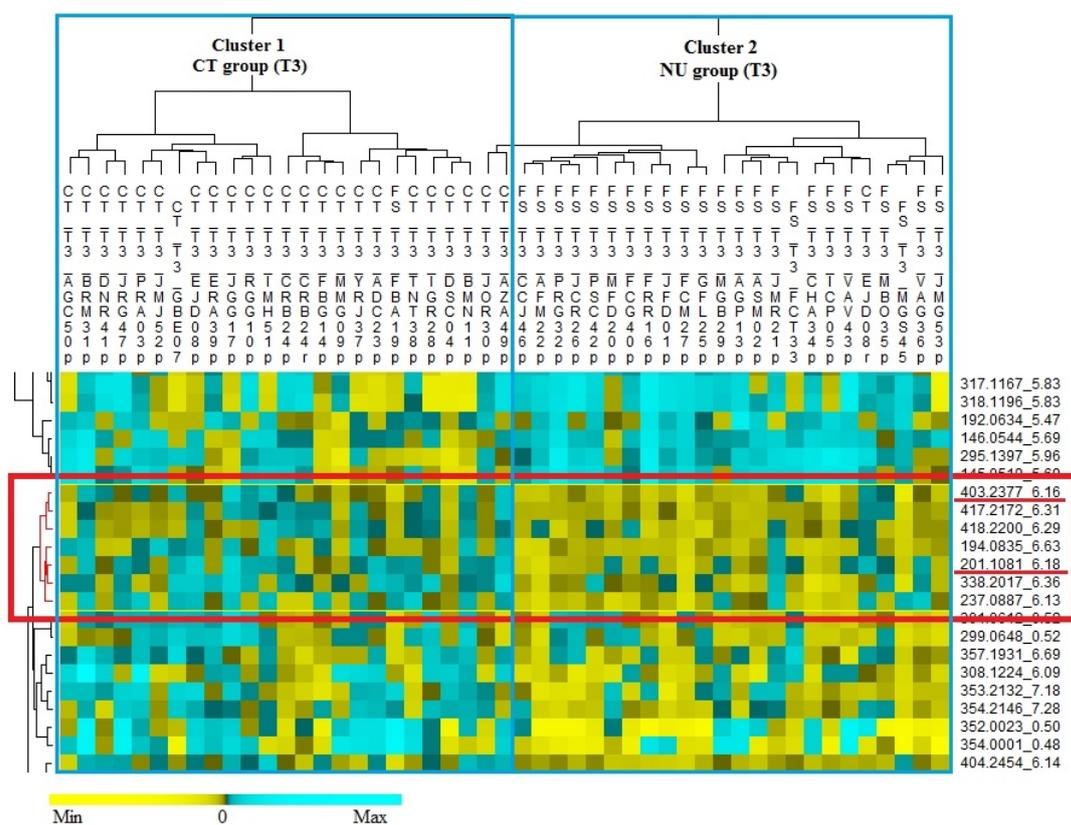


Figura 5.9. Aplicación de análisis jerárquico (HCA) de mapa de colores en la agrupación de señales de masa discriminantes en la exploración de la huella metabólica plasmática asociada a la exposición de frutos secos.

En el proceso de identificación de los metabolitos se utilizaron diferentes estrategias como el uso de las herramientas proporcionadas por el paquete MAIT (R, RStudio 3.0.1 Inc. (Fernandez-Albert, et al. 2014a; Fernandez-Albert, et al. 2014b), la búsqueda minuciosa en bibliografía científica y, la consulta de bases de datos de libre acceso con datos espectrales (como MassBank, mzCloud, hmdb, Metlin y Phenol-Explorer, entre otras) (± 10 mDa de tolerancia de error) (Horai, et al. 2010; Wagele, et al. 2012; Wishart, et al. 2013). La confirmación de la identidad de los metabolitos finalmente se llevó a cabo a través de experimentos MS/MS (cromatograma de iones extraídos, escaneo de iones producto) de los estándares de referencia comercial, los cuales se inyectaron en agua Milli-Q y plasma (50 ppb de concentración final). Por ejemplo, en el caso del ácido sebácico, la señal de masa más significativa del grupo de iones correspondió a la forma del dímero del compuesto ($[2M-H]^-$; $m/z = 403.2377$) probablemente generado en la fuente y co-eluyendo con el monómero ($[M-H]^-$; $m/z = 201.1132$) (ver **Figura 5.10**).

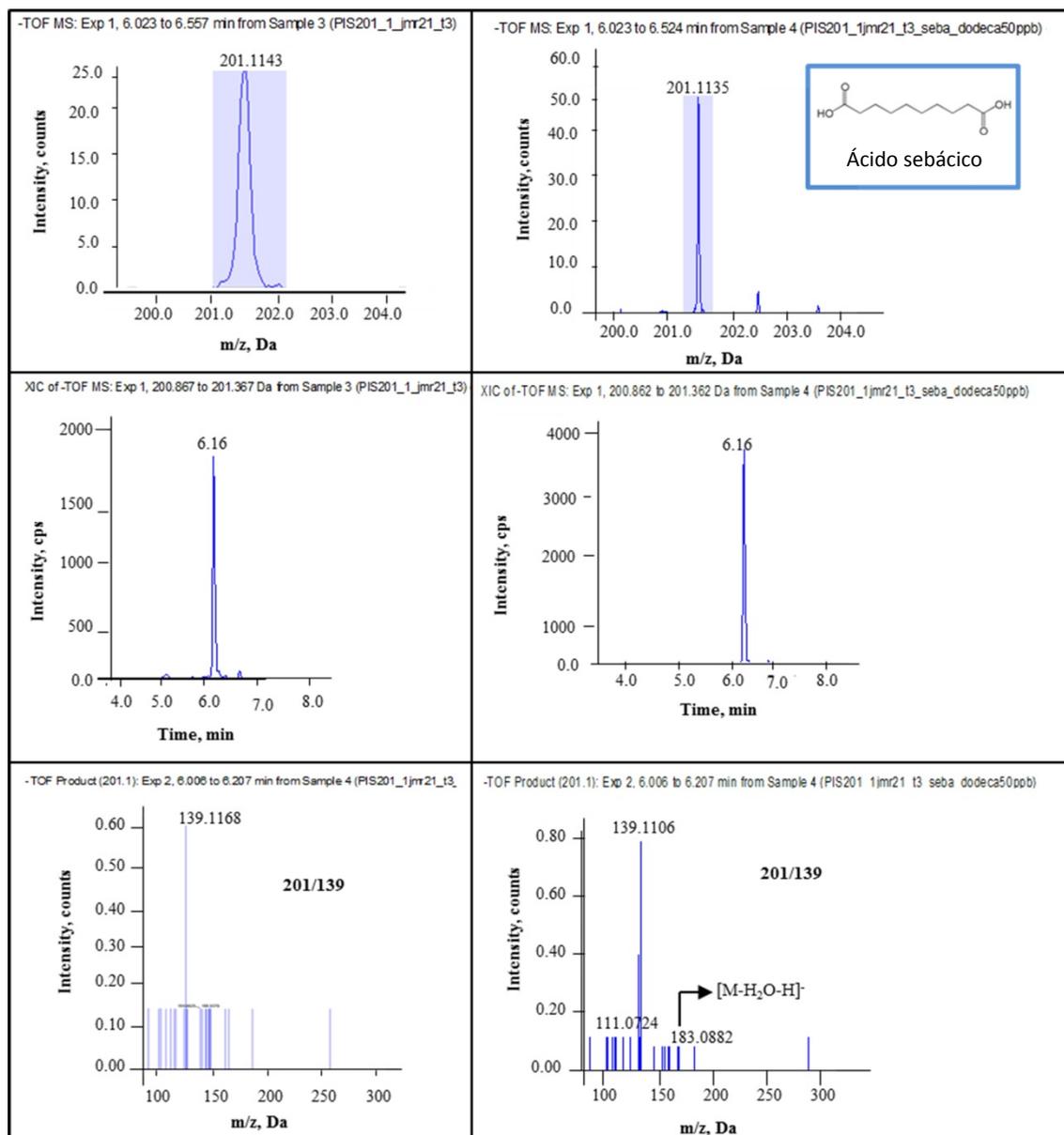


Figura 5.10. Ejemplo de identificación final obtenida a partir de experimentos MS/MS (XIV, PICS) de los metabolitos significativos antes y después de la adición de los estándares de referencia disponibles en las muestras biológicas de plasma.

En la **Tabla 5.11** se presentan los 19 grupos de iones discriminantes cada uno correspondiente a un distinto metabolito (incluyendo aductos, isótopos, etc.). Tres biomarcadores fueron identificados con nivel I de evidencia, según los criterios propuestos por la *Metabolomics Standards Initiative* (Dunn, et al. 2013; Sumner, et al. 2007), siendo uno de ellos un metabolito derivado de los compuestos fenólicos presentes en las nueces (urolitina A glucurónido) el cual es producto del co-metabolismo entre la microbiota intestinal y el huésped y, dos metabolitos de

ácidos dicarboxílicos de cadena media par (ácido dodecanodioico y ácido sebácico). A pesar de que algunas de las señales de masa detectadas como discriminantes coincidieron con las masas teóricas conocidas en bibliotecas químicas disponibles en internet, la baja intensidad impidió la realización de experimentos MS/MS necesarios para la confirmación de su identificación (en la **Tabla 5.11** se reportan como biomarcadores no identificados).

Tabla 5.11. Biomarcadores identificados y no identificados asociados con la exposición a frutos secos en el metaboloma plasmático de sujetos con síndrome metabólico^a.

Número de agrupación	RT (min)	Masa detectada (m/z) ^b	Mass teórica (m/z)	Error (mDa)	Asignación	Biomarcador potencial	Cambio ^c	Valor VIP ^d		Nivel de evidencia ^e
								T0 vs NU_T3	CT_T3 vs NU_T3	
<i>Biomarcador derivado de la microbiota y del metabolismo de fase II de los compuestos fenólicos de las nueces</i>										
1	5.61	403.0734	403.0671	-6.35	[M - H] ⁻	Urolitina A glucurónido	↑	4.47	4.54	I
<i>Biomarcadores del metabolismo de los ácidos grasos (ácidos dicarboxílicos de cadena media y par)</i>										
2	6.16	403.2377	403.2337	-4	[2M - H] ⁻	Ácido sebácico	↓	2.89	2.33	I
	6.18	201.1081	201.1132	5.1	[M - H] ⁻		↓	1.52	1.76	
3	6.49	229.1352	229.1445	9.3	[M - H] ⁻	Ácido dodecanodioico	↑	2.61	2.01	I
<i>Biomarcadores no identificados</i>										
4	0.5	352.0023			[M - H] ⁻		↓	3.76	3.59	
5	5.69	145.0519			[M - H] ⁻		↑	3.42	2.20	
6	0.60	583.1809			[M - H] ⁻		↑	3.03	2.44	
7	0.47	605.1648			[M - H] ⁻		↑	3.00	2.04	
8	7.86	253.2187			[M - H] ⁻		↑	2.92	2.12	
9	6.63	194.0835			[M - H] ⁻		↓	2.73	2.11	
10	6.23	527.2204			[M - H] ⁻		↓	2.73	2.72	
11	6.41	421.1493			[M - H] ⁻		↓	2.71	2.86	
	6.41	422.1508			¹³ C [M - H] ⁻		↓	2.64	2.76	
	6.41	423.1468			² ¹³ C [M - H] ⁻		↓	2.73	2.77	
	6.43	424.1482			³ ¹³ C [M - H] ⁻		↓	2.74	2.85	
12	6.41	807.3249			[M - H] ⁻		↓	2.55	2.48	
	6.41	808.3294			¹³ C [M - H] ⁻		↓	2.17	2.29	
13	0.6	354.9976			[M - H] ⁻		↑	2.45	2.77	
14	0.6	347.0152			¹³ C [M - H] ⁻		↑	2.27	2.31	
15	4.47	217.0284			[M - H] ⁻		↑	2.20	2.60	
16	6.38	607.2990			[M - H] ⁻		↓	2.19	2.56	
17	6.43	475.2045			[M - H] ⁻		↓	2.04	2.25	
18	5.83	318.1196			¹³ C [M - H] ⁻		↑	2.04	2.11	
19	5.78	175.6309			[M - H] ⁻		↑	2.01	2.94	

^a Las agrupaciones se enumeran según el valor decreciente de VIP; todas las *señales de masa* propuestos cumplen los criterios de significación propuestos ($|p| \geq 0.05$ y $|p(\text{corr})| \geq 0.5$). ^b Datos obtenidos por LC-ESI-MS-q-ToF. ^c Dirección de los cambios observados tras el consumo de frutos secos (ver Figura 5.7). ^d Calculado a partir de los modelos OSC-PLS-DA a 2 clases (M2 y M3). ^e De acuerdo con la *Metabolomics Standards Initiative* (Dunn, et al. 2013; Sumner, et al. 2007).

5.2.3 Asociación entre biomarcadores de ingesta y estado clínico

Con fin de evaluar las posibles asociaciones entre parámetros clínicos y biomarcadores de exposición a los frutos secos, diferentes análisis bioestadísticos fueron aplicados en la interpretación de esta información biológica y clínica. En un

primer momento, curvas ROC fueron utilizadas en la evaluación del desempeño de los biomarcadores identificados con nivel de evidencia I (ver **Tabla 5.11**) en función a la capacidad de predicción del consumo de frutos secos. Para desarrollar este objetivo, curvas ROC fueron construidas con el conjunto de datos de la matriz OSC-filtrada y, se estimó el área bajo la curva (AUC [IC 95%]) a través del paquete de pRoc, RStudio 3.0.1 Inc. (Robin, et al. 2011; Xia, et al. 2013). Las curvas ROC son ampliamente consideradas como el método más objetivo y estadísticamente válido para la evaluación del desempeño de biomarcadores en estudios de metabolómica (Xia, et al. 2013). La urolitina A glucurónido y el ácido dodecanodioico, metabolitos identificados como nivel 1, presentaron una buena capacidad de predicción del consumo de frutos secos (AUC = 89.6% [80.8 – 98.4] y AUC = 83.7% [74.5 – 92.9], respectivamente (ver **Figura 5.11**).

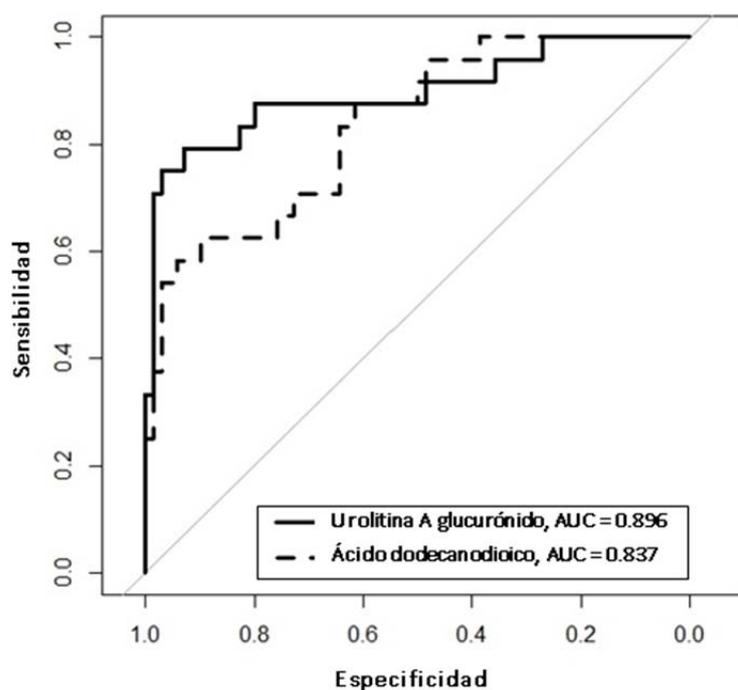


Figura 5.11. Análisis de curva ROC de urolitina A glucurónido y ácido dodecanodioico (biomarcadores de exposición a frutos secos, NU_T3 vs T0 y CT_T3).

De acuerdo con este análisis, la urolitina A glucurónido es el biomarcador plasmático más sensible y específico a la ingesta de polifenoles provenientes de las nueces. Este resultado, en concordancia con observaciones recientes evidenciadas en estudios de intervención y de cohortes (Garcia-Aloy, et al. 2014; Tulipani, et al. 2011), sugirió que una matriz biológica como el plasma, recogido al menos 12

horas desde la última ingesta, puede ser una valiosa alternativa al cuestionario dietético y a la huella metabólica obtenida de la orina para evaluación del consumo de alimentos ricos en elagitaninos. Interesantemente, este biomarcador fue detectado en el metaboloma plasmático de un sujeto del grupo de intervención a tiempo basal (NU_T0), al verificar el registro dietético se confirmó un consumo de 15 g de nueces y 5 g de avellanas, en coherencia con resultados reportados previamente del metaboloma urinario (Tulipani, et al. 2011) (ver **Figura 5.12**).

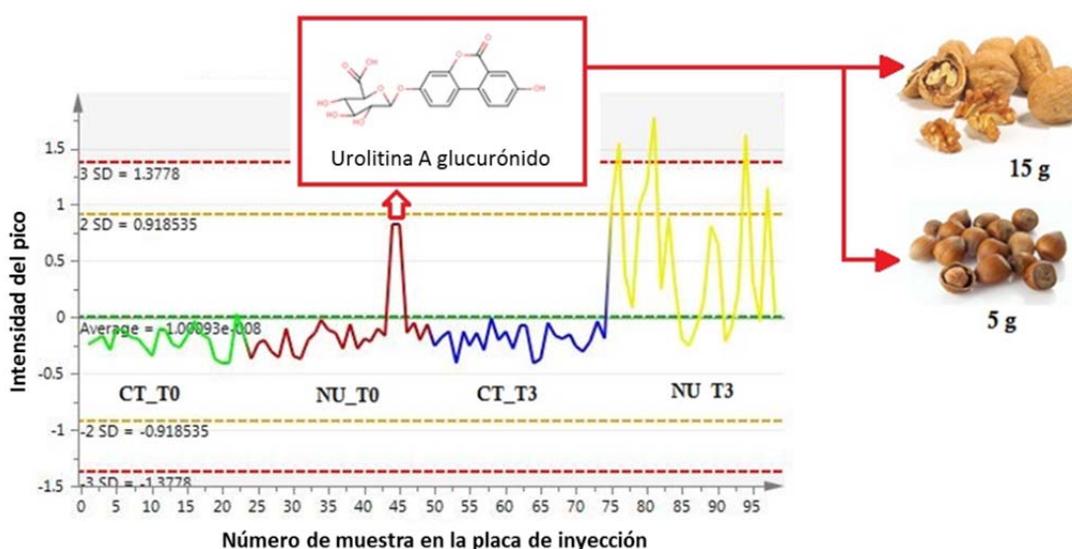


Figura 5.12. *Trend plot* de urolitina A glucuronido detectada en el metaboloma plasmático. Altas intensidades corresponden a mayores niveles de urolitina A glucuronido circulante en el plasma.

A través de correlaciones de Pearson se establecieron asociaciones entre los niveles plasmáticos de urolitina A glucuronido después de las 12 semanas de ingesta de frutos secos y, los componentes clínicos asociados al síndrome metabólico, al inicio del estudio y después de la intervención (ver **Tabla 5.12** y **Figura 5.13**).

Tabla 5.12. Coeficiente de correlación de *Pearson* entre los cambios en los niveles plasmáticos de urolitina A glucurónido y los cinco componentes clínicos del síndrome metabólico (circunferencia de la cintura, glucosa en ayunas, c-HDL, triglicéridos y presión arterial elevada -sistólica y diastólica-) al inicio del estudio y después de intervención con frutos secos.

Variable			Todos los sujetos		Mujeres	Hombres
			r	r (ajustada)	(n = 9)	(n = 15)
Adiposidad	Circunferencia de cintura (cm)	Basal	-0.550**	-0.359 ^a	-0.517	-0.272
		Post-intervención	0.184	0.128 ^a	0.406	-0.056
	Índice cintura/cadera	Basal	-0.409*	0.041 ^a	-0.033	0.137
		Post-intervención	0.147	0.048 ^a	0.266	-0.045
	IMC (kg/m ²)	Basal	-0.228	-0.383 ^a	-0.376	-0.400
		Post-intervención	0.213	0.243 ^a	0.482	-0.018
Grasa corporal (%)	Basal	0.222	-0.369 ^a	-0.309	-0.445	
	Post-intervención	0.456*	0.309 ^a	0.576	0.224	
Control glucémico	Glucosa en ayunas (mmol/L)	Basal	-0.254	-0.202 ^a	-0.272	-0.184
		Post-intervención	0.272	0.322 ^a	0.396	0.333
	Insulina en ayunas (μU/mL)	Basal	-0.414*	-0.277 ^a	-0.501	-0.128
		Post-intervención	0.205	0.084 ^a	0.2	-0.021
	HOMA-IR	Basal	-0.417*	-0.265 ^a	-0.522	-0.115
Post-intervención		0.226	0.094 ^a	0.199	0.013	
Lipidemia	c-HDL (mmol/L)	Basal	0.366	0.181 ^b	0.402	0.103
		Post-intervención	-0.312	-0.208 ^b	-0.298	-0.011
	Triglicéridos (mmol/L)	Basal	-0.188	-0.090 ^b	-0.399	0.024
		Post-intervención	0.108	0.143 ^b	0.265	-0.115
Presión arterial	Sistólica (mm Hg)	Basal	0.126	0.184 ^b	0.321	-0.065
		Post-intervención	-0.062	0.186 ^b	0.144	0.246
	Diastólica (mm Hg)	Basal	0.242	0.304 ^b	0.181	0.432
		Post-intervención	0.092	0.032 ^b	0.138	-0.055

Sin sesgo de distribución de datos. ^a Análisis ajustado por sexo. ^b Análisis ajustado por sexo y tratamiento farmacológico específico. Correlaciones significativamente estadísticas: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Las correlaciones oscilaron entre 0.576 (máxima correlación directa) a -0.550 (máxima correlación indirecta). Se establecieron correlaciones inversamente significativas entre los niveles plasmáticos de urolitina A glucurónido, tras la exposición a frutos secos y, ciertos criterios clave de síndrome metabólico como adiposidad abdominal (circunferencia de la cintura: $r = -0.550$, $p = 0.005$; Índice cintura-cadera: $r = -0.409$, $p = 0.047$) y deterioro del control glucémico (insulina en ayunas: $r = -0.414$, $p = 0.049$; HOMA-IR: $r = -0.417$, $p = 0.048$) al inicio del estudio. El análisis de regresión lineal fue desarrollado para comprobar la interacción con

la variable sexo (r ajustada). Donde, criterios como circunferencia de la cintura, $r = -0.359$, $p = 0.241$; índice cintura-cadera, $r = 0.041$, $p = 0.865$; insulina en ayunas, $r = -0.202$, $p = 0.229$; y HOMA-IR, $r = -0.265$, $p = 0.185$ no presentan interacción con la variable sexo. Correlaciones negativas también fueron identificadas en otros parámetros clínicos como índice de masa corporal, glucosa en ayunas y porcentaje de grasa corporal, aunque no alcanzaron significación estadística.

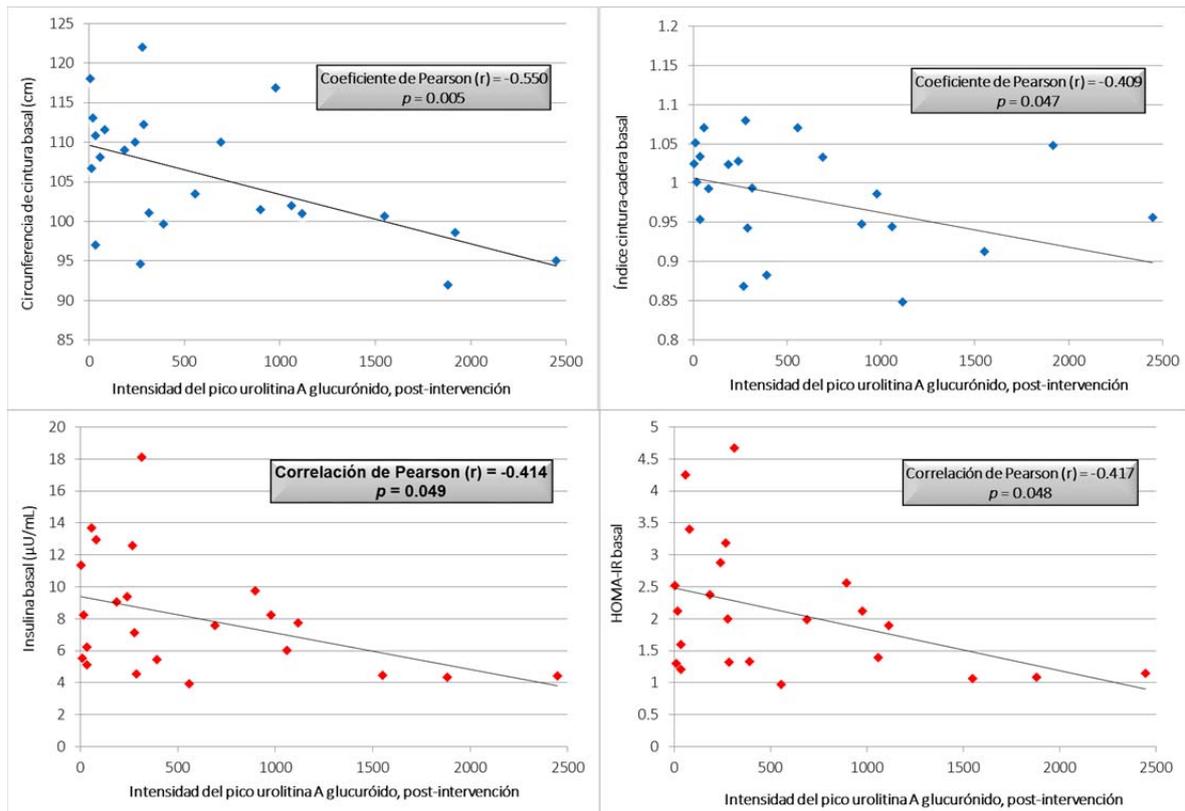


Figura 5.13. Regresiones lineales entre urolitina A glucurónico identificada en el metaboloma plasmático y obesidad abdominal (circunferencia de cintura e índice cintura-cadera) y desequilibrio de control glucémico (insulina en ayunas y HOMA-IR) a tiempo basal, criterios clave asociados al síndrome metabólico.

Por otra parte, a pesar de la corta duración de la intervención dietética, dos de los veinticuatro sujetos participantes en el grupo de intervención, evidenciaron reversión de síndrome metabólico (ver **Tabla 5.5**) y, los cambios en el porcentaje de grasa corporal, después de la ingesta de frutos secos, se correlacionaron positivamente con los niveles de urolitina A glucurónico en el plasma ($r = 0.456$, $p = 0.025$). Estas tendencias de correlaciones similares persistieron luego de ajustar por sexo y medicamentos. Curiosamente, se observaron coeficientes de correlación más altos en mujeres ($n = 9$) que en hombres ($n = 15$), sin embargo, debido a la

falta de significación estadística estos resultados puede interpretarse por el tamaño reducido de la muestra en relación a la potencia estadística. Por otra parte, urolitina A glucurónido no mostró correlaciones similares con otros factores de riesgo cardiometabólico, como hiperlipidemia e hipertensión.

La posible asociación entre los niveles plasmáticos de ácido dodecanodioico y los criterios diagnósticos de síndrome metabólico, al inicio del estudio y después del período de ingesta de frutos secos, también fueron analizados. Aunque no se observaron variaciones significativas en general, efectos específicos asociados al sexo también fueron evidenciados (ver **Tabla 5.13**).

Tabla 5.13. Coeficiente de correlación de *Pearson* entre los cambios en los niveles plasmáticos de ácido dodecanodioico y los cinco componentes clínicos del síndrome metabólico al inicio del estudio y después de intervención con frutos secos.

Variable			Todos los sujetos		Mujeres (n = 9)	Hombres (n = 15)
			r	r (ajustada)		
Adiposidad	Circunferencia de cintura (cm)	Basal	0.128	0.381 ^a	0.766*	-0.065
		Post-intervención	0.282	0.253 ^a	0.305	0.443
	Índice cintura/cadera	Basal	-0.127	0.213 ^a	0.339	-0.233
		Post-intervención	0.132	0.076 ^a	-0.001	0.326
	IMC (kg/m ²)	Basal	0.156	0.109 ^a	0.188	-0.013
		Post-intervención	0.216	0.223 ^a	0.262	0.243
Grasa corporal (%)	Basal	0.284	0.088 ^a	0.114	0.174	
	Post-intervención	0.271	0.171 ^a	0.043	0.662**	
Control glucémico	Glucosa en ayunas (mmol/L)	Basal	0.251	0.317 ^a	0.784*	-0.114
		Post-intervención	0.233	0.246 ^a	0.523	0.192
	Insulina en ayunas (μU/mL)	Basal	-0.229	-0.140 ^a	-0.322	0.094
		Post-intervención	0.266	0.213 ^a	0.382	0.105
	HOMA-IR	Basal	-0.192	-0.093 ^a	-0.237	0.078
Post-intervención	0.291	0.234 ^a	0.434	0.114		
Lipidemia	c-HDL (mmol/L)	Basal	-0.05	-0.095 ^b	-0.178	-0.187
		Post-intervención	-0.346	-0.285 ^b	-0.479	0.075
	Triglicéridos (mmol/L)	Basal	0.11	0.140 ^b	0.37	-0.148
		Post-intervención	0.312	0.254 ^b	0.423	0.292
Presión arterial	Sistólica (mm Hg)	Basal	-0.069	0.027 ^b	-0.089	0.018
		Post-intervención	0.031	0.142 ^b	0.381	-0.435
	Diastólica (mm Hg)	Basal	0.239	0.341 ^b	0.274	0.287
		Post-intervención	0.352	0.284 ^b	0.56	-0.271

Sin sesgo de distribución de datos. ^a Análisis ajustado por sexo. ^b Análisis ajustado por sexo y medicamento. Correlaciones significativamente estadísticas: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

RESEARCH ARTICLE

Plasma metabolomic biomarkers of mixed nuts exposure inversely correlate with severity of metabolic syndrome

Ximena Mora-Cubillos¹, Sara Tulipani^{1,2}, Mar Garcia-Aloy¹, Mònica Bulló^{3,4},
Francisco J Tinahones^{2,4} and Cristina Andres-Lacueva¹

¹ Biomarkers & Nutrimetabolomic Lab, Department of Nutrition and Food Science, XaRTA, INSA, Campus Torribera, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

² Biomedical Research Institute (IBIMA), Service of Endocrinology and Nutrition, Málaga Hospital Complex (Virgen de la Victoria), Campus de Teatinos s/n, University of Málaga, Málaga, Spain

³ Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

⁴ CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Scope: To identify the most discriminant dietary biomarkers of nuts exposure in subjects with metabolic syndrome (MetS), and investigate the potential association between exposure and the severity of the MetS diagnostic traits.

Methods and results: We applied the untargeted LC-ESI-qToF-MS-driven metabolomic workflow to explore the changes occurring in the plasma metabolome of MetS subjects following 12-wk intake of mixed nuts (30 g/d; nuts versus control groups). Urolithin A glucuronide was the most discriminative biomarker of nuts exposure, showing the highest predictive capacity (area under the ROC curve = 89.6% [80.8–98.4]) despite the interindividual variation expected for a host-microbial cometabolite. Furthermore, the detection of urolithin A glucuronide in plasma showed significant inverse correlation with basal abdominal adiposity (waist circumference: $r = -0.550$, $p < 0.01$; waist-hip ratio: $r = -0.409$, $p < 0.05$) and impaired glycemic control (fasting insulin: $r = -0.414$, $p < 0.05$; HOMA-IR: $r = -0.417$, $p < 0.05$). Significant changes in medium-chain dicarboxylic acids, recognized as alternative energy substrates that are particularly relevant in the case of glycemic control impairment, were also associated with nut consumption.

Conclusion: Higher levels of urolithin A glucuronide are reported in subjects with less severe MetS traits, especially in females. We believe that this inverse correlation may be related with profile of gut microbial dysbiosis, recently associated to subjects with MetS.

Keywords:

Adiposity / Biomarkers of nuts / Gut microbiota / Metabolomics / Plasma human



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Correspondence: Dr. Cristina Andres-Lacueva
E-mail: candres@ub.edu

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; AUC, area under the curve; c-HDL, HDL cholesterol; CT, control group; DPB, diastolic pressure blood; ETs, ellagitannins; HOMA-IR, homeostatic model assessment-insulin resistant; MetS, metabolic syndrome; NU, nuts intake group; OSC, orthogonal signal correction; OSC-PLS-DA, partial least squares discriminant analysis with OSC; QC, quality control; ROC, receiver operating characteristic curve; R^2X , goodness-of-fit parameter; R^2Y , proportion of the variance of the response variable that is explained by the model; SPB, systolic pressure blood; T₀, baseline time; T₃, after 12 wk of nuts consumption; VIP, variable importance projection

1 Introduction

Tree nuts such as walnuts (*Juglans regia* L.), almonds (*Prunus dulcis* [Mill.] D.A. Webb), and hazelnuts (*Corylus avellana* L.) are key healthy components of several dietary patterns such as the Mediterranean Diet [1] and the New Nordic Diet [2], and are also emphasized in the recently updated Dietary Guidelines for Americans [3]. The protective effects of nuts consumption have been particularly evidenced against the constellation of interrelated metabolic complications that characterize the metabolic syndrome (MetS) [4]. Both clinical [5] and epidemiological studies [6–8] have associated nuts intake with improvements in the diagnostic parameters of MetS, namely

Received: July 10, 2015
Revised: September 8, 2015
Accepted: September 10, 2015

abdominal obesity [9], hyperglycemia [3], hypertension [10], and dyslipidemia, and with the reduction of cardiovascular disease [1, 11–13] through reduction of inflammation and oxidative stress, and enhancement of the endothelial function [14, 15].

Despite the huge amount of literature in this regard, the nuts bioactives are not fully characterized, hence the need for hypothesis-generating research to identify unexplored mechanisms of nut exposure and effect. The implication in the observed health effects of minority components besides the well-known macro- and micronutrients contained in nuts (e.g. MUFAs and *n*-3/*n*-6 PUFAs, proteins rich in essential amino acids, vitamins, biogenic amines, and fiber) [4, 12] only attracted attention recently, as well as the role of diet and host-microbial interactions in the health outcomes. The intake of the most abundant polyphenols in walnuts, namely ellagitannins (ETs) [16] has particularly been associated with improvements of metabolic disorders, hence acquiring a growing interest in the food industry as potential functional ingredients [17]. However, due to their high molecular weight, ETs require gut microbial biotransformation to be metabolized into smaller compounds (uroolithins) absorbable in the intestine, and the necessary enzymatic machinery does not seem to be ubiquitous among bacterial strains [18, 19]. In turn, diagnostic components of MetS such as obesity and impaired glycemic control are known to be associated with alterations in the gut microbiota composition (dysbiosis) [20], thus the urolithin-producing capacity may be affected by the presence of these cardiometabolic risk factors, thereby impacting on the bioavailability of bioactives from nuts polyphenols.

Nutritional metabolomics is a highly relevant research domain of modern nutrition [21] since, mapping the metabolic fate of food components in biological specimens, it provides more objective measures of food exposure (biomarker discovery) and their effects in the prevention and reduction of disease risk [22]. Due to its data-driven approach, untargeted metabolomics especially offers a valuable tool for identifying new nutritional biomarkers without the need for a starting hypothesis, hence helping to decipher unexplored mechanisms of action and so linking dietary exposure to clinical outcomes [23]. Although the application of nutritional metabolomics has been focused so far to the analysis of the urinary metabolome [24], blood plasma is a particularly informative biosample. Blood in fact gives a snapshot of what is actually transported at the systemic level to and from tissues, even hours following the last intake (permanence in circulation and bioaccessibility to body compartments) [25], thereby sustaining the potential bioactivity of the dietary components (association between exogenous and endogenous diet-related changes) [23, 26].

We recently analyzed the changes occurring in the urinary metabolome after a 12-wk regular consumption of mixed nuts in subjects with diagnosed MetS [16, 27]. To go forward with the hypothesis generated by the previous studies, here we aimed to identify the most discriminant biomarkers of nuts exposure still circulating in 12 h fasted plasma, and then

investigate the potential direct or inverse association between exposure and the severity of the MetS diagnostic traits, at baseline and post-intervention.

2 Materials and methods

2.1 Subjects in study

Fifty male and female volunteers aged between 18 and 65 years with at least three MetS risk factors as defined by the Adult Treatment Panel III [28, 29] were recruited in a prospective, randomized, controlled, parallel-designed, 12-wk interventional feeding trial (ISRCTN36468613). The design of the trial has been reported in detail previously [14, 15]. Briefly, participants were stratified by sex and age (≤ 50 or > 50 years) and then randomly assigned to the control group (CT) or the nuts intake group (NU) intervention groups. Both groups received the same qualitative dietary recommendations according to the AHA dietary guidelines [30] in order to follow a low-fat diet. The NU group received a daily supplement of 30 g of raw mixed nuts with skin (15 g of walnuts, 7.5 g of almonds, and 7.5 g of hazelnuts), while the CT was recommended to avoid consumption of nuts. Information about the food intake of the subjects and their adherence to the interventions was collected by 3-day food records at baseline and in control visits, namely every 4 wk during the trial, and energy, nutrient, and polyphenol intakes were calculated as previously described [16]. Good adherence to the dietary recommendations was reported for both intervention groups [14, 15].

Fasting blood samples were collected at baseline time (T0) and after 12 wk of nuts consumption (T3) and centrifuged at 2500 rpm for 10 min at 4°C. For metabolomic analysis, plasma EDTA aliquots were separated and stored at -80°C until further analysis. Three subjects were excluded from the metabolomic analysis due to evidence of hemolysis in the stored plasma (final sampling: $n = 23$ CT, $n = 24$ NU group).

2.1.1 Standards and reagents

α -Hydroxyisobutyric acid, gallic acid, *l*-phenylalanine, *l*-tryptophan, (–)-epicatechin, syringic acid, sebacic acid, dodecanedioic acid, glycochenodeoxycholic acid, 1-*O*-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, glycocholic acid-(glycyl- $1-^{13}\text{C}$) monohydrate, indole-3-acetic- $2,2\text{-d}_2$ acid, acetyl- d_3 -*l*-carnitine hydrochloride, and reference human plasma were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), 4-hydroxyhippuric acid from PhytoLab GmbH & Co. KG (Germany) and naringenin from Extrasynthèse (Genay, France). Urolithin A glucuronide was chemically synthesized by KyloLab S.A. (Murcia, Spain) [27]. UHPLC-MS-grade methanol, acetone, formic acid, and HPLC-grade acetonitrile were purchased from Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain). Ultra-pure water (Milli-Q) was obtained from a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, MA). An aqueous standard

mix (QC2) including metabolites representative of the plasma metabolome chemical variety was prepared (details in Supporting Information Table 1). Aqueous solutions of isotopically labeled and unlabeled compounds were also prepared for use as internal standard (glycocholic acid-(glycyl- ^{13}C) monohydrate and 1-*O*-stearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, 25 ppm) and external standard mixtures (indole-3-acetic-2,2- d_2 acid and acetyl- d_3 -*L*-carnitine hydrochloride, 25 ppm), during sample extraction.

2.1.2 Sample extraction and data acquisition

Plasma samples (50 μL) were extracted through in-plate deproteinization by acidic solvent precipitation (acetonitrile, 1% formic acid) followed by phospholipid SPE-mediated removal (Ostro, Waters), according to our previously published protocol [31, 32]. The extracts were analyzed by an LC-ESI-qToF-MS-driven untargeted metabolomic pipeline (Agilent 1200 Series Rapid Resolution HPLC system) coupled to a QSTAR Elite System mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Framingham, MA, USA) in negative ionization mode (70–850 m/z). Data were acquired using Analyst QS 2.0 software (AB Sciex, Toronto, Ontario, CA, USA). Three types of quality control (QC) were included in the injection plate design to check for the analytical quality grade: QC1, Milli-Q water samples; QC2, aqueous solution of a standard metabolite mix (5 ppm final standard concentration); QC3, randomly selected biological samples reinjected in opposite positions within each batch. Details of analytical protocol are given in Supporting Information Tables 1 and 2.

2.1.3 Data analysis and metabolite identification

Mass feature extraction by peak finding and alignment was carried out by using MarkerView 1.2.1 software (AB Sciex), as detailed in Supporting Information Table 3. Prior to multivariate analyses, the dataset was filtered out to remove any ions that did not appear in more than 35% of the samples of each class separately [33]. Data were then log-transformed (to improve normality) and Pareto scaled [34]. The differences in the plasma metabolome due to the "diet" (NU versus CT) and "time of collection" factors (T0 versus T3) were explored in the orthogonal signal correction-filtered (OSC-filtered) dataset through a partial least squares discriminant analysis (PLS-DA; SIMCA 13.0 software, Umetrics, Umeå, Sweden). The predictive ability of the PLS models was evaluated through the goodness-of-fit parameter (R^2X), proportion of the variance of the response variable that is explained by the model (R^2Y), cross validation, and permutation test ($n = 200$; plot and CV ANOVA). As a final quality test, the whole dataset was randomly split into five equal-size subsamples (20% of samples each), four of which were used as training set whereas the remaining were used as validation set. This process was repeated five times, each subsample being

used as the validation set at least once, and the correctly classified individuals in each validation set (%) were calculated (Supporting Information Table 4). The importance of mass features in the discrimination among classes was visualized by plotting the variable importance projection (VIP) values. To avoid false positives, the significant mass features explaining the class separation were selected by combining the VIP cut-off (VIP ≥ 2), the weight (p) of each metabolite within the statistical model ($|p| \geq 0.05$) and its correlation with the modeled class designation ($|p(\text{corr})| \geq 0.5$) as previously described [27], and then submitted to the metabolite identification procedure. First, a two-way hierarchical cluster analysis based on Pearson correlation and Ward's distance method was performed to determine eventual clusters of mass features originating from the same metabolite (i.e. in-source molecular fragments, adducts, ^{13}C isotopes) and so reduce the queried masses (PermutMatrix 1.9.3 software). Plausible identification hypotheses were then generated (MAIT R package, RStudio 3.0.1 Inc. [35, 36]) by matching experimental mass clusters with both in-house and web-accessible mass spectral databases [37–39] (± 10 mDa mass error tolerance). Identity confirmation was finally carried out by matching peak chromatographic and MS responses (extracted ion chromatogram, product ion scan) to those of commercial reference standards, when available, spiked in Milli-Q water and plasma (50 ppb final concentration). Finally, the performance of the level 1 identified metabolites (Metabolomics Standards Initiative criteria, [40]) in discriminating nuts exposure was evaluated by constructing receiver operating characteristic curves (ROCs) on the OSC-filtered dataset, and estimating the area under the curve (AUC [95% CI]) values (pRoc R package, RStudio 3.0.1 Inc.) [41, 42].

2.2 Biomarker performance and association with MetS traits

After checking for data distribution normality, Pearson's correlation coefficients (r) were calculated between plasma metabolite levels (peak area) and anthropometric and laboratory measures of MetS traits, (SPSS 21.0 software, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Pearson's correlations were performed with dataset at baseline and after the intervention (postintervention). Variables were grouped into four main categories related to cardiometabolic risk (adiposity, glycemic control, lipidemia, and blood pressure measures): (i) Adiposity markers: waist circumference (cm), BMI (calculated as weight in $\text{kg}/\text{height}^2$ in m^2), waist-hip index and body fat (%); (ii) glycemic control markers: fasting glucose (mmol/L), fasting insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$), and HOMA-IR; (iii) blood pressure markers: diastolic and systolic blood pressure (mm Hg); (iv) blood lipid markers: HDL cholesterol (c-HDL) and triglycerides (mmol/L). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Table 1. Summary of parameters for assessing the OSC-PLS-DA modeling quality

Model ^{a)}	Number of sample classes	Number ^{b)}	R ² X(cum) ^{c)}	R ² Y(cum) ^{c)}	Q ² (cum) ^{c)}	R intercept ^{d)}	Q intercept ^{d)}	p ^{e)}
1	3 (T0 versus CT_T3 versus NU_T3)	2	0.057	0.886	0.669	0.562	−0.223	8.92E-35
2	2 (T0 versus NU_T3)	1	0.040	0.942	0.744	0.645	−0.147	1.83E-21
3	2 (CT_T3 versus NU_T3)	1	0.047	0.928	0.621	0.709	−0.152	2.07E-10

a) In model, the generation of the OSC filters removed 11 and eight components, respectively (Eigenvalue > 2), maintaining 43% non-orthogonal variation in the original dataset.

b) Number of components selected.

c) R²X(cum) and R²Y(cum) are the cumulative modeled variation in X and Y matrix, respectively, and Q²(cum) is the cumulative predicted variation in Y matrix.

d) Obtained after a permutation test ($n = 200$).

e) Value from ANOVA based on the cross-validated predictive residuals. The models were considered significant value with $p < 0.001$.

3 Results and discussion

3.1 Data acquisition quality

The extraction reproducibility and the LC-MS analytical stability during data acquisition were first confirmed by monitoring the internal standard and external standard mixtures peak intensity in the plasma samples over time (CV < 1% across the analysis), with no need for data normalization being noticed. As shown in Supporting Information Tables 2 and 3, the run-to-run repeatability of RT and mass accuracies of the QC2 standard metabolite components across the whole dataset met the quality criteria proposed for metabolomic analysis protocol (retention time shifts ≤ 0.05 min, mass accuracy deviations < 10 mDa), and the signal intensity variation was satisfactory (peak areas CV < 20%) except for one metabolite with a very low response to ionization [32, 34]. In addition, principal components analysis was used to display the classification of plasma samples. Details are given in Supporting Information Fig. 1.

3.2 Plasma metabolomic biomarkers of nut exposure

The OSC filter applied to the processed dataset removed 11 components, maintaining the 43% non-orthogonal variation of the original dataset. After confirming the absence of significant metabolomic differences between the two intervention groups at baseline, a three-class model was first built to assess the presence of significant variation within the plasma metabolome at baseline and postintervention (Model 1: T0 versus CT_T3 versus NU_T3 classes). Then, pairwise discriminations between the NU_T3 class and, alternatively, the CT_T3 and T0 classes were carried out and the information resulting from the two models merged, in order to discriminate mass features uniquely up- and downregulated in the NU group, following the intervention (Model 2: T0 versus NU_T3; Model 3: CT_T3 versus NU_T3). The parameters employed to assess the partial least squares discriminant analysis

with OSC (OSC-PLS-DA) modeling quality are summarized in Table 1 and in Supporting Information Table 4.

Following the 12 wk regular administration of mixed nuts, the plasma metabolome of the control (CT_T3) and nuts (NU_T3) groups differed markedly between them and in respect to the baseline samples (Fig. 1). A total of 23 mass features were responsible for the clear variation in the metabolic fingerprints following nut intake (Fig. 2), the individual mass features grouped into 19 ion clusters (including adducts, isotopes, etc.) corresponding to distinct metabolites (Table 2). Level 1 identification was obtained for three of them, namely a marker of gut microbial-host cometabolism of nut phenolics (urolithin A glucuronide, upregulated) and two medium-chain, even-numbered dicarboxylic acids (dodecanedioic acid and sebacic acid, up- and downregulated, respectively). For the latter, the most significant mass feature of the ion cluster corresponded to the dimeric form of the compound ([2M-H][−], $m/z = 403.2377$) probably generated in source and coeluting with the monomer ([M-H][−], $m/z = 201.1132$). In all cases, the final identification was obtained by overlapping the chromatographic and MS response (extracted ion chromatogram, product ion scan) of the metabolite obtained before and after spiking plasma with the commercially available reference standards (Supporting Information Fig. 2). Although several other mass features matched with known theoretical masses (chemical libraries available online,) the low intensity prevented to successfully perform MS/MS experiments, necessary for identification (unidentified metabolites).

3.3 Biomarkers of gut microbial-host cometabolism of nut polyphenols

Nuts are rich sources of nonubiquitous classes of polyphenols, namely hydrolyzable tannins (i.e. ETs) and condensed tannins (i.e. proanthocyanidins in hazelnuts and almonds), which contribute to the peculiar composition of these fruits and possibly to their health benefits [16, 17]. Walnuts, in particular, are considered a major source of ETs in the

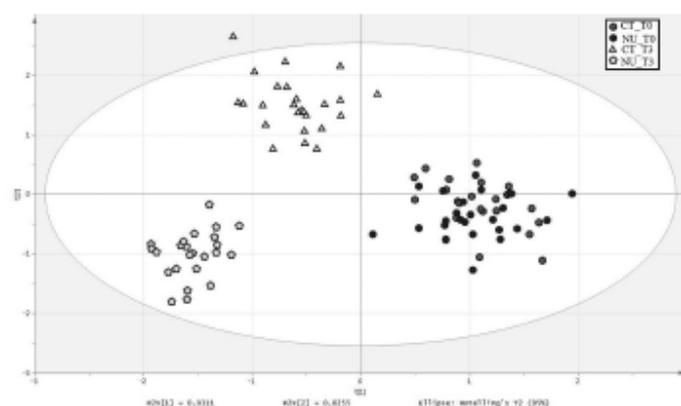


Figure 1. OSC-PLS-DA score plot (Model 1). Baseline samples (CT_T0 and NU_T0) are differently colored to visualize their overlapping only. Symbols indicate the type of plasma samples: Pentagons are samples from NU_T3; triangles are samples from CT_T3; and gray and black circles are samples from CT_T0 and NU_T0, respectively.

Mediterranean regions, where nut consumption per person is relatively high compared to other countries [43], in respect to other ET food sources such as berries and pomegranate. These high-molecular-weight polyphenols are known to be subjected to intense gut microbial biotransformation, which is responsible for the production of smaller and more easily absorbed bioactives currently implicated in the protection against cardiometabolic disease risk, namely urolithins (dibenzopyran-6-one derivatives with different hydroxyl substitutions) [18, 19].

In the present data-driven study, urolithin A glucuronide was the most discriminant marker of a 12-wk intake of nuts detected in the plasma metabolome (VIP > 4, Fig. 2). A range of urolithin structure conjugates have been described as the last products of gut microbial-human cometabolism of ETs (i.e. phase II metabolites of urolithin A, B, C, and D) and the most stable and detectable forms in different human specimens such as urine, plasma, feces, and tissue [44]. In plasma, conjugated urolithins have been previously described to circulate at concentrations ranging from

nanomolar to low micromolar (within the sensitivity range of ToF-MS analysis) [45–47], and urolithin A glucuronide was especially detected in plasma of a human volunteer after up to 20 h from walnut intake [46]. However, the majority of the available data were extrapolated from healthy subjects, with only two reported interventions on MetS individuals [46, 48]. Although different in its analytical nature (nonselective and nonspecific LC-MS methodology) and scope (data-driven and hypothesis-generating approach), our plasma metabolomic fingerprinting was in line with previous findings. Overall, our observed findings matched with changes detected in the whole urinary metabolome of the same subjects in the study, as recently described [27], despite the diversity of the (fasted) blood and excretory system physiology. In both biological matrices, in fact, phase II conjugates of urolithin A were the only products of ET metabolism detected through an untargeted approach, with urolithin A glucuronide being the most significant marker among them (Supporting Information Figure 3). Although a subgroup (~40%) of the MetS subjects in study revealed to produce other non-A urolithin conjugates

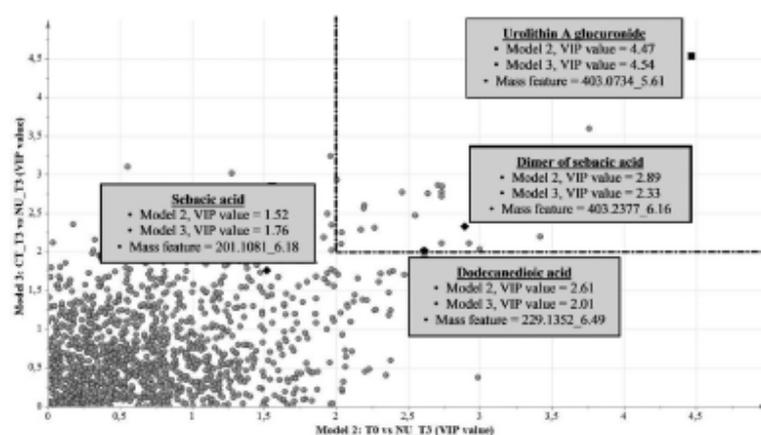


Figure 2. VIP value of Models T0 versus NU_T3 and CT_T3 versus NU_T3. Dotted lines represent discriminant biomarkers with VIP value ≥ 2 in both models. Urolithin A glucuronide, dodecanedioic acid, and sebacic acid (monomer and dimer) are examples of some discriminant biomarkers (black symbols).

Table 2. Identified and nonidentified metabolites associated with nuts intake in the plasma metabolome of MetS subjects^{a)}

Number of cluster	RT (min)	Detected mass (<i>m/z</i>) ^{b)}	Theoretical mass (<i>m/z</i>)	Error (mDa)	Assignment	Potential biomarker	Change ^{c)}	VIP value ^{d)}		Level of evidence ^{e)}
								T0 versus NU_T3	CT_T3 versus NU_T3	
<i>Biomarkers of microbial-derived and phase II metabolism of nuts phenolics</i>										
1	5.61	403.0734	403.0671	-6.35	[M-H] ⁻	Urolithin A glucuronide	↑	4.47	4.54	1
<i>Biomarkers of fatty acids metabolism (medium-chain, even-numbered dicarboxylic acids)</i>										
2	6.16	403.2377	403.2337	-4.00	[2M-H] ⁻	Sebacic acid	↓	2.89	2.33	1
	6.18	201.1081	201.1132	5.10	[M-H] ⁻		↓	1.52	1.76	
3	6.49	229.1352	229.1445	9.30	[M-H] ⁻	Dodecanedioic acid	↑	2.61	2.01	1
<i>Unidentified biomarkers</i>										
4	0.50	352.0023			[M-H] ⁻		↓	3.76	3.59	
5	5.69	145.0519			[M-H] ⁻		↑	3.42	2.20	
6	0.60	583.1809			[M-H] ⁻		↑	3.03	2.44	
7	0.47	605.1648			[M-H] ⁻		↑	3.00	2.04	
8	7.96	253.2187			[M-H] ⁻		↑	2.92	2.12	
9	6.63	194.0835			[M-H] ⁻		↓	2.73	2.11	
10	6.23	527.2204			[M-H] ⁻		↓	2.73	2.72	
11	6.41	421.1493			[M-H] ⁻		↓	2.71	2.86	
	6.41	422.1508			¹³ C[M-H] ⁻		↓	2.64	2.76	
	6.41	423.1468			2 ¹³ C[M-H] ⁻		↓	2.73	2.77	
	6.43	424.1482			3 ¹³ C[M-H] ⁻		↓	2.74	2.85	
12	6.41	807.3249			[M-H] ⁻		↓	2.55	2.48	
	6.41	808.3294			¹³ C[M-H] ⁻		↓	2.17	2.29	
13	0.60	354.9976			[M-H] ⁻		↑	2.45	2.77	
14	0.60	347.0152			¹³ C[M-H] ⁻		↑	2.27	2.31	
15	4.47	217.0284			[M-H] ⁻		↑	2.20	2.60	
16	6.38	607.2990			[M-H] ⁻		↓	2.19	2.56	
17	6.43	475.2045			[M-H] ⁻		↓	2.04	2.25	
18	5.83	317.1167			[M-H] ⁻		↑	1.99	1.74	
	5.83	318.1196			¹³ C[M-H] ⁻		↑	2.04	2.11	
19	5.78	175.6309			[M-H] ⁻		↑	2.01	2.94	

a) Clusters are listed according to the decreasing VIP value; all the proposed mass features met the significance criteria proposed ($p \geq 0.05$) and $|p(\text{corr})| \geq 0.5$).

b) Data obtained by LC-ESI-q-TOF-MS (see text for details).

c) Direction of changes observed following the nuts consumption.

d) Calculated from the two-class OSC-PLS-DA models M2 and M3.

e) According to Metabolomics Standards Initiative.

by applying targeted LC-MS/MS analysis (e.g. urolithin B metabolites) [16,44], the interindividual variation in the qualitative and quantitative occurrence of these further metabolites hampered them to rise to the role of potential exposure biomarkers, at least when evaluating the study population as a whole, and when applying untargeted metabolomics (non-selective and nonspecific analytical nature, data-driven, and hypothesis-generating approach).

3.4 Biomarkers of fatty acid metabolism

Dodecanedioic acid (C12) and sebacic acid (C10) were respectively up- and downregulated in fasting plasma following a 12-wk exposure to nut intake. The increase in plasma dodecanedioic acid was particularly in line with its increased urinary excretion recently observed [27]. Due to the known occurrence of dicarboxylic acids in some Mediterranean nuts including walnuts, almonds, and hazelnuts [27,49], dodecanedioic acid may reasonably be a direct biomarker of nuts intake. However, its endogenous origin from the ω - and β -oxidative

metabolism of MUFAs and PUFAs, highly contained in nuts, cannot be discarded [4, 12, 50] and could explain part of the health effects of nuts lipids [3, 51]. In any case, the biological relevance of its increased exposure following nut intake, particularly in subjects with metabolic impairment, may rely on its recognized role as an alternative energy substrate. Once available, in fact, dodecanedioic acid is promptly oxidized and, due to the intermediate biochemical and metabolic characteristics between free fatty acids and glucose, may supply succinyl-CoA at the end of its β -oxidation [50], providing an alternative entry into the tricarboxylic acid cycle and a mean of metabolic improvement [52,53]. The positive effects of dodecanedioic acid infusion have already been described, particularly in those clinical conditions characterized by altered glycemic control, and range from improved mitochondrial function efficiency to reduction of gluconeogenesis, improvement in glycogen synthesis, and significant increase in lipid oxidation, in turn leading to reduced body fat mass [52,54,55]. The decrease of sebacic acid, in contrast, was not reported previously and may result from an increased downstream or upstream metabolism, suggesting a possible alteration in the

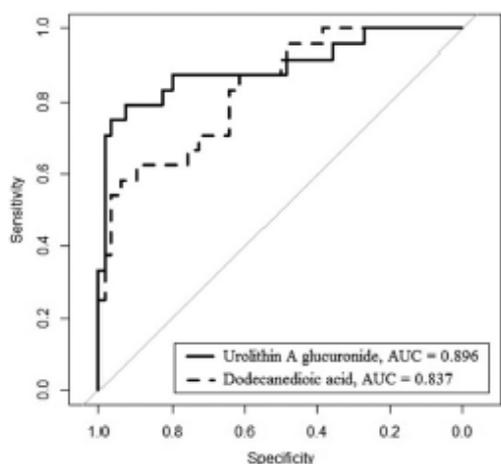


Figure 3. ROC analysis of urolithin A glucuronide and dodecanedioic acid (up-regulated biomarkers of nuts exposure, NU_T3 subjects versus T0 and CT_T3).

metabolism of ω -oxidation of fatty acids in the cytosol of the cells [56, 57]. Finally, no changes in other possible and more expected lipid markers of nuts intake, such as α -linolenic acid, were observed, in line with previous findings [27], possibly due to the nature of the analytical technique used [58]. Taken together, our data-driven approach would suggest the need to focus attention on “minor” components of the healthy lipid composition of nuts and their potential health effects, not considered so far to the best of our knowledge.

3.5 Nuts exposure: biomarker performance and association with clinical traits

ROCs are widely considered to be the most objective and statistically valid method for the evaluation of biomarker performance in metabolomics studies [41]. Both the upregulated metabolites identified in this study showed a good predictive capacity of nut consumption (AUC = 89.6% [80.8–98.4] and AUC = 83.7% [74.5–92.9]), respectively, for urolithin A glucuronide and dodecanedioic acid; Fig. 3). Urolithin A glucuronide was the most sensitive and specific plasma biomarker of nuts polyphenol intake. These findings are in agreement with recent observations from intervention and cohort studies [27, 59], and suggested how plasma collected at least 12 h from the last intake may be a valuable alternative to dietary survey and urine metabolic fingerprinting for assessing the consumption of ET-containing food.

The biological significance of urolithins has been extensively investigated in recent research, especially through *in vitro* experiments, suggesting anti-inflammatory, antiglycative, and selective antimicrobial or prebiotic effects [14, 45, 60]. Since they are the net result of a gut microbial and host inter-

action following nut intake, we, second, assessed whether the systemic exposure to urolithin A glucuronide was influenced by the MetS traits known to alter the intestinal microbiota. Table 3 and Supporting Information Fig. 4 show the association between the plasma levels of urolithin A glucuronide following the 12 wk of nut intake and the severity of the five clinical traits of MetS, at baseline and after the intervention (Pearson's correlation coefficient, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Correlations ranged from 0.576 (maximum direct correlation) to -0.55 (maximum indirect correlation). A significant inverse correlation was found between the levels of urolithin A glucuronide detected in plasma after nut intake and key parameters of abdominal adiposity (waist circumference: $r = -0.550$, $p = 0.005$; waist-hip ratio: $r = -0.409$, $p = 0.047$) and impaired glycemic control (fasting insulin: $r = -0.414$, $p = 0.049$; HOMA-IR: $r = -0.417$, $p = 0.048$) at baseline. Linear regression analysis was developed to check for interaction with sex variable (r adjusted). Waist circumference, $r = -0.359$, $p = 0.241$; waist-hip ratio, $r = 0.041$, $p = 0.865$; fasting insulin, $r = -0.202$, $p = 0.229$; and HOMA-IR, $r = -0.265$, $p = 0.185$ shows that there is no interaction with sex variable. The negative association persisted when testing the correlation with other clinical parameters (e.g. BMI, fasting glucose, percentage of body fat), although not reaching statistical significance. Furthermore, although the short duration of the dietary intervention allowed the complete remission of the syndrome in only two of the 24 subjects of the NU group (Supporting Information Table 5), the changes in fat percentage following the nut intake positively correlated with levels of urolithin A glucuronide in plasma ($r = 0.456$, $p = 0.025$). Similar correlation trends persisted after adjusting for sex and drug treatments. Interestingly, much higher correlation coefficients were observed in female ($n = 9$) than in male ($n = 15$) volunteers, when analyzing the sex response separately (Table 3), so that the lack of statistical significance should be interpreted in the context of the reduction of the sample size/statistical power in gender analysis (Supporting Information Fig. 4).

Urolithin A glucuronide did not show similar correlations with the other cardiometabolic risk factors, including hyperlipidemia and hypertension parameters.

These findings allow us to hypothesize that subjects with lower levels of abdominal obesity and insulin resistance may have a microbiota best suited to metabolizing phenolic compounds otherwise indigestible and unabsorbable, such as those derived from nut ETs, once exposed to a dietary challenge, therefore modulating their health impact.

Taken together, the observed associations would confirm the crucial role of the gut microbial community in modulating the production and bioavailability of bioactives from dietary polyphenols. Evidence suggests that the enzymatic machinery responsible for the bioconversion of ETs into urolithins may not be ubiquitously shared across the gut microbial community, but still little is known about the specific strains responsible for urolithin production [18, 19, 44]. Consequently, no data exist to date on the impact that the gut

Table 3. Pearson's rank correlation coefficient for correlation of changes in plasma levels of urolithin A glucuronide and the severity of the five clinical traits of MetS^a

Variable			All subjects		Female (n = 9)	Male (n = 15)
			r	r (adjusted)		
Adiposity	Waist circumference (cm)	Baseline	−0.550**	−0.359 ^b	−0.517	−0.272
		Post-intervention	0.184	0.128 ^b	0.406	−0.056
	Waist-hip ratio	Baseline	−0.409*	0.041 ^b	−0.033	0.137
		Post-intervention	0.147	0.048 ^b	0.266	−0.045
	BMI (kg/m ²)	Baseline	−0.228	−0.383 ^b	−0.376	−0.400
		Post-intervention	0.213	0.243 ^b	0.482	−0.018
Body fat (%)	Baseline	0.222	−0.369 ^b	−0.309	−0.445	
	Post-intervention	0.456*	0.309 ^b	0.576	0.224	
Glycemic control	Fasting glucose (mmol/L)	Baseline	−0.254	−0.202 ^b	−0.272	−0.184
		Post-intervention	0.272	0.322 ^b	0.396	0.333
	Insulin (μU/mL)	Baseline	−0.414*	−0.277 ^b	−0.501	−0.128
		Post-intervention	0.205	0.084 ^b	0.200	−0.021
	HOMA-IR	Baseline	−0.417*	−0.265 ^b	−0.522	−0.115
		Post-intervention	0.226	0.094 ^b	0.199	0.013
Lipidemia	c-HDL (mmol/L)	Baseline	0.366	0.181 ^c	0.402	0.103
		Post-intervention	−0.312	−0.208 ^c	−0.298	−0.011
	Triglycerides (mmol/L)	Baseline	−0.188	−0.090 ^c	−0.399	0.024
		Post-intervention	0.108	0.143 ^c	0.265	−0.115
Blood pressure	SPB (mm Hg)	Baseline	0.126	0.184 ^c	0.321	−0.065
		Post-intervention	−0.062	0.186 ^c	0.144	0.246
	DPB (mm Hg)	Baseline	0.242	0.304 ^c	0.181	0.432
		Post-intervention	0.092	0.032 ^c	0.138	−0.055

Unskewed data distribution.

a) Five clinical traits of MetS: waist circumference, fasting glucose, c-HDL, triglycerides, and elevated blood pressure—SPB and DPB, at baseline and after nuts intervention. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

b) Adjusted for sex.

c) Adjusted for sex and specific drug treatment.

microbial dysbiosis observed in cooccurrence with metabolic alterations may have on the systemic exposure to these bioactives from nut polyphenols. Further research aimed at assessing the prevalence of urolithin-producing bacteria in the gut of metabolically healthy versus diseased individuals is urgently required.

The potential association between the plasma levels of dodecanedioic acid and the severity of the MetS diagnostic traits were also analyzed, at baseline and after the period of nuts intake. Although no significant variations were overall observed, specific gender effects were also noticed (details in Supporting Information Table 6).

4 Concluding remarks

In the present study, the exploration of the plasma metabolome by untargeted metabolomics enabled to identify discriminant metabolites of nut consumption, namely conjugated urolithins and fatty acid metabolites such as dodecanedioic acid, in systemic circulation at least 12 h following the last intake. Nut consumption was recently associated with an increased urinary excretion of the detected metabolites, in both intervention studies and free-living conditions

[16, 27, 59], hence our findings represent an important step in the validation of these compounds as biomarkers of nuts exposure. Moreover, the correlations observed between the identified metabolites and the MetS clinical traits provided a first overview of the link between exposure (referred as the combination of "intake" and "host-microbial metabolic capacity") and cardiometabolic risk. Although further studies are highly recommended to verify the generated hypotheses, our findings have confirmed the role of a healthy gut microbial community in modulating the production and bioavailability of healthy bioactives from dietary polyphenols.

The authors' contributions to the manuscript were as follows: S.T., and C.A.-L. designed the research; M.B. and F.J.T. provided the clinical review of the interventional feeding trial in subjects with metabolic syndrome; X.M.-C., S.T., M.G.-A., and C.A.-L. conducted the research; performed the samples analyses; X.M.-C. and S.T. conducted the statistical analysis; and wrote the paper; S.T., M.G.-A., F.J.T., M.B., and C.A.-L. provided critical revision; and S.T. and C.A.-L. have the primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

This research was supported by: P113/01172 Project (Plan N de I+D+i 2013–2016) from ISCII-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, cofunded by Fondo

Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); PI-0557-2013 Project, cofunded by Fundación Progreso y Salud, Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta de Andalucía, and FEDER. Partially funded by JPI HDHL FOODBALL Project (PCIN-2014-133-MINECO-Spain), AGL2005-03605, and ISCIII-CIBEROBN. We also thank the award of 2014SGR1566 from the Generalitat de Catalunya's Agency AGAUR. S.T. and X.M.-C. acknowledge the Juan de la Cierva fellowship (MINECO) and the AGAUR for the predoctoral FI-DGR 2012 fellowship, respectively. We would like to thank Dr. J.C. Espín (Murcia) for his generous gift providing urolithin A glucuronide standard.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M. I. et al., Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368, 1279–1290.
- [2] Mithril, C., Dragsted, L. O., Meyer, C., Tetens, I. et al., Dietary composition and nutrient content of the New Nordic diet. *Public Health Nutr.* 2013, 16, 777–785.
- [3] U.S. Department of Agriculture, U.S. Department of Health and Human Services, Scientific Report of the 2015 Dietary Guidelines Advisor Committee *Government Printing Office: First Print.* Available from: <http://health.gov/dietaryguidelines/2015-scientific-report/> (accessed September 7, 2015).
- [4] Salas-Salvado, J., Guasch-Ferre, M., Bullo, M., Sabate, J., Nuts in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, 100, 399S–407S.
- [5] Blanco Mejia, S., Kendall, C. W., Vigiouliouk, E., Augustin, L. S. et al., Effect of tree nuts on metabolic syndrome criteria: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ Open* 2014, 4, e004660.
- [6] O'Neil, C. E., Keast, D. R., Nicklas, T. A., Fulgoni, V. L., 3rd, Nut consumption is associated with decreased health risk factors for cardiovascular disease and metabolic syndrome in U.S. adults: NHANES 1999–2004. *J. Am. Coll. Nutr.* 2011, 30, 502–510.
- [7] Fernandez-Montero, A., Bes-Rastrollo, M., Beunza, J. J., Barrio-Lopez, M. T. et al., Nut consumption and incidence of metabolic syndrome after 6-year follow-up: the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra, University of Navarra follow-up) cohort. *Public Health Nutr.* 2013, 16, 2064–2072.
- [8] Ibarrola-Jurado, N., Bullo, M., Guasch-Ferre, M., Ros, E. et al., Cross-sectional assessment of nut consumption and obesity, metabolic syndrome and other cardiometabolic risk factors: the PREDIMED study. *PLoS One* 2013, 8, e57367.
- [9] Jackson, C. L., Hu, F. B., Long-term associations of nut consumption with body weight and obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, 100, 408S–411S.
- [10] Guo, K., Zhou, Z., Jiang, Y., Li, W. et al., Meta-analysis of prospective studies on the effects of nut consumption on hypertension and type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes* 2015, 7, 202–212.
- [11] Ros, E., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Salas-Salvado, J. et al., Mediterranean diet and cardiovascular health: teachings of the PREDIMED study. *Adv. Nutr.* 2014, 5, 330S–336S.
- [12] Ros, E., Health benefits of nut consumption. *Nutrients* 2010, 2, 652–682.
- [13] Luo, C., Zhang, Y., Ding, Y., Shan, Z. et al., Nut consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, 100, 256–269.
- [14] Casas-Agustench, P., Lopez-Uriarte, P., Bullo, M., Ros, E. et al., Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2011, 21, 126–135.
- [15] Lopez-Uriarte, P., Nogues, R., Saez, G., Bullo, M. et al., Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. *Clin. Nutr.* 2010, 29, 373–380.
- [16] Tulipani, S., Urpi-Sarda, M., Garcia-Villalba, R., Rabassa, M. et al., Urolithins are the main urinary microbial-derived phenolic metabolites discriminating a moderate consumption of nuts in free-living subjects with diagnosed metabolic syndrome. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 8930–8940.
- [17] Garcia-Munoz, C., Vaillant, F., Metabolic fate of ellagitannins: implications for health, and research perspectives for innovative functional foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2014, 54, 1584–1598.
- [18] Selma, M. V., Beltran, D., Garcia-Villalba, R., Espin, J. C. et al., Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. *Food Funct.* 2014, 5, 1779–1784.
- [19] Selma, M. V., Tomas-Barberan, F. A., Beltran, D., Garcia-Villalba, R. et al., *Gordonibacter urolithinifaciens* sp. nov., an urolithin-producing bacterium isolated from human gut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2014, 64, 2346–2352.
- [20] Hartstra, A. V., Bouter, K. E., Backhed, F., Nieuwdorp, M., Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2015, 38, 159–165.
- [21] Scalbert, A., Brennan, L., Manach, C., Andres-Lacueva, C. et al., The food metabolome: a window over dietary exposure. *Am. J. Clin. Nutr.* 2014, 99, 1286–1308.
- [22] Ussar, S., Griffin, N. W., Bezy, O., Fujisaka, S. et al., Interactions between gut microbiota, host genetics and diet modulate the predisposition to obesity and metabolic syndrome. *Cell Metab.* 2015, 22, 516–530.
- [23] van Ravenzwaay, B., Cunha, G. C., Leibold, E., Looser, R. et al., The use of metabolomics for the discovery of new biomarkers of effect. *Toxicol. Lett.* 2007, 172, 21–28.
- [24] Llorach, R., Garcia-Aloy, M., Tulipani, S., Vazquez-Fresno, R. et al., Nutrimental strategies to develop new biomarkers of intake and health effects. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 8797–8808.
- [25] Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J. M., Darzi, A. W. et al., Metabolic phenotyping in clinical and surgical environments. *Nature* 2012, 491, 384–392.

- [26] Rappaport, S. M., Barupal, D. K., Wishart, D., Vineis, P. et al., The blood exposome and its role in discovering causes of disease. *Environ. Health Perspect.* 2014, **122**, 769–774.
- [27] Tulipani, S., Llorach, R., Jauregui, O., Lopez-Uriarte, P. et al., Metabolomics unveils urinary changes in subjects with metabolic syndrome following 12-week nut consumption. *J. Proteome Res.* 2011, **10**, 5047–5058.
- [28] Grundy, S. M., Cleeman, J. I., Daniels, S. R., Donato, K. A. et al., Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005, **112**, 2735–2752.
- [29] Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z. et al., Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009, **120**, 1640–1645.
- [30] Krauss, R. M., Eckel, R. H., Howard, B., Appel, L. J. et al., AHA Dietary Guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000, **102**, 2284–2299.
- [31] Tulipani, S., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Andres-Lacueva, C., Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: when less is more. *Anal. Chem.* 2013, **85**, 341–348.
- [32] Tulipani, S., Mora-Cubillos, X., Jauregui, O., Llorach, R. et al., New and vintage solutions to enhance the plasma metabolome coverage by LC-ESI-MS untargeted metabolomics. The not-so-simple process of method performance evaluation. *Anal. Chem.* 2015, **87**, 2639–2647.
- [33] Rothwell, J. A., Fillatre, Y., Martin, J. F., Lyan, B. et al., New biomarkers of coffee consumption identified by the non-targeted metabolomic profiling of cohort study subjects. *PLoS One* 2014, **9**, e93474.
- [34] Llorach, R., Garrido, I., Monagas, M., Urpi-Sarda, M. et al., Metabolomics study of human urinary metabolome modifications after intake of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skin polyphenols. *J. Proteome Res.* 2010, **9**, 5859–5867.
- [35] Fernandez-Albert, F., Llorach, R., Andres-Lacueva, C., Perera, A., An R package to analyze LC/MS metabolomic data: MAIT (Metabolite Automatic Identification Toolkit). *Bioinformatics* 2014, **30**, 1937–1939.
- [36] Fernandez-Albert, F., Llorach, R., Andres-Lacueva, C., Perera-Lluna, A., Peak aggregation as an innovative strategy for improving the predictive power of LC-MS metabolomic profiles. *Anal. Chem.* 2014, **86**, 2320–2325.
- [37] Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M. et al., HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013, **41**, D801–D807.
- [38] Wagele, B., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., Suhre, K., MassTRIX reloaded: combined analysis and visualization of transcriptome and metabolome data. *PLoS One* 2012, **7**, e39860.
- [39] Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y. et al., MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 2010, **45**, 703–714.
- [40] Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H. et al., Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 2007, **3**, 211–221.
- [41] Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M., Wishart, D. S., Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013, **9**, 280–299.
- [42] Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N. et al., pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics* 2011, **12**, 77.
- [43] Jenab, M., Sabate, J., Slimani, N., Ferrari, P. et al., Consumption and portion sizes of tree nuts, peanuts and seeds in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts from 10 European countries. *Br. J. Nutr.* 2006, **96**, S12–S23.
- [44] Tomas-Barberan, F., Garcia-Villalba, R., Gonzalez-Sarrias, A., Selma, M. V. et al., Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age and health status. *J. Agric. Food Chem.* 2014, **62**, 6535–6538.
- [45] Espin, J. C., Larrosa, M., Garcia-Conesa, M. T., Tomas-Barberan, F., Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013, **2013**, 270418.
- [46] Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtel, G., Gehres, N. et al., Pilot walnut intervention study of urolithin bioavailability in human volunteers. *J. Agric. Food Chem.* 2014, **62**, 10264–10273.
- [47] Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M. et al., Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J. Nutr.* 2006, **136**, 2481–2485.
- [48] Puupponen-Pimia, R., Seppanen-Laakso, T., Kankainen, M., Maukonen, J. et al., Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, **57**, 2258–2263.
- [49] Dembitsky, V. M., Goldshlag, P., Srebniak, M., Occurrence of dicarboxylic (dioic) acids in some Mediterranean nuts. *Food Chem.* 2002, **76**, 469–473.
- [50] Mingrone, G., Castagneto, M., Medium-chain, even-numbered dicarboxylic acids as novel energy substrates: an update. *Nutr. Rev.* 2006, **64**, 449–456.
- [51] Eckel, R. H., Jakicic, J. M., Ard, J. D., de Jesus, J. M. et al., 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014, **63**, 2960–2984.
- [52] Mingrone, G., Castagneto-Gissey, L., Mace, K., Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013, **75**, 671–676.
- [53] Storlien, L., Oakes, N. D., Kelley, D. E., Metabolic flexibility. *Proc. Nutr. Soc.* 2004, **63**, 363–368.

2490 X. Mora-Cubillos et al.

Mol. Nutr. Food Res. 2015, **59**, 2480–2490

- [54] Greco Md, A. V., Mingrone Md, P. G., Capristo Md, E., Benedetti Md, G. et al., The metabolic effect of dodecanedioic acid infusion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Nutrition* 1998, **14**, 351–357.
- [55] Salinari, S., Bertuzzi, A., Gandolfi, A., Greco, A. V. et al., Dodecanedioic acid overcomes metabolic inflexibility in type 2 diabetic subjects. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006, **291**, E1021–E1058.
- [56] Wang, M., Yang, X., Ren, L., Li, S. et al., Biomarkers identified by urinary metabonomics for noninvasive diagnosis of nutritional rickets. *J. Proteome Res.* 2014, **13**, 4131–4142.
- [57] Kolvraa, S., Gregersen, N., In vitro studies on the oxidation of medium-chain dicarboxylic acids in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, **876**, 515–525.
- [58] Nieman, D. C., Shanely, R. A., Luo, B., Meaney, M. P. et al., Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014, **307**, R68–R74.
- [59] Garcia-Aloy, M., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Tulipani, S. et al., Novel multimetabolite prediction of walnut consumption by a urinary biomarker model in a free-living population: the PREDIMED study. *J. Proteome Res.* 2014, **13**, 3476–3483.
- [60] Garcia-Villalba, R., Beltran, D., Espin, J. C., Selma, M. V. et al., Time course production of urolithins from ellagic acid by human gut microbiota. *J. Agric. Food Chem.* 2013, **61**, 8797–8806.

5.3 Cohorte InCHIANTI

La evaluación precisa de la ingesta de frutos secos, al igual que con otros alimentos, es un tema problemático en los estudios observacionales. En estos estudios, los datos de ingesta tradicionalmente se recogen por medio del FFQ y recordatorios dietéticos de 24 h, métodos de evaluación de la dieta que se basan en la percepción subjetiva y pueden desembocar en errores de desviación y medición (Guertin, et al. 2014). Por tanto, asegurar la exposición a la dieta es un paso indispensable en el establecimiento de los efectos en la relación salud-enfermedad asociada a alimentos individuales o a un patrón dietético en general. La aplicación del flujo de trabajo de análisis metabolómico no dirigido en epidemiología nutricional y en grandes estudios de cohortes es una potencial estrategia para validar biomarcadores de exposición identificados en estudios clínicos y confirmar hipótesis establecidas previamente en estudios de intervención (Guertin, et al. 2014).

En el presente estudio, una cohorte del estudio InCHIANTI fue seleccionada para la exploración del metaboloma urinario de 119 participantes mayores de 65 años, con el objetivo de: i) identificar potenciales biomarcadores de exposición a frutos secos en una población de vida libre a través de una aproximación metabolómica no dirigida por LC-MS; ii) construir un modelo bioestadístico robusto que relacione un conjunto de biomarcadores de exposición a frutos secos discriminantes en relación a la ingesta reportada en el FFQ; y iii) evaluar las posibles asociaciones entre los biomarcadores de exposición a frutos secos y parámetros clínicos diagnósticos de síndrome metabólico.

5.3.1 Análisis descriptivo de los participantes del estudio

Cincuenta y siete mujeres y sesenta y dos hombres fueron asignados a uno de los dos grupos de clasificación (NC o WK) de acuerdo con la frecuencia de consumo de frutos secos reportado en el FFQ al inicio del estudio. NC corresponde al grupo de “no consumidores” de frutos secos (0 g/d) y WK al grupo de “consumidores

semanales” con una ingesta ≥ 2.9 g/d de frutos secos. En los grupos NC y WK fueron integrados por 36 (50%) y 21 (44,7%) mujeres con edad promedio de 72.5 y 71 años, respectivamente. En cada uno de los dos grupos fueron seleccionados proporciones similares de participantes por sexo, edad y consumo de tabaco. La ingesta de energía, ácido elágico total y ácido elágico procedente de los frutos secos se calcularon y se observaron diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los parámetros clínicos para el diagnóstico de síndrome metabólico y otros parámetros clínicos y antropométricos (ver **Tabla 5.14**).

Table 5.14. Descriptiva de los parámetros basales de la cohorte (n = 119) del estudio InCHIANTI.

Variables	NC, n = 72 ^a	WK, n = 47 ^a	p-valor
Datos generales y de estilo de vida			
Edad (años)	72.5 (68.0 - 77.0)	71.0 (68.0 - 75.0)	0.228 ^b
Mujeres (n, %)	36 (50.0)	21 (44.7)	0.570 ^c
Educación (años)	5.0 (5.0 - 6.8)	5.0 (4.0 - 5.0)	0.840 ^b
Actividad física (n, %)			0.597 ^c
Sedentarismo	12 (16.7)	10 (21.3)	
Leve	34 (47.2)	24 (51.1)	
Moderada a alta	26 (36.1)	13 (27.7)	
Estatus de fumador (n, %)			0.181 ^c
Nunca	26 (36.1)	25 (53.2)	
Ex-	24 (33.3)	11 (23.4)	
Actual	22 (30.6)	11 (23.4)	
Componentes del síndrome metabólico			
Elevada circunferencia de cintura [n (%)] ^e	28 (38.9)	21 (44.7)	0.615 ^c
Triglicéridos elevados [n (%)]	25 (34.7)	13 (27.7)	0.419 ^c
Reducción de colesterol HDL [n (%)]	14 (19.4)	9 (19.1)	0.968 ^c
Presión arterial elevada [n (%)] ^f	63 (87.5)	44 (93.6)	0.372 ^c
Elevada glucemia basal en ayunas [n (%)]	17 (23.6)	14 (29.8)	0.453 ^c
Total casos con síndrome metabólico [n (%)]	23 (31.9)	16 (34.0)	0.812^c
Parámetros antropométricos y bioquímicos asociados a síndrome metabólico			
Circunferencia de cintura (cm) ^e	93.0 (84.0 - 100.0)	93.0 (88.0 - 99.0)	0.811 ^d
Triglicéridos (mg/dL)	112.5 (79.0 - 154.8)	117.0 (88.0 - 166.0)	0.853 ^d
LDL-c (mg/dL)	136.74 ± 33.56	139.40 ± 35.82	0.691 ^b
HDL-c (mg/dL)	58.5 (47.0 - 68.8)	54.0 (45.0 - 66.0)	0.475 ^d
Presión arterial sistólica (mm Hg) ^e	145.0 (130.0 - 160.0)	150.0 (137.5 - 160.0)	0.689 ^d
Presión arterial diastólica (mm Hg) ^e	80.0 (80.0 - 90.0)	80.0 (80.0 - 90.0)	0.490 ^d
Glucosa en ayunas (mg/dL)	87.5 (83.0 - 96.0)	92.0 (84.0 - 101.0)	0.284 ^d
Otros parámetros antropométricos y bioquímicos			
Cadera (cm) ^e	100.0 (94.8 - 105.3)	99.0 (96.0 - 105.0)	0.878 ^d
Índice cintura-cadera	0.9 (0.9 - 1.0)	0.9 (0.9 - 1.0)	0.859 ^d
IMC (kg/m ²) ^f	27.15 ± 3.75	27.95 ± 3.85	0.267 ^b
Colesterol total (mg/dL)	222.19 ± 40.81	221.55 ± 40.46	0.933 ^b
Insulina en ayunas (ml U/L) ^g	10.2 (7.1 - 14.8)	10.8 (8.5 - 13.1)	0.797 ^d
Proteína C-reactiva (µg/mL)	2.5 (1.4 - 5.0)	3.0 (1.5 - 4.9)	0.358 ^d
Descriptiva general de la ingesta			
Ingesta de energía (kcal/d)	1704.6 (1452.3 - 2029.7)	2408.9 (1864.8 - 2652.6)	0.000 ^d
Ingesta de frutos secos (g/d)	0.0 (0.0 - 0.0)	4.3 (2.9 - 4.3)	0.000 ^d
Ácido elágico total (mg/d)	0.5 (0.1 - 1.4)	3.9 (2.9 - 5.2)	0.000 ^d
Ácido elágico desde frutos secos (mg/d)	0.0 (0.0 - 0.0)	2.7 (1.8 - 2.7)	0.000 ^d

^a Variables continuas fueron expresadas como media ± DS o mediana (intercuartiles) & variables categóricas como como n (%). p-Valor fue calculado como: ^b T-Test, ^c X²-Test & ^d Prueba de Mann-Whitney fueron aplicados para comparar variables continuas (paramétricas y no paramétricas) y variables categóricas. Variables calculadas con: ^e 117, ^f 118, & ^g 113 sujetos, respectivamente.

5.3.2 Análisis del metaboloma urinario

El flujo de trabajo aplicado en la exploración del metaboloma urinario a través de una aproximación metabolómica no dirigida, se realizó de acuerdo con el protocolo

previamente desarrollado y validación en el grupo de investigación (Llorach, et al. 2009; Tulipani, et al. 2011). La preparativa de las muestras biológicas de orina únicamente incluyó el centrifugado y la dilución en dilución en agua Milli-Q en una proporción 1:1.

5.3.2.1 Evaluación de la calidad de la adquisición de los datos

La calidad analítica del sistema de HPLC-ESI-MS durante la adquisición de datos se controló a través de la mezcla de patrones internos L-fenilalanina ¹⁵N y ácido indol-d₂-acético, cuyas masas experimentales detectadas presentaron una variación no significativa (CV < 0.001%). Por lo tanto, la normalización de datos no fue necesaria. La reproducibilidad y estabilidad del sistema durante la adquisición de los datos fue evaluada y monitoreada a través de una mezcla acuosa de estándares (QC2) compuesta de metabolitos exógenos y endógenos de diversidad química presentes en el metaboloma urinaria. Como se muestra en la **Tabla 5.15**, la repetibilidad del RT (tiempo de retención no superó 0.07 min), la precisión de la masa detectada (no superó desviaciones > 4 mDa) y, la variación de la intensidad de la señal (áreas de los picos, CV ≤ 10%) se encuentran dentro de los parámetros propuestos en los protocolos analíticos para estudios de metabolómica no dirigida (Rothwell, et al. 2014).

Tabla 5.15. Variación en el tiempo de retención, área del pico y masa de detectadas en muestras acuosas de QC2 inyectadas aleatoriamente.

Metabolitos (QC2)	Fórmula molecular	Masa teórica vs masa detectada			Tiempo de retención (min)		Intensidad (área del pico)	
		[M - H] ⁻			Media	Cambio (max - min)	Media	CV (%)
		Masa exacta teórica	Masa detectada (media)	Error (mDa)				
L-citrulina	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	174.0884	174.0880	0.40	0.32	0.01	170	10.00
L-fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164.071	164.0724	0.71	1.44	0.05	52	4.00
Hidrato de 2'-desoxiguanosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄ ·H ₂ O	266.0895	266.0894	0.06	1.57	0.07	256	4.00
Ácido 4-hidroxihipúrico	C ₉ H ₉ NO ₄	194.045	194.0452	0.67	2.82	0.05	1192	4.00
L-triptófano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.082	203.0807	1.89	2.88	0.05	223	1.00
Ácido 5-hidroxiindol-3-acético	C ₁₀ H ₉ NO ₃	190.0524	190.0517	0.74	3.83	0.05	313	5.00
Procianidina B2	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	577.1361	577.1356	0.47	4.49	0.03	472	6.00
Epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.017	289.0715	0.24	4.71	0.05	1449	4.00
Ácido glucoquenodesoxicólico	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	448.3068	448.3046	2.22	6.96	0.02	1433	5.00

De acuerdo con los resultados anteriores, los parámetros para la detección y la alineación de los picos en el pre-tratamiento de los datos fueron 0.05 Da como

rango de tolerancia de masa (teniendo en cuenta el mismo criterio utilizado en la exploración del metaboloma plasmático) y 0.07 min como ventana de tolerancia en el tiempo de retención, respectivamente (ver **Tabla 5.16**).

Tabla 5.16. Parámetros utilizados en el pre-procesamiento de los datos a través del software MarkerView™ 1.2.1 (AB Sciex, Toronto, Ontario, Canadá).

Parámetro	Descripción	Valor
Detección del pico (peak finding)	Subtraction offset (scans)	5
	Subtraction multiplication factor	1.5
	Minimum spectral peak width (ppm)	1
	Minimum retention time peak width (scans)	3
	Noise threshold	5
Alineación del pico (peak alignment)	Retention time tolerance (min)	0.07
	Mass tolerance (Da)	0.05
	Intensity threshold	0
	Maximum number of peaks	5000

5.3.2.2 Análisis de datos e identificación de metabolitos

Antes de iniciar el análisis bioestadístico multivariante, un filtro para eliminar los valores perdidos fue aplicado a la matriz obtenida del pre-tratamiento de datos a través de MarkerView™ 1.2.1. Todas aquellas variables con valores de cero en más del 75% en al menos uno de los dos grupos (NC o WK) fueron consideradas como valores perdidos y excluidas del matriz de datos que fue empleada en los análisis posteriores (Rothwell, et al. 2014).

Con la matriz de datos sin valores perdidos, se inició el análisis multivariante con la log-transformación de los datos (para mejorar la normalidad) y el escalado por Pareto a través del software SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Umea, Suecia) (Llorach, et al. 2010). Un filtro de OSC se aplicó para excluir la información no asociada con la ingesta de frutos secos de acuerdo con los dos grupos (NC y WK), 10 componentes fueron eliminados y el 52.40% de la variación no ortogonal del conjunto de datos originales se mantuvo. Las diferencias en el metaboloma urinario entre estos dos grupos (NC y WK) fueron exploradas a través de un modelo de análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales con corrección de señales ortogonales (OSC-PLS-DA) a 2 clases (NC vs WK) (ver **Figura 5.14**).

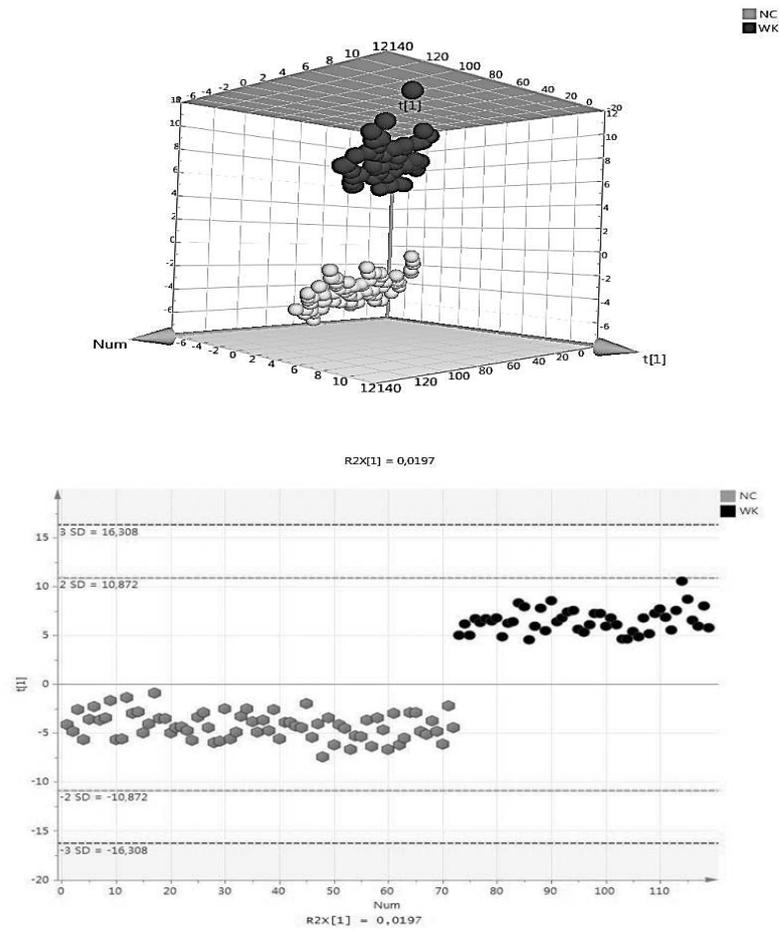


Figura 5.14. Representaciones de OSC-PLS-DA plot. Las diferencias en el metaboloma urinario de los participantes del grupo NC (símbolos de color gris) y del grupo WK (símbolos de color negro) son representadas a través del análisis supervisado.

La calidad y la capacidad de predicción del modelo PLS se evaluó por $R^2X(\text{cum})$, $R^2Y(\text{cum})$, $Q^2(\text{cum})$ y la prueba de permutación ($n = 200$) (ver **Tabla 5.17**). Además, una validación cruzada interna se realizó como prueba final de calidad. El conjunto de datos se dividió al azar en cuatro sub-muestras de igual tamaño (25% de las muestras de cada uno), tres de las sub-muestras fueron usadas como conjuntos de entrenamiento, mientras que la sub-muestra restante se utilizó como el conjunto de validación. Este proceso se repitió cuatro veces, donde cada sub-muestra se utiliza como el conjunto de validación al menos una vez y, se calcularon los individuos clasificados correctamente en cada conjunto de validación (%) (ver **Tabla 5.18**).

Tabla 5.17. Resumen de los parámetros de aseguramiento de la calidad para los modelos OSC-PLS-DA.

Modelo ^a	Número de clases	Número de componentes	R ² X(cum) ^b	R ² Y(cum) ^b	Q ² (cum) ^b	R intercepto ^c	Q intercepto ^c	p ^d
1	1 (NC vs WK)	1	0.0197	0.942	0.654	0.646	-0.142	1.93436E-27

^a La generación de los filtros OSC eliminó 10 componentes con (valor propio > 1.5), manteniendo el 52.40% de variación no ortogonal en el conjunto de datos original. ^b R²X(cum) y R²Y (cum) son la variación acumulada de modelado en la matriz X y Y, respectivamente. Q²(cum) es la variación predicha acumulado en la matriz Y. ^c Se obtiene de la prueba de permutación (n=200). ^d Valor de ANOVA basado en los residuos de predicción con validación cruzada. Los modelos se consideraron significativos con p < 0.001.

Tabla 5.18. Resumen de los parámetros para evaluar la calidad del modelo OSC-PLS-DA después de la eliminación de las muestras de validación (25%).

Conjunto de entrenamiento (75%)	No. ^a	R ² X(cum) ^b	R ² Y(cum) ^b	Q ² (cum) ^b	p-valor	Individuos correctamente clasificados			
						Conjunto de validación total (%)	Grupo NC (%)	Grupo WK (%)	Probabilidad de Fisher
1	1	0.0224	0.939	0.55	8.54E-16	100	100	100	1.70E-26
2	1	0.0236	0.914	0.571	3.00E-17	100	100	100	3.50E-26
3	1	0.0235	0.93	0.587	7.17E-17	99.32	100	100	2.70E-25
4	1	0.0218	0.932	0.529	8.52E-15	100	100	100	3.70E-25
Media ± DS ^c	1	0.0304 ± 0.0011	0.9195 ± 0.0047	0.6838 ± 0.0070	2.37E-15	99.83	100	100	1.73E-25

^a Cantidad de componentes seleccionados. ^b R²X(cum) y R²Y (cum) son la variación acumulada de modelado en la matriz X y Y, respectivamente. Q²(cum) es la variación predicha acumulado en la matriz Y. ^c Valores de R²X(cum), R²Y(cum) y Q²(cum) corresponden a media y desviación estándar (DS).

La importancia de las señales de masa en la discriminación entre clases (grupo NC vs grupo WK) se visualizó mediante los valores VIP. Un total de 93 *señales de masa* fueron responsables de la clara variación en las huellas metabólicas entre los grupos de acuerdo con la exposición a frutos secos. Para evitar falsos positivos, se seleccionaron únicamente las señales de masa con VIP ≥ 2 y, con la designación de correlación de la clase modelado ($p(\text{corr}) \geq 0$) para asegurar que las *señales de masa* seleccionados correspondieran a biomarcadores de exposición de frutos secos (ver **Figura 5.15**) (Mora-Cubillos, et al. 2015).

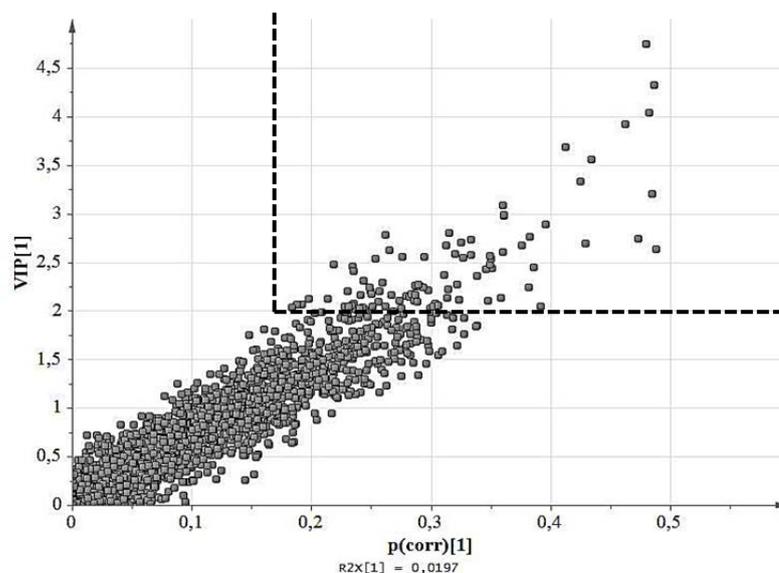


Figura 5.15. OSC-PLS-DA Plot del modelo grupo NC vs grupo WK. Las líneas de puntos representan las señales de masa discriminantes con valor $VIP \geq 2$ en estos modelos. El valor positivo del $p(\text{corr})$ indica que las señales de masa corresponden a biomarcadores de exposición a frutos secos.

Con la selección de estas *señales de masa* discriminantes, se procede a la identificación de los metabolitos (ver **Tabla 5.19**). Catorce biomarcadores fueron identificados putativamente de acuerdo con los niveles de identificación publicados previamente (Sumner, et al. 2007). Los biomarcadores identificados estuvieron involucrados en diferentes vías metabólicas. Seis biomarcadores corresponden a metabolitos derivados de la biotransformación de elagitaninos por acción de la microbiana intestinal (urolitina A, urolitina A glucurónido, urolitina A sulfato, urolitina A sulfatoglucurónido, urolitina B y, urolitina B glucurónido); dos biomarcadores derivados del metabolismo del triptófano (ácido indol-3-acético-O-glucurónido, indoxil sulfato/ácido indoxil sulfúrico); dos biomarcadores derivados de otros polifenoles por acción de la microbiota (2,4-Dihidroxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona y trans-resveratrol-4-sulfato); dos biomarcadores del metabolismo de los ácidos grasos (ácido dodecanodioico y ácido 3,3-dimetilglutárico); un biomarcador de derivados de salicilatos (ácido 2-hidroxihipúrico); y un biomarcador derivado del metabolismo de la fenilalanina (ácido 2-hidroxifenilacético). También, cuatro biomarcadores no fueron identificados, pero las relaciones entre las diferentes *señales de masa* fueron claramente establecidas.

Tabla 5.19. Biomarcadores identificados y no identificados asociados con la exposición a frutos secos en el metaboloma urinario de adultos mayores en condición de vida libre (NC vs WK).

Número de agrupación	RT (min)	Masa detectada (m/z) ^a	Mass teórica (m/z)	EFOR (mDa)	Asignación	Biomarcador potencial	Valor VIP ^b	p (corr) ^b	Nivel de evidencia ^c	AUC ^d	AUC (min-max) ^e
<i>Biomarcadores derivados de la microbiota y del metabolismo de fase II de los compuestos fenólicos de las nueces</i>											
1	6.45	227.0327	227.0350	2.27	[M-H] ⁺	Urolitina A	3.85	0.41	I	0.710	(0.615 - 0.804)
	6.45	228.0365			¹³ C[M-H] ⁺		2.57	0.33			
2	5.38	403.0626	403.0671	4.45	[M-H] ⁺	Urolitina A glucurónido	4.75	0.48	I	0.780	(0.697 - 0.862)
	5.38	404.0663	404.0742	7.90	¹³ C[M-H] ⁺		4.32	0.49			
	5.38	227.0329	227.0350	2.10	[M-H-glucurónido] ⁺		3.56	0.43			
	6.64	306.9884	306.9918	3.40	[M-H] ⁺		3.92	0.46	I		
4	5.23	483.0187	483.0239	5.20	[M-H] ⁺	Urolitina A sulfato	2.98	0.36	I	0.680	(0.580 - 0.779)
5	6.80	211.0387	211.0401	1.36	[M-H] ⁺	Urolitina B	2.01	0.24	I	0.602	(0.498 - 0.707)
6	6.30	387.0650	387.0721	-7.14	[M-H] ⁺	Urolitina B glucurónido	2.41	0.24	I	0.598	(0.491 - 0.704)
	6.30	388.0708			¹³ C[M-H] ⁺		2.04	0.23			
	6.30 ^e	211.0386			[M-H-glucurónido] ⁺		1.44	0.16			
<i>Biomarcadores derivados del metabolismo del triptófano</i>											
7	5.30 ^e	350.0873	350.0881	0.32	[M-H] ⁺	Ácido indole-3-acético-O-glucurónido	1.87	0.25	II		
	5.28 ^e	351.0906			¹³ C[M-H] ⁺		1.62	0.22			
	5.28 ^e	174.0556			[M-H-glucurónido] ⁺		1.07	0.15			
	5.28	175.0251			¹³ C[M-H-glucurónido] ⁺		2.01	0.24			
	8	4.55	212.0018	212.0023	0.49		[M-H] ⁺	Sulfato de indoxila/Ácido indoxilsulfúrico	2.48		
8	4.52 ^e	213.9982			¹³ C[M-H] ⁺	1.99	0.21				
	4.57	132.0455			[M-H-SO ₂] ⁺	2.24	0.25				
	4.57 ^e	80.9646			[H-SO ₂] ⁺	1.88	0.26				
	4.55 ^e	425.0117			[2M-H] ⁺	1.28	0.15				
	<i>Biomarcadores derivados de la microbiota y del metabolismo de fase II de otros compuestos fenólicos de los frutos secos</i>										
9	4.93	180.0373	180.0302	-7.08	[M-H] ⁺	2,4-Dihidroxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona	3.33	0.43	II	0.770	(0.678 - 0.862)
10	6.94	307.0287	307.0282	1.67	[M-H] ⁺	Trans-resveratrol-4'-sulfato	2.89	0.40	III	0.741	(0.651 - 0.830)
	6.94 ^e	308.0306			¹³ C[M-H] ⁺		1.68	0.29			
	6.95	227.0719			[M-H-SO ₂] ⁺		2.67	0.38			
	6.94 ^e	228.0745			¹³ C[M-H-SO ₂] ⁺		1.96	0.31			
<i>Biomarcadores del metabolismo de los ácidos grasos (ácidos dicarboxílicos)</i>											
11	6.77	229.1429	229.1445	1.62	[M-H] ⁺	Ácido dodecanodioico	2.14	0.28	I	0.636	(0.532 - 0.740)
	6.77	230.1468			¹³ C[M-H] ⁺		2.05	0.30			
12	4.07	159.0664	159.0663	-0.13	[M-H] ⁺	Ácido 3,3-dimetilglutárico	2.63	0.49	II	0.766	(0.681 - 0.852)
	4.07	160.0700			¹³ C[M-H] ⁺		2.04	0.39			
	4.07	115.0769			[M-H-COO] ⁺		1.55	0.31			
	4.07 ^e	97.0657			[M-H-COO-OH] ⁺						
<i>Biomarcadores derivados de salicilatos</i>											
13	4.98 ^e	194.0367	194.0459	9.17	[M-H] ⁺	Ácido 2-hidroxihipúrico	1.28	0.18	II	0.668	(0.568 - 0.768)
	5.00	151.0568			¹³ C[M-H-COO] ⁺		2.37	0.31			
	5.00 ^e	150.0529			[M-H-COO] ⁺		1.42	0.19			
<i>Biomarcadores derivados del metabolismo de la fenilalanina</i>											
14	4.53	151.0387	151.0401	1.36	[M-H] ⁺	Ácido 2-hidroxiifenilacético	4.04	0.48	II	0.758	(0.670 - 0.846)
<i>Biomarcadores no identificados</i>											
15	6.70	309.0409			[M-H] ⁺	Desconocido A (derivado de sulfato)	3.20	0.49	IV	0.750	(0.663 - 0.836)
	6.70	310.0437			¹³ C[M-H] ⁺		2.74	0.47			
	6.72	311.0381			¹⁴ C[M-H] ⁺		2.45	0.39			
	6.70 ^e	229.0849			[M-H-SO ₂] ⁺		0.00	0.39			
	6.70 ^e	230.0885			¹³ C[M-H-SO ₂] ⁺		0.01	0.03			
16	6.15	359.1329			[M-H] ⁺	Desconocido B (derivado glucurónido)	2.03	0.24	IV	0.636	(0.533 - 0.740)
	6.15 ^e	183.1024			[M-H-glucurónido] ⁺		1.58	0.23			
17	6.54	397.1102			[M-H] ⁺	Desconocido C	2.55	0.28	IV	0.664	(0.567 - 0.762)
	6.54 ^e	398.1141			¹³ C[M-H] ⁺		1.66	0.24			
18	6.20	373.1158			[M-H] ⁺	Desconocido D	2.24	0.29	IV	0.671	(0.569 - 0.773)
	6.20	374.1124			¹³ C[M-H] ⁺		2.27	0.29			

^a Datos obtenidos por LC-ESI-q-ToF-MS. ^b Valores detectados según el modelo a una clase OSC-PLS-DA (NC vs WK). ^c Clasificación de acuerdo con la Metabolomics Standards Initiative. ^d AUC (área bajo la curva) a través de curvas ROC (NC vs WK). ^e Señales de masa con VIP ≤ 2 que han sido utilizadas como confirmación de fragmentaciones/aductos durante la identificación de los metabolitos.

Las urolitinas son compuestos bioactivos producto de la biotransformación de elagitaninos y ácido elágico por la microbiota intestinal en el tracto gastrointestinal baja (García-Munoz and Vaillant 2014). Estos biomarcadores se han identificado en el metaboloma urinario y plasmático después de una ingesta crónica de frutos secos (García-Aloy, et al. 2014; Mora-Cubillos, et al. 2015; Tulipani, et al. 2011). La importancia biológica de estos metabolitos en el estado de salud se asocia con su potencial anti-inflamatorio, anti-bacteriano, anti-oxidante y

quimiopreventivo (Espin, et al. 2013; Garcia-Munoz and Vaillant 2014). La producción, biodisponibilidad y bioactividad de las urolitinas depende significativamente del tiempo de exposición y de la composición de la microbiota intestinal (*gut metabotypes*) (Bolca, et al. 2013; Gonzalez-Barrio, et al. 2011; Selma, et al. 2014b) [26, 42, 43]. Estudios recientes han demostrado que *gut metabotype* está asociado con alteraciones en el microbioma intestinal (disbiosis) de los sujetos con alteraciones metabólicas como síndrome metabólico, obesidad y enfermedades crónicas como cáncer y, esta condición puede estar asociada con una respuesta diferente en el metabolismo de polifenoles por sujetos sanos (Bolca, et al. 2013; Nunez-Sanchez, et al. 2014). Tomás-Barberán *et al.* 2014 han propuesto tres fenotipos metabólicos relacionados con la producción de urolitinas después de una ingesta de elagitaninos y/o ácido elágico, clasificando a la población como: "fenotipo A" quienes sólo producen urolitina A y conjugados; "fenotipo B" quienes producen Urolitina B y conjugados, además de urolitina A, y "fenotipo 0" sujetos en los cuales no se ha detectado urolitinas (Tomas-Barberan, et al. 2014). También hemos demostrado recientemente que una mayor capacidad de producción de urolitina se asocia con sujetos con rasgos de síndrome metabólico menos severos (Mora-Cubillos, et al. 2015).

El ácido indol-3-acético-O-glucurónido y sulfato de indoxilo se identificaron como biomarcadores participantes en el metabolismo del triptófano y, las nueces son uno de los frutos secos con mayores concentraciones de triptófano (Keszthelyi, et al. 2009). Sulfato de indoxilo también ha sido identificado como un metabolito discriminante de proteínas de la dieta. Curiosamente, se ha demostrado que la producción de metabolitos que contienen derivados indol-bioactivos de triptófano, tales como sulfato de indoxilo, ocurre una situación similar como en la producción de urolitinas, ambos compuestos bioactivos se ven afectados por el *gut metabotype* (Wikoff, et al. 2009).

Los frutos secos son alimentos de alta densidad energética, producto de su alto contenido de ácidos grasos saludables como los MUFAs y PUFAs (Ros 2010) [1]. Ácido dodecanodioico y ácido 3,3-dimetilglutárico son ácidos grasos dicarboxílicos asociados con el metabolismo de estos ácidos grasos por la vía de ω -oxidación.

Estos compuestos se han relacionado como fuentes tanto exógenos como endógenos (Dembitsky, et al. 2002). Asimismo, el ácido dodecanodioico ha sido identificado previamente identificado como biomarcador de exposición de frutos secos en el metaboloma urinario y plasmático de sujetos que han participado en estudios de intervención (Garcia-Aloy, et al. 2014; Mora-Cubillos, et al. 2015; Tulipani, et al. 2011). En este estudio, el ácido 3,3-dimetilglutárico se informó por primera vez como biomarcador de exposición a frutos secos, aunque con nivel de identificación II (Dunn, et al. 2013).

5.3.3 Predicción de la ingesta: aplicación de modelo Tobit

Con el objetivo de evaluar la exposición real a los frutos secos en sujetos en condición de vida libre, sin control de la dieta y mayores de 65 años, se aplicó el modelo de predicción Tobit con el fin de establecer un conjunto de biomarcadores metabolómicos discriminantes que se relacionen con la frecuencia de la ingesta reportada en el FFQ. En el modelo Tobit se asume como variables independientes (o variables predictoras) al conjunto de biomarcadores metabolómicos discriminantes, mientras que la variable dependiente corresponde a la frecuencia de consumo de frutos secos de acuerdo con el FFQ (g/d de frutos secos, variable continua).

Dos modelos con diferente número de variables predictoras fueron construidos. Un primer modelo (M1) incluyó 13 variables predictoras entre las cuales se encuentran los metabolitos identificados con nivel de evidencia I y II, los metabolitos no identificados y *trans*-resveratrol 4' sulfato, por considerarse su alta asociación con consumo de vino, fueron excluidos en este análisis (ver **Tabla 5.20**).

Tabla 5.20. Modelo Tobit inicial con 13 variables predictoras (M1).

	Estimación	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
(Intercepto)	-1.569	0.678	-2.315	0.020606
Ácido 2-hidroxihipúrico	4.17	1.144	3.646	0.000266
Ácido 2-hidroxifenilacético	4.233	1	4.233	0.000023
2,4-Dihidroxi-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona	1.604	1.121	1.431	0.152472
Ácido dodecanodioico	1.899	1.199	1.585	0.113021
Ácido indole-3-acetic-O-glucurónido	2.7	1.337	2.02	0.043420
Sulfato de indoxilo/Ácido indoxilsulfúrico	0.761	0.605	1.258	0.208269
Ácido 3,3-dimetilglutárico	5.195	2.423	2.144	0.032004
Urolitina A	2.296	1.386	1.656	0.097698
Urolitina A glucurónido	2.585	1.129	2.289	0.022085
Urolitina A sulfato	-1.835	1.527	-1.202	0.229509
Urolitina A sulfoglucuronido	-0.494	1.456	-0.339	0.734273
Urolitina B	0.912	1.84	0.496	0.620098
Urolitina B glucurónido	0.434	1.383	0.314	0.753443
Log(escala)	1.312	0.11	11.892	0.000000

El segundo modelo (M2) se construyó a partir de dos hipótesis. La primera hipótesis corresponde con los resultados obtenidos previamente en el estudio de intervención (estudio EFINUT), donde dos metabolitos procedentes de rutas metabólicas diferentes (metabolismo de polifenoles por acción de la microbiota y metabolismo de ácidos grasos) fueron identificados como biomarcadores discriminantes de exposición a frutos secos y, la segunda hipótesis, hace referencia al análisis de correlación de Pearson entre las diferentes señales de masa de los biomarcadores identificados como discriminantes en este estudio InCHIANTI. Los biomarcadores derivados de la microbiota y del metabolismo de fase II de los compuestos fenólicos de las nueces, evidenciaron una correlación especialmente fuerte entre ellos, lo cual permitió respaldar la primera hipótesis. Para la construcción de M2, un total de 7 biomarcadores correspondientes a las dos rutas metabólicas mencionadas anteriormente, fueron incluidos (ver **Tabla 5.21**).

A partir de M1 y M2, se construyeron modelos a 4 y 2 variables predictoras respectivamente, con variables significativas en los dos modelos reducidos (ver **Tabla 5.22**).

Tabla 5.21. Modelo Tobit inicial con 7 variables predictoras (M2).

	Estimación	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
(Intercepto)	-1.264	0.707	-1.788	0.073748
Ácido dodecanodioico	1.880	1.228	1.531	0.125796
Urolitina A	3.553	1.674	2.122	0.033822
Urolitina A glucurónido	3.712	1.329	2.794	0.005213
Urolitina A sulfato	1.883	1.659	1.135	0.256304
Urolitina A sulfoglucurónido	-2.722	1.717	-1.585	0.113028
Urolitina B	-0.174	2.17	-0.08	0.936113
Urolitina B glucurónido	0.446	1.625	0.275	0.783674
Log(escala)	1.593	0.116	13.78	0.000000

Tabla 5.22. Conjunto de biomarcadores significativamente discriminantes para los modelos M1 (4 variables predictoras) y M2 (2 variables predictoras).

Modelo	Biomarcador	Estimación	Error estándar	Valor z	Pr(> z)
1	(Intercepto)	-1.819	0.731	-2.488	0.012832
	Ácido 2-hidroxihipúrico	4.164	1.194	3.488	0.000487
	Ácido 2-hidroxifenilacético	5.367	1.017	5.279	0.000000
	Ácido 3,3-dimetilglutárico	8.12	2.27	3.576	0.000349
	Urolitina A glucurónido	2.942	0.757	3.886	0.000102
	Log(escala)	1.434	0.111	12.968	0.000000
2	(Intercepto)	-1.237	0.712	-1.737	0.08231
	Urolitina A	4.17	1.441	2.894	0.003809
	Urolitina A glucurónido	3.175	0.907	3.502	0.000462
	Log(escala)	1.621	0.116	13.966	0.000000

Las diferencias significativas entre el modelo con el conjunto inicial de variables predictoras y el modelo reducido con las variables que explicaran significativamente el modelo ($Pr(>|z|) > 0.05$), fueron analizados en cada caso. Para el M1 no se reportaron diferencias significativas entre el modelo con el conjunto completo de variables predictoras y el modelo reducido (p -valor = 0.061), situación similar ocurrió para el M2, modelo en el cual tampoco fueron observadas diferencias significativas (p -valor = 0.289).

6. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue evaluar las posibles relaciones asociadas entre la exposición a frutos secos y el estado clínico de sujetos con alteraciones cardiometabólicas como el síndrome metabólico. Para lograr este objetivo, primero se identificaron los biomarcadores de exposición a frutos secos en diferentes biofluidos (plasma y orina) y diseños de estudio (de intervención y de cohorte) a través de una aproximación metabolómica no dirigida. Luego, se evaluó la robustez de estos biomarcadores de exposición en relación a métodos tradicionales de evaluación de la dieta como el FFQ a través de modelos multivariantes Tobit. Posteriormente, se interpretaron biológicamente las huellas metabólicas asociadas a los biomarcadores de exposición a frutos secos y, finalmente, se establecieron asociaciones entre biomarcadores de exposición a frutos secos y el estado clínico.

6.1 Desarrollo e implementación de metodología analítica

Un primer desafío presentado en esta Tesis doctoral, fue el desarrollo y la validación de una metodología analítica para la exploración del metaboloma plasmático de los sujetos que participaron en el estudio de intervención controlado, a través de una aproximación metabolómica no dirigida (Tulipani, et al. 2015). A diferencia de otros biofluidos como la orina, el plasma es una matriz biológica más compleja debido a la co-existencia de macromoléculas que pueden interferir en la exploración de compuestos de bajo peso molecular como son los metabolitos (Psychogios, et al. 2011). Por tanto, aunque no se han reportado protocolos analíticos estandarizados, surge la inminente necesidad de identificar y proponer alternativas de solución a los puntos críticos durante el desarrollo analítico de la exploración de la huella metabólica plasmática en estudios metabolómicos no dirigidos.

A través del desarrollo de la metodología analítica propuesta en esta Tesis Doctoral, se ha identificado que una preparación inadecuada de las muestras de plasma y el uso de condiciones inapropiadas en el análisis LC-MS son las fuentes

principales del efecto matriz y supresión iónica, que a su vez pueden afectar adversamente los requerimientos más importante para los estudios en metabolómica no dirigida, como son la cobertura del metaboloma, la precisión de la masa y la reproducibilidad de los datos. A pesar que el concepto de optimización de método no es viable en metabolómica no dirigida, la finalización de los procedimientos de extracción de muestras, separación cromatográfica y la ionización por electropulverización son la base necesaria para desarrollar una exitosa y sólida metodología LC-ESI-MS-q-ToF (q-ToF, cuadrupolo - tiempo de vuelo), y llegar a la exploración global y equilibrada del metaboloma plasmático. Durante el desarrollo de la metodología analítica reportada en esta Tesis Doctoral (Tulipani, et al. 2015), se evaluó minuciosamente diferentes puntos críticos durante la extracción de las muestras, la separación cromatográfica y los procedimientos de mejora ESI en la RP-LC-MS durante la adquisición de datos. El mejor rendimiento de extracción de la muestra se obtuvo a través de la combinación de la extracción híbrida por medio de extracción en fase sólida y una alta proporción de solvente orgánico con respecto la muestra. Este proceso es un paso crítico, puesto que una limpieza selectiva demasiado drástica de las muestras puede conducir a una mala cobertura del metaboloma y comprometer significativamente las variaciones sutiles del metaboloma en el análisis comparativo (Calbiani, et al. 2006; Ismaiel, et al. 2010; Lahaie, et al. 2010; Petkovic, et al. 2001). En un trabajo previo al realizado en esta Tesis Doctoral, se observó que la eliminación selectiva fosfolípidos asociados al efecto matriz es una alternativa más exitosa para la preparación de muestras de plasma que solamente la desproteínización (Tulipani, et al. 2013). En cuanto a las dos tecnologías de placas comparadas en la extracción híbrida, no se observaron cambios significativos en la identificación y detección de metabolitos, incluso en la evaluación de la mezcla de estándares QC2. Sin embargo, luego del análisis multivariante en la selección de fragmentos de masas discriminantes y, la posterior identificación de metabolitos, ciertos biomarcadores solo fueron identificados con el uso de la placa de extracción Ostro® (ver Tabla 5.1). Esta situación permitió por una parte afirmar que no se evidencia una pérdida de información biológicamente relevante durante la extracción de las muestras y, confirmar la importancia de

incluir un procedimiento de validación a través de un bioanálisis LC-MS/MS en la evaluación de una metodología analítica, con el fin de brindar mayor aproximación a los objetivos reales de los protocolos analíticos.

Generalmente, los extractos evaporados y posteriormente reconstituidos se incorporan habitualmente en los procedimientos de preparación de muestras, justificadas generalmente por la baja sensibilidad asociada a la concentración. Sin embargo, este paso “potencialmente riesgoso” es ampliamente compartidos con el riesgo de solubilización incompleta de los residuos secos y pérdidas de especies hidrofóbicas y volátiles, el aumento de supresión iónica debido a la pre-concentración de interferentes y, la reducción de rendimiento de la muestra debido a un considerable consumo de tiempo, y a la fecha, no hay evidencias sobre los beneficios reales en términos de cobertura del metaboloma (Fernández-Peralbo and Luque de Castro 2012).

En cuanto a la relación de dilución muestra:solvente durante la extracción, la relación con mayor proporción orgánica se asoció con una capacidad de extracción más alta de los metabolitos monitorizados, sin comprometer la detección y la forma de los picos. Aunque esta relación de dilución no es un parámetro absoluto para extrapolar su aplicación a diferentes procedimientos de extracción, nuestros resultados sugieren que la dilución de la muestra puede ser una opción valiosa para reducir el efecto matriz y aumentar la cobertura metaboloma.

El uso de la columna RP Atlantis T3 RP compatible con la fase acuosa inicial 100% se encontró como la mejor opción para maximizar la retención de los metabolitos polares. La sustitución de ACN acidificado por MeOH no acidificado como fase orgánica [B] produjo intensidades de señal de iones moleculares más fuertes, en ambos modos de ionización. Vale destacar que aunque la acidificación de las dos fases móviles del gradiente de elución es una técnica común en el análisis LC-UV, para evitar interrupciones importantes de referencia cuando se trabaja en longitudes de onda de baja absorbancia (es decir, 210 nm), esta regla no se aplica durante la adquisición de datos por LC-MS. El metanol además de mostrar la mejor

pulverización debido a sus propiedades fisicoquímicas como volatilidad y tensión superficial (baja constante dieléctrica y viscosidad), también se conoce por facilitar la elución de lípidos y evitar su acumulación en la columna (es decir, como acetona), que puede contribuir aún más a la minimización de los efectos de matriz (Gray, et al. 2012). Por otra parte, en comparación con disolventes nocivos, tales como el acetonitrilo, el metanol es una alternativa más "ambientalmente amigable" tanto para los trabajadores, los procesos y la seguridad del entorno (es decir, la ecotoxicidad) (Discenza, et al. 2010; Giorgianni, et al. 2004). El grado de pureza de los disolventes utilizados en la preparación de la fase móvil reveló ser un factor crucial en la detección de las señales de masa. Estos hallazgos subrayan la importancia de verificar los niveles de contaminantes en el disolvente, tales como plastificantes y tensoactivos, que son menudo fácilmente ionizables y pueden competir para la carga con los metabolitos (Roberts, et al. 2012).

Como último paso en el desarrollo de este protocolo analítico, la incorporación de una fase móvil orgánica post-columna de la fase móvil por enriquecimiento orgánico confirmó ser una solución pragmática para aumentar la eficiencia de ionización, sin influir en la separación cromatográfica, aunque no hay aplicaciones en estudios de metabolómica no dirigida (RPLC-ESI-MS) reportados hasta la fecha. El metanol no acidificado fue considerado como disolvente para la fase móvil orgánica post-columna por varias razones. El uso del mismo disolvente tanto en el sistema binario como en la fase móvil orgánica post-columna es sugerido como preferible, el uso de metanol no acidulado como fase orgánica [B] permitió obtener las intensidades de señal de iones moleculares más fuertes en ambos modos ESI. Aunque metanol y acetonitrilo son considerados adecuados como modificadores de la fase orgánica post-columna, debido a la disminución de la tensión superficial de gotas en la fuente de ESI que ayuda en la evaporación iónica, el metanol muestra algunas ventajas particulares respecto a acetonitrilo, tales como una presión de vapor más alta y una tensión superficial más baja, lo que facilita la evaporación incluso en presencia de más disolvente.

En resumen, los resultados de este trabajo ha llevado a las siguientes consideraciones: i). las muestras de plasma se deben pasar por extracción híbrida para eliminar componentes interferentes y, minimizar el efecto matriz dependiente de la muestra; ii). la evaporación del disolvente después de la extracción de la muestra puede ser eliminado del protocolo si se nota ninguna distorsión en la forma de los picos de metabolitos de elución temprana; iii). una columna RP para la retención superior de especies altamente polares debe ser seleccionada cuando el análisis por fraccionamiento no es factible; iv). la eficiencia del sistema ESI puede ser mejorada mediante el uso de disolventes con grado de calidad UHPLC-MS y, la incorporación de un sistema de fase móvil orgánica post-columna. El protocolo finalizado propuesto en este estudio, ofrece un ejemplo de cómo novedosas y tradicionales soluciones analíticas pueden co-existir en la exploración de huellas metabólicas a través de estudios metabolómicos no dirigidos (LC-ESI-MS) de forma rápida y sencilla de biomatrices complejas de gran envergadura.

6.2 Evaluación de la exposición a frutos secos en diferentes biofluidos y diseños de estudio

Uno de los desafíos más importantes en el campo de la investigación nutricional es la evaluación precisa del estado metabólico de los individuos tras la ingesta de determinados alimentos (Jenab, et al. 2009). Esta evaluación permite elucidar las posibles interacciones entre la trilogía salud-dieta-enfermedad, donde la dieta (o alguno de sus componentes) actúa como un factor modulador y preventivo en el estado salud-enfermedad. Un primer paso en esta compleja interpretación es asegurar la exposición a la dieta. En este punto, los biomarcadores nutricionales juegan un papel clave como indicadores específicos de la exposición de un determinado alimento que resulta de su absorción, digestión, metabolismo y biodisponibilidad biológica (Corella and Ordovas 2015; Hedrick, et al. 2012). Recientemente, la metabolómica nutricional o nutrimental se está posicionando cada vez con más fuerza como una herramienta potencial en el

descubrimiento, identificación y caracterización de nuevos biomarcadores nutricionales responsables de los efectos en la salud (Gibbons, et al. 2015; O'Gorman, et al. 2013; Odriozola and Corrales 2015). La validación de estos biomarcadores nutricionales en diferentes poblaciones y con diseños de estudios diferentes, es indispensable para garantizar su poder discriminante y predictivo relacionado con la exposición a la dieta, establecer las relaciones de causalidad entre la exposición y el estado clínico y, posibilitar intervenciones nutricionales más eficaces de acuerdo con las características de la población (Scalbert, et al. 2014b).

La identificación de los biomarcadores nutricionales reportados tras la ingesta de frutos secos en esta Tesis Doctoral, responden a la evaluación de dos aspectos cruciales diferentes: muestras biológicas analizadas (plasma y orina) y diseños de estudios diferentes (estudios de intervención y de cohorte), los cuales corresponden respectivamente a la exploración del metaboloma plasmático en un estudio de intervención controlado (estudio EFINUT) y, a la exploración del metaboloma urinario en un estudio epidemiológico de cohorte (estudio InCHIANTI).

Matrices biológicas como plasma y orina aunque presentan características diferentes, son complementarias al momento de establecer interpretaciones biológicas. Interesantemente, la exploración del metaboloma urinario ha demostrado reflejar una mayor concentración de metabolitos derivados de los alimentos que otras matrices biológicas (Scalbert, et al. 2014b). Sin embargo, la exploración del metaboloma sanguíneo refleja información biológica relevante acerca de los cambios fisiopatológicos, tanto en el metabolismo endógeno como exógeno, biodisponibilidad y bioaccesibilidad de metabolitos tras una ingesta de alimentos (Psychogios, et al. 2011; Rappaport, et al. 2014). La metodología analítica aplicada en la exploración del metaboloma urinario fue previamente validada en el grupo de investigación (Llorach, et al. 2009; Tulipani, et al. 2011). Aunque se ha demostrado que las muestras de orina 24 horas son el método más robusto para monitorizar la ingesta dietética en comparación a una muestra de

orina puntual (Zamora-Ros, et al. 2011), en estudios epidemiológicos o de cohorte (estudio InCHIANTI) la recolección de muestras de orina 24 h es proceso complejo y poco práctico (Potischman 2003). Por lo tanto, la replicación de los biomarcadores de exposición a frutos secos, caracterizados en un primer momento en un estudio de intervención (estudio EFINUT) en muestras de plasma en ayunas (Mora-Cubillos, et al. 2015) y orina 24 h (Tulipani, et al. 2011), fueron identificados en muestras de orina puntuales en el estudio InCHIANTI. Estos resultados aumentan el nivel de evidencia, robustez y capacidad discriminante y predictiva de los biomarcadores de exposición a frutos secos identificados, independiente de la muestra biológica analizada y la población participante en el estudio.

Por otra parte, la exploración del *food metabolome* tras la ingesta de frutos secos en diferentes diseños de estudio: de intervención (estudio EFINUT) y de cohorte (estudio InCHIANTI), aportó evidencias interesantes en relación a la sensibilidad y la especificidad de los biomarcadores de exposición identificados (Scalbert, et al. 2014b), donde uno de los factores más importantes que diferenciaron a los dos estudios fue el control de la dieta. En el estudio EFINUT, se realiza una intervención de 30 g/d de una mezcla de frutos secos durante 12 semanas, mientras que en el estudio InCHIANTI se realizó la estimación de la frecuencia de consumo en tiempo basal de acuerdo con el FFQ. En este sentido, biomarcadores identificados en estudios de intervención controlados y en paralelo pueden registrar una baja especificidad al ser aplicados en estudios epidemiológicos (o de cohorte) y, de igual manera, registrar estos biomarcadores de exposición una baja sensibilidad en estudios epidemiológicos debido al bajo control de la dieta, interacción entre alimentos o presencia de alimentos con metabolitos de la misma naturaleza, situación que puede aumentar el riesgo de falsos positivos. En el estudio InCHIANTI, *trans-resveratrol* fue identificado como biomarcador discriminante de ingesta de frutos secos de acuerdo con la frecuencia de consumo reportada en el FFQ. Sin embargo, este biomarcador es ampliamente conocido como indicador de consumo de vino. Al comparar entre los grupos (NC vs WK) según consumo de vino se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, *trans-resveratrol-4'-sulfato* es reportado como falso positivo y,

confirma la hipótesis de la alteración de la sensibilidad de un biomarcador identificado únicamente en estudios epidemiológicos o de cohorte.

Por lo tanto, la replicación de biomarcadores en diseños de estudios diferentes, pasando preferiblemente de estudios de intervención controlados a estudios epidemiológicos observacionales, es una estrategia indispensable en la valoración de la sensibilidad y especificidad de un biomarcador de exposición dietética (Andersen 2013). En ambos estudios, biomarcadores derivados de la microbiota intestinal (metabolitos derivados de elagitaninos) y biomarcadores de metabolismo de ácidos grasos fueron considerados en los dos estudios, los biomarcadores más discriminantes (según valor VIP) de exposición a frutos secos, independiente de la cantidad (g/d) de alimento ingerido.

6.3 Evaluación de la capacidad discriminante de los biomarcadores de exposición a frutos secos

Tradicionalmente la ingesta ha sido evaluada a través de herramientas como el FFQ, llamadas 24 horas o recordatorios de consumo. Estos métodos se han caracterizado por presentar errores sistemáticos que pueden estar asociados a la recolección sesgada de la información (Corella and Ordovas 2015; Gibbons, et al. 2015). Los biomarcadores metabolómicos se presentan como una alternativa viable en la determinación de la exposición real a un determinado alimento (Scalbert, et al. 2014b). Para considerar a un biomarcador como discriminante frente a la exposición de frutos secos, diferentes aspectos biológicos y analíticos se deben tener en cuenta (Andersen 2013). A través de los estudios presentados en esta Tesis Doctoral, seis aspectos biológicos: i). relación conocida con la exposición, ii). sensibilidad y especificidad; iii). dosis-respuesta; iv). variación interindividual; v). tiempo de exposición; vi). población) y dos aspectos analíticos: i). muestra; ii). validación de método, fueron considerados en la evaluación de los biomarcadores discriminantes a la exposición a frutos secos.

Interesantemente, la urolitina A glucurónido se ha reportado como el biomarcador de exposición a frutos secos con mayor sensibilidad y especificidad de acuerdo con las curvas ROC tanto en el estudio de intervención (estudio EFINUT) como en el estudio de cohorte (estudio InCHIANTI) y, ha sido identificada tanto en muestras biológicas de plasma (Mora-Cubillos, et al. 2015) como de orina (Tulipani, et al. 2011), independiente del tiempo de exposición (ya sea por una ingesta crónica o por un consumo habitual) y, en poblaciones con una alta variabilidad interindividualidad producto de factores como género, edad, ubicación geográfica y diferentes grados de alteraciones metabólicas (presencia de diferentes criterios diagnósticos de síndrome metabólico).

La relación dosis-respuesta también fue evaluada. La frecuencia de consumo de frutos secos registrada en el FFQ de los participantes del estudio de cohorte fue relacionada con el conjunto de biomarcadores identificados como discriminantes de la exposición de frutos secos. Los diferentes modelos Tobit, construidos con el fin de seleccionar un conjunto de biomarcadores discriminantes que dan respuesta a los datos de ingesta, hasta el modelo con el número más reducido de biomarcadores discriminantes de exposición a frutos secos, la urolitina A glucurónido estaba incluida. Este resultado permite no sólo aumentar el nivel de evidencias reportadas para este biomarcador como discriminante de frutos secos, sino que también confirma la importancia de evaluar la relación dosis-respuesta en estudios observacionales ya que existe una alta probabilidad de falsos positivos en este tipo de diseños de estudio diferentes el papel decisivo de biomarcadores (Scalbert, et al. 2014b).

6.4 Huellas metabólicas de biomarcadores de exposición a frutos secos

Básicamente, los biomarcadores reportados en estos estudios de intervención, corresponden claramente a dos rutas metabólicas diferenciadas. Los biomarcadores derivados del metabolismo de los polifenoles por acción de la

microbiota intestinal y, los biomarcadores del metabolismo de los ácidos grasos, corresponde a los dos grupos más representativas de biomarcadores de exposición a frutos secos reportados en esta tesis Doctoral.

6.4.1 Biomarcadores de co-metabolismo de microbiota intestinal-huespéd de los polifenoles de frutos secos

Los frutos secos son una fuente rica de diferentes clases de polifenoles, como los taninos hidrolizables (por ejemplo, ETs) y taninos condensados (por ejemplo, proantocianidinas en avellanas y almendras), que contribuyen a la composición peculiar de estos frutos y, posiblemente, a sus beneficios para la salud (Garcia-Munoz and Vaillant 2014). Las nueces, en particular, son consideradas como una fuente importante de ETs en las regiones del Mediterráneo, donde el consumo de nueces por persona es relativamente alto en comparación con otros países (Jenab, et al. 2006), en relación con otras fuentes de ETs como las bayas y la granada.

Se sabe que estos polifenoles de alto peso molecular son sometidos a una biotransformación a través de la microbiota, que es responsable de la producción de bioactivos más pequeños, urolitinas (derivados dibenzopirano-6-ona con diferentes sustituciones hidroxilo), los cuales se caracterizan por presentar mayor biodisponibilidad y actualmente estos compuestos están implicados en la protección contra el riesgo de enfermedades cardiometabólicas (Selma, et al. 2014a; Selma, et al. 2014b). Tal como se mencionó anteriormente, la urolitina A glucurónido fue el marcador más discriminante en los dos estudios diferentes (VIP > 4). Una gama de estructuras conjugadas de urolitinas también se han descrito e identificado en el estudio de cohorte como urolitina A, urolitina A glucurónido, urolitina A sulfato, urolitina A sulfoglucurónido, urolitina B y urolitina B glucurónido, las cuales son producto del co-metabolismo microbiano-huésped del co-metabolismo de ETs (ver **Figura 6.1**) y las formas más estables y detectables en se han reportado en muestras de orina y plasma (Tomas-Barberan, et al. 2014). En plasma, las urolitinas conjugadas se han descrito anteriormente para hacer circular a concentraciones que van desde nanomolar a micromolar baja (dentro de la gama

de sensibilidad de análisis ToF-MS) (Espin, et al. 2013; Seeram, et al. 2006), y la urolitina A glucurónico se detectó especialmente en plasma de un voluntario humano después de una ingesta de nueces hasta 20 h después (Pfundstein, et al. 2014). Sin embargo, la mayoría de los datos disponibles se extrapolaron no solo en sujetos sanos, sino también en individuos con síndrome metabólico (Pfundstein, et al. 2014; Puupponen-Pimia, et al. 2013).

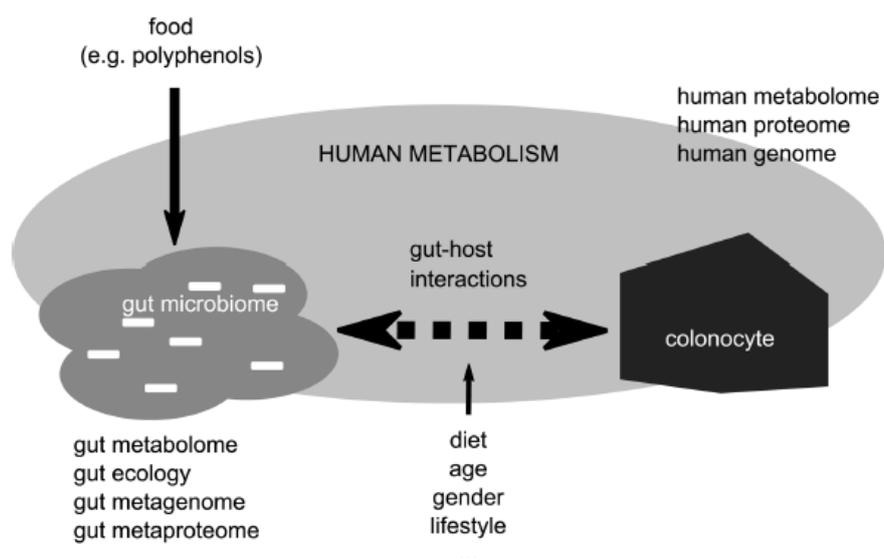


Figura 6.1. Interacción entre microbiota intestinal-huésped como una contribución combinada en el metabolismo humano tras la ingesta de alimentos ricos en polifenoles como los frutos secos. Diferentes factores se relacionan en la biología de sistemas en los cuales la variabilidad interindividual es indispensable al estudiar el impacto de la alimentación en la salud.

Tomado de: Moco, et al. 2012.

Aunque la naturaleza analítica de una aproximación metabolómica no dirigida (no selectiva ni específica) y su alcance (enfoque impulsado por los datos y generación de hipótesis), los resultados reportados en la exploración de la huella metabólica en los estudios reportados se encuentran en concordancia con resultados anteriores. En general, nuestros hallazgos observados coinciden con los cambios detectados en todo el metaboloma urinario de los mismos sujetos en el estudio, como se ha descrito recientemente (Tulipani, et al. 2011), a pesar del cambio de matriz biológica analizada y función fisiológica de los diferentes biofluidos.

6.4.2 Biomarcadores del metabolismo de ácidos grasos

La presencia de ácidos dicarboxílicos en frutos secos del Mediterráneo como nueces, almendras y avellanas, se han reportado recientemente (Dembitsky, et al. 2002; Tulipani, et al. 2011). Tanto el ácido dodecanodioico (C12) como el ácido sebácico (C10) fueron identificados en el metaboloma plasmático como biomarcadores de exposición para el primero y de efecto para el segundo. En el caso del metaboloma urinario, solamente fue reportado el ácido dodecanodioico, por tanto puede afirmarse razonablemente que este ácido es un biomarcador directo de la ingesta de frutos secos. Sin embargo, su origen endógeno también ha sido descrito a través del metabolismo de β - y ω -oxidación de MUFA y PUFA, altamente contenida en los frutos secos, no puede ser descartada (Mingrone and Castagneto 2006; Ros 2010) y podría explicar en parte los efectos en la salud de los lípidos de los frutos secos (Eckel, et al. 2014; Salas-Salvado, et al. 2014)[3, 51].

6.5 Relación entre biomarcadores de exposición y estado clínico

La importancia biológica de las urolitinas ha sido ampliamente reportada en investigaciones recientes, especialmente a través de experimentos *in vitro*, en los cuales se asocia a otros compuestos bioactivos con propiedades anti-inflamatorias, anti-cancerígenas, anti-microbianas y como potenciales prebióticos selectivos (Espin, et al. 2013; Garcia-Munoz and Vaillant 2014; Sanchez-Gonzalez, et al. 2015). Sin embargo, estudios en humanos en los cuales se evidencie una relación entre su producción *in vivo* con parámetros asociados al estado clínico como obesidad abdominal y control glucémico, alteraciones características del síndrome metabólico, es un campo reciente en la investigación clínica y donde uno de los trabajos reportados en esta Tesis Doctoral (estudio EFINUT) aporta de manera significativa. Las urolitinas al ser un producto del metabolismo entre la microbiota intestinal y el huésped tras la ingesta de alimentos ricos en elagitaninos, como los frutos secos, se evaluó, como en un segundo momento, si la exposición sistémica a

urolitina A glucurónido estaba influenciada por los rasgos de síndrome metabólico, que se sabe alteran la microbiota intestinal (Ussar, et al. 2015; Xiao, et al. 2014).

Estos resultados permitieron generar la hipótesis de que los sujetos con niveles más bajos de obesidad abdominal y resistencia a la insulina, pueden tener un perfil en la microbiota “más saludable” que se adapte a la biotransformación de los compuestos fenólicos tales como los derivados de elagitaninos de los frutos secos. En su conjunto, las asociaciones observadas evidencian el papel crucial de la comunidad microbiana intestinal en la modulación de la producción y la biodisponibilidad de los polifenoles bioactivos de la dieta. Estas evidencias sugieren que los procesos de biotransformación de los elagitaninos en urolitinas son compartidos entre la maquinaria enzimática y la comunidad microbiana intestinal, sin embargo, todavía se conoce poco acerca de las cepas específicas responsables de la producción urolitinas (Selma, et al. 2014a; Selma, et al. 2014b; Tomas-Barberan, et al. 2014). Al mismo tiempo, recientes investigaciones han demostrado el rol clave de la microbiota intestinal en estados patológicos asociados a la obesidad, especialmente a la obesidad abdominal (Escobedo, et al. 2014) y, la importancia de la caracterización de su perfil en un estado de disbiosis durante el abordaje de su tratamiento (Casen, et al. 2015; Miglioranza Scavuzzi, et al. 2015). Estas evidencias en su conjunto abren nuevas hipótesis en la exploración del papel de la dieta y las interacciones entre huésped-microbiota, la capacidad de predicción de respuesta interindividual a una intervención nutricional de acuerdo a condiciones de disfuncionalidad en la microbiota intestinal (fenotipos) y, los posibles efectos asociados a la salud cardiometabólica. En consecuencia, no existen datos actualizados sobre el impacto que la disbiosis intestinal microbiana y la co-modulación de alteraciones metabólicas en la exposición sistémica a estos polifenoles bioactivos a partir de los frutos secos. Se requiere urgentemente más investigación con el objetivo de evaluar la prevalencia de bacterias productoras de urolitinas en el intestino de sujetos metabólicamente sanos en comparación con sujetos que presenten alteraciones metabólicas.

6.6 Perspectivas de futuro. Reflexiones

- Avanzar en la estandarización de protocolos metabolómicos entre diferentes grupos de investigación (en lo posible, a nivel mundial), con el fin de garantizar la calidad en las condiciones metodológicas que permitan la posterior comparación de resultados según variabilidad de diseños de estudio aplicados.
- Optimizar y diversificar las estrategias en las etapas del flujo de trabajo en metabolómica posteriores a la adquisición de datos. En primer lugar, la etapa de identificación (punto crítico) lo cual permitiría reducir el número de biomarcadores no identificados y, en segundo lugar, la etapa de interpretación biológica a través, por ejemplo, de la aplicación de modelos de predicción.
- Explorar posibles diferencias en la respuesta a la ingesta de frutos secos (fenotipos productores/excretors de urolitinas) en función de distintas condiciones fisiopatológicas y características antropométricas, demográficas y de sujetos en poblaciones sin control de dieta.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los diferentes estudios reportados en esta Tesis Doctoral derivan en las siguientes conclusiones:

- Se ha desarrollado y validado una metodología analítica para la exploración del metaboloma plasmático desde un enfoque no dirigido, la cual ha permitido detectar los cambios en el perfil metabólico humano tras una intervención nutricional de frutos secos.
- La urolitina A glucurónido (metabolito derivado del metabolismo de polifenoles por acción de la microbiota intestinal) y el ácido dodecanodioico (biomarcador derivado del metabolismo de ácidos grasos dicarboxílicos) han sido identificados como los biomarcadores plasmáticos más discriminantes de exposición a frutos secos en un estudio de intervención con valores VIP en la selección de *señales de masa* discriminantes de 4.47 y 2.61 y áreas bajo la curva (AUC) de 0.896 y 0.837, respectivamente.
- La exploración del metaboloma urinario desde una aproximación no dirigida de sujetos en condición de vida libre (sin control de la dieta), permitió la identificación de catorce biomarcadores asociados al consumo de frutos secos, de los cuales seis corresponden a derivados del metabolismo de fase II de los elagitaninos por acción de la microbiota intestinal, dos metabolitos derivados del metabolismo del triptófano, dos biomarcadores producto del metabolismo de los ácidos grasos (ácidos dicarboxílicos), un biomarcador derivado de salicilatos, otro derivado del metabolismo de la fenilalanina y, los dos últimos, derivados del metabolismo de polifenoles diferentes a los elagitaninos por acción de la microbiota intestinal.
- Los biomarcadores de exposición a frutos secos identificados en el estudio de intervención han sido replicados en el estudio observacional (estudio de cohorte), lo cual ha permitido aportar nuevas evidencias en la validación de estos biomarcadores discriminantes a la exposición de frutos secos y, confirmar

su detección independiente de la población (aplicado en dos diseños de estudios diferentes) y la muestra biológica analizada (plasma y orina).

- La urolitina A glucurónido se reportó como uno de los biomarcadores metabolómicos urinarios de exposición a frutos secos que se asocia con mayor potencia estadística ($\Pr(|z|) < 0.01$, a través de la aplicación de modelos predictivos Tobit) con el registro de ingesta habitual de frutos secos según el cuestionario validado de frecuencia de consumo de alimentos en una población no controlada, lo cual ha permitido acrecentar el poder predictivo y discriminante de este biomarcador como indicador de exposición a frutos secos, a pesar de ser un metabolito derivado de la biotransformación de la microbiota intestinal que puede llevar consigo un componente de variabilidad interindividual.
- Además, los niveles de urolitina A glucurónido detectados en muestras de plasma tras la intervención con frutos secos, a través del análisis semi-cuantitativo propio de la metabolómica no dirigida, están inversamente correlacionados con el estado clínico de sujetos con síndrome metabólico al inicio del estudio. Estos resultados han permitido generar nuevas hipótesis acerca de que sujetos con alteraciones metabólicas menos severas de síndrome metabólico como la adiposidad abdominal (circunferencia de cintura e índice cintura-cadera) y el control glucémico (insulina en ayunas y HOMA-IR) pueden presentar un perfil de microbiota intestinal diferente, “más saludable”, que les permite biotransformar elagitaninos en compuestos biológicamente activos como las urolitinas y, aumentar su biodisponibilidad y bioaccesibilidad en comparación con sujetos que presenten alteraciones metabólicas más severas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, L. T., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2010). Comparison of phenol content and antioxidant capacity of nuts. *Food Science and Technology (Campinas)*, *30*, 254-259.
- Alasalvar, C., & Bolling, B. W. (2015). Review of nut phytochemicals, fat-soluble bioactives, antioxidant components and health effects. *The British journal of nutrition*, *113 Suppl 2*, S68-78.
- Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2009). Natural antioxidants in tree nuts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(11), 1056-1062.
- Albert, C. M., Gaziano, J. M., Willett, W. C., & Manson, J. E. (2002). Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Archives of Internal Medicine*, *162*(12), 1382-1387.
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., . . . Smith, S. C., Jr. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, *120*(16), 1640-1645.
- Alonso, A., Marsal, S., & Julia, A. (2015). Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *3*, 23.
- Andersen, M. B. (2013). *Discovery of food exposure markers in urine and evaluation of dietary compliance by untargeted LC-MS metabolomics*. [Tesis doctoral]. University of Copenhagen, Copenhagen.
- Andersen, M. B., Kristensen, M., Manach, C., Pujos-Guillot, E., Poulsen, S. K., Larsen, T. M., . . . Dragsted, L. (2014). Discovery and validation of urinary exposure markers for different plant foods by untargeted metabolomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(7), 1829-1844.
- Banel, D. K., & Hu, F. B. (2009). Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis and systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, *90*(1), 56-63.
- Barbagallo, M., Dominguez, L. J., Galioto, A., Ferlisi, A., Cani, C., Malfa, L., . . . Paolisso, G. (2003). Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Molecular Aspects of Medicine*, *24*(1-3), 39-52.
- Bes-Rastrollo, M., Sabate, J., Gomez-Gracia, E., Alonso, A., Martinez, J. A., & Martinez-Gonzalez, M. A. (2007). Nut consumption and weight gain in a Mediterranean cohort: The SUN study. *Obesity*, *15*(1), 107-116.
- Bes-Rastrollo, M., Wedick, N. M., Martinez-Gonzalez, M. A., Li, T. Y., Sampson, L., & Hu, F. B. (2009). Prospective study of nut consumption, long-term weight change, and obesity risk in women. *The American journal of clinical nutrition*, *89*(6), 1913-1919.
- Bijlsma, S., Bobeldijk, L., Verheij, E. R., Ramaker, R., Kochhar, S., Macdonald, I. A., . . . Smilde, A. K. (2006). Large-scale human metabolomics studies: A strategy for data (pre-) processing and validation. *Analytical Chemistry*, *78*(2), 567-574.
- Bingham, S. A. (1991). Limitations of the various methods for collecting dietary intake data. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *35*(3), 117-127.
- Bingol, K., Bruschiweiler-Li, L., Li, D., Zhang, B., Xie, M., & Bruschiweiler, R. (2016). Emerging new strategies for successful metabolite identification in metabolomics. *Bioanalysis*, *8*(6), 557-73.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *69*(3), 89-95.
- Blanco Mejia, S., Kendall, C. W., Viguiliouk, E., Augustin, L. S., Ha, V., Cozma, A. I., . . . Sievenpiper, J. L. (2014). Effect of tree nuts on metabolic syndrome criteria: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ open*, *4*(7), e004660.
- Bolca, S., Van de Wiele, T., & Possemiers, S. (2013). Gut metabolotypes govern health effects of dietary polyphenols. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(2), 220-225.

- Bolling, B. W., Chen, C. Y., McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2011). Tree nut phytochemicals: composition, antioxidant capacity, bioactivity, impact factors. A systematic review of almonds, Brazils, cashews, hazelnuts, macadamias, pecans, pine nuts, pistachios and walnuts. *Nutrition research reviews*, 24(2), 244-275.
- Bowen, B. P., & Northen, T. R. (2010). Dealing with the Unknown: Metabolomics and Metabolite Atlases. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(9), 1471-1476.
- Brown, M., Dunn, W. B., Dobson, P., Patel, Y., Winder, C. L., Francis-McIntyre, S., . . . Kell, D. B. (2009). Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst*, 134(7), 1322-1332.
- Brufau, G., Boatella, J., & Rafecas, M. (2006). Nuts: source of energy and macronutrients. *The British journal of nutrition*, 96 Suppl 2, S24-28.
- Calbani, F., Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., & Zagnoni, I. (2006). Matrix effects on accurate mass measurements of low-molecular weight compounds using liquid chromatography-electrospray-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry: JMS*, 41(3), 289-294.
- Casas-Agustench, P., Bullo, M., Ros, E., Basora, J., & Salas-Salvado, J. (2011). Cross-sectional association of nut intake with adiposity in a Mediterranean population. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 21(7), 518-525.
- Casas-Agustench, P., Bullo, M., & Salas-Salvado, J. (2010). Nuts, inflammation and insulin resistance. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 19(1), 124-130.
- Casas-Agustench, P., Lopez-Uriarte, P., Bullo, M., Ros, E., Cabre-Vila, J. J., & Salas-Salvado, J. (2011). Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 21(2), 126-135.
- Casas-Agustench, P., Lopez-Uriarte, P., Ros, E., Bullo, M., & Salas-Salvado, J. (2011). Nuts, hypertension and endothelial function. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 21 Suppl 1, S21-33.
- Casen, C., Vebo, H. C., Sekelja, M., Hegge, F. T., Karlsson, M. K., Cierniejewska, E., . . . Rudi, K. (2015). Deviations in human gut microbiota: a novel diagnostic test for determining dysbiosis in patients with IBS or IBD. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 42(1), 71-83.
- Castillo, S., Gopalacharyulu, P., Yetukuri, L., & Orešič, M. (2011). Algorithms and tools for the preprocessing of LC-MS metabolomics data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 108(1), 23-32.
- Claus, S. P., & Swann, J. R. (2013). Nutrimetabonomics: applications for nutritional sciences, with specific reference to gut microbial interactions. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 381-399.
- Coles, S. J., Day, N. E., Murray-Rust, P., Rzepa, H. S., & Zhang, Y. (2005). Enhancement of the chemical semantic web through the use of InChI identifiers. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(10), 1832-1834.
- Corella, D., & Ordovas, J. M. (2015). Biomarkers: background, classification and guidelines for applications in nutritional epidemiology. *Nutricion Hospitalaria*, 31 Suppl 3, 177-188.
- Damasceno, N. R., Sala-Vila, A., Cofan, M., Perez-Heras, A. M., Fito, M., Ruiz-Gutierrez, V., . . . Ros, E. (2013). Mediterranean diet supplemented with nuts reduces waist circumference and shifts lipoprotein subfractions to a less atherogenic pattern in subjects at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 230(2), 347-353.
- de Raad, M., Fischer, C. R., & Northen, T. R. (2016). High-throughput platforms for metabolomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 30, 7-13.
- Deleuze, P. (2006). *Legislación Alimentaria: Código Alimentario Español y Disposiciones Complementarias* (7a ed.). Madrid.
- Dembitsky, V. M., Goldshlag, P., & Srebnik, M. (2002). Occurrence of dicarboxylic (dioic) acids in some Mediterranean nuts. *Food chemistry*, 76(4), 469-473.

- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51-78.
- Discenza, L., D'Arienzo, C., Olah, T., & Jemal, M. (2010). LC-MS/MS method using unbonded silica column and aqueous/methanol mobile phase for the simultaneous quantification of a drug candidate and co-administered metformin in rat plasma. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 878(19), 1583-1589.
- Djousse, L., Rudich, T., & Gaziano, J. M. (2009). Nut consumption and risk of hypertension in US male physicians. *Clinical Nutrition*, 28(1), 10-14.
- Dunn, W., Erban, A., Weber, R. M., Creek, D., Brown, M., Breitling, R., . . . Viant, M. (2013). Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, 9(1), 44-66.
- Dunn, W. B., Bailey, N. J., & Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, 130(5), 606-625.
- Eckel, R. H., Alberti, K. G., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2010). The metabolic syndrome. *Lancet*, 375(9710), 181-183.
- Eckel, R. H., Jakicic, J. M., Ard, J. D., de Jesus, J. M., Houston Miller, N., Hubbard, V. S., . . . Yanovski, S. Z. (2014). 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(25 Pt B), 2960-2984.
- EFSA. (2016). General scientific guidance for stakeholders on health claim applications. [en línea, consulta: 13 abril 2016]. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4367.pdf.
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to walnuts and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1156, 1158) and improvement of endothelium-dependent vasodilation (ID 1155, 1157) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2074. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2074.
- Eliasson, M., Rannar, S., & Trygg, J. (2011). From data processing to multivariate validation--essential steps in extracting interpretable information from metabolomics data. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(7), 996-1004.
- Elosua, R., Marrugat, J., Molina, L., Pons, S., & Pujol, E. (1994). Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *American Journal of Epidemiology*, 139(12), 1197-1209.
- Eriksson, L; Johansson, E; Kettaneh-Wold, J; Trygg, J; Wikström, C; Wold, S.. (2006). *Multi- and Megavariate Data Analysis principles and Applications*. Umetrics. ISBN: 978-91-973730-2-9.
- Escobedo, G., Lopez-Ortiz, E., & Torres-Castro, I. (2014). Gut microbiota as a key player in triggering obesity, systemic inflammation and insulin resistance. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 66(5), 450-459.
- Espin, J. C., Larrosa, M., Garcia-Conesa, M. T., & Tomas-Barberan, F. (2013). Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2013, 270418.
- Esposito, K., Kastorini, C. M., Panagiotakos, D. B., & Giugliano, D. (2013). Mediterranean diet and metabolic syndrome: an updated systematic review. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 14(3), 255-263.
- Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., Corella, D., Salas-Salvado, J., Ruiz-Gutierrez, V., Covas, M. I., . . . Ros, E. (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145(1), 1-11.

-
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M. I., Corella, D., Aros, F., . . . Martinez-Gonzalez, M. A. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *The New England journal of medicine*, *368*(14), 1279-1290.
- FAOSTAT. (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. [en línea, consulta: 13 abril 2016]. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/browse/FB/CC/E>.
- Fardet, A., Llorach, R., Orsoni, A., Martin, J. F., Pujos-Guillot, E., Lapierre, C., & Scalbert, A. (2008). Metabolomics provide new insight on the metabolism of dietary phytochemicals in rats. *Journal of Nutrition*, *138*(7), 1282-1287.
- Fernandez-Albert, F., Llorach, R., Andres-Lacueva, C., & Perera-Lluna, A. (2014). Peak aggregation as an innovative strategy for improving the predictive power of LC-MS metabolomic profiles. *Analytical Chemistry*, *86*(5), 2320-2325.
- Fernandez-Albert, F., Llorach, R., Andres-Lacueva, C., & Perera, A. (2014). An R package to analyse LC/MS metabolomic data: MAIT (Metabolite Automatic Identification Toolkit). *Bioinformatics*, *30*(13), 1937-1939.
- Fernandez-Montero, A., Bes-Rastrollo, M., Beunza, J. J., Barrio-Lopez, M. T., de la Fuente-Arrillaga, C., Moreno-Galarraga, L., & Martinez-Gonzalez, M. A. (2013). Nut consumption and incidence of metabolic syndrome after 6-year follow-up: the SUN (Seguimiento Universidad de Navarra, University of Navarra Follow-up) cohort. *Public health nutrition*, *16*(11), 2064-2072.
- Fernández-Peralbo, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2012). Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *41*(0), 75-85.
- Ferrucci, L., Bandinelli, S., Benvenuti, E., Di Iorio, A., Macchi, C., Harris, T. B., & Guralnik, J. M. (2000). Subsystems contributing to the decline in ability to walk: bridging the gap between epidemiology and geriatric practice in the InCHIANTI study. *Journal of the American Geriatrics Society*, *48*(12), 1618-1625.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*, *48*(1-2), 155-171.
- Flores-Mateo, G., Rojas-Rueda, D., Basora, J., Ros, E., & Salas-Salvado, J. (2013). Nut intake and adiposity: meta-analysis of clinical trials. *The American journal of clinical nutrition*, *97*(6), 1346-1355.
- Fraser, G. E., Sabate, J., Beeson, W. L., & Strahan, T. M. (1992). A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. The Adventist Health Study. *Archives of Internal Medicine*, *152*(7), 1416-1424.
- Fuhrer, T., & Zamboni, N. (2015). High-throughput discovery metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, *31*, 73-78.
- Gao, H. X., Regier, E. E., & Close, K. L. (2016). International Diabetes Federation World Diabetes Congress 2015 (IDF 2015). *Journal of Diabetes*.
- Garcia-Aloy, M., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Tulipani, S., Estruch, R., Martinez-Gonzalez, M. A., . . . Andres-Lacueva, C. (2014). Novel multimetabolite prediction of walnut consumption by a urinary biomarker model in a free-living population: the PREDIMED study. *Journal of Proteome Research*, *13*(7), 3476-3483.
- Garcia-Munoz, C., & Vaillant, F. (2014). Metabolic fate of ellagitannins: implications for health, and research perspectives for innovative functional foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, *54*(12), 1584-1598.
- Gibbons, H., O'Gorman, A., & Brennan, L. (2015). Metabolomics as a tool in nutritional research. *Current Opinion in Lipidology*, *26*(1), 30-34.
- Gibney, M. J., Walsh, M., Brennan, L., Roche, H. M., German, B., & van Ommen, B. (2005). Metabolomics in human nutrition: opportunities and challenges. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(3), 497-503.
- Gika, H. G., Theodoridis, G. A., Earll, M., & Wilson, I. D. (2012). A QC approach to the determination of day-to-day reproducibility and robustness of LC-MS methods for

- global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *Bioanalysis*, 4(18), 2239-2247.
- Gika, H. G., Wilson, I. D., & Theodoridis, G. A. (2014). LC-MS-based holistic metabolic profiling. Problems, limitations, advantages, and future perspectives. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 966, 1-6.
- Giorgianni, F., Cappiello, A., Beranova-Giorgianni, S., Palma, P., Trufelli, H., & Desiderio, D. M. (2004). LC-MS/MS analysis of peptides with methanol as organic modifier: improved limits of detection. *Analytical Chemistry*, 76(23), 7028-7038.
- Gonzalez-Barrio, R., Truchado, P., Ito, H., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2011). UV and MS identification of Urolithins and Nasutins, the bioavailable metabolites of ellagitannins and ellagic acid in different mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1152-1162.
- Gray, M. J., Jahani, S., & Low, G. K. (2012). Effect of methanol quality on the ionisation of herbicides, insecticides and fungicides using gradient elution liquid chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1219, 83-92.
- Gromski, P. S., Muhamadali, H., Ellis, D. I., Xu, Y., Correa, E., Turner, M. L., & Goodacre, R. (2015). A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis--a marriage of convenience or a shotgun wedding. *Analytica Chimica Acta*, 879, 10-23.
- Grosso, G., & Estruch, R. (2016). Nut consumption and age-related disease. *Maturitas*, 84, 11-16.
- Guertin, K. A., Moore, S. C., Sampson, J. N., Huang, W. Y., Xiao, Q., Stolzenberg-Solomon, R. Z., . . . Cross, A. J. (2014). Metabolomics in nutritional epidemiology: identifying metabolites associated with diet and quantifying their potential to uncover diet-disease relations in populations. *The American journal of clinical nutrition*, 100(1), 208-217.
- Guo, K., Zhou, Z., Jiang, Y., Li, W., & Li, Y. (2014). Meta-analysis of prospective studies on the effects of nut consumption on hypertension and type 2 diabetes mellitus. *Journal of diabetes*, 7(2), 202-12.
- Gupta, R. S., Chen, W. J., Adeolu, M., & Chai, Y. (2013). Molecular signatures for the class Coriobacteriia and its different clades; proposal for division of the class Coriobacteriia into the emended order Coriobacteriales, containing the emended family Coriobacteriaceae and Atopobiaceae fam. nov., and Eggerthellales ord. nov., containing the family Eggerthellaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt 9), 3379-3397.
- Gürdeniz, G., Hansen, L., Rasmussen, M., Acar, E., Olsen, A., Christensen, J., . . . Dragsted, L. (2013). Patterns of time since last meal revealed by sparse PCA in an observational LC-MS based metabolomics study. *Metabolomics*, 9(5), 1073-1081.
- Haimovici, H. (1979). Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myonephropathic-metabolic syndrome. *Surgery*, 85(4), 461-468.
- Hayes, D., Angove, M. J., Tucci, J., & Dennis, C. (2015). Walnuts (*Juglans regia*) Chemical Composition and Research in Human Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, doi: 10.1080/10408398.2012.760516.
- Hedrick, V. E., Dietrich, A. M., Estabrooks, P. A., Savla, J., Serrano, E., & Davy, B. M. (2012). Dietary biomarkers: advances, limitations and future directions. *Nutrition journal*, 11, 109.
- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., . . . Nishioka, T. (2010). MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of mass spectrometry*, 45(7), 703-714.
- Huynh, N. N., & Chin-Dusting, J. (2006). Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 33(1-2), 1-8.
- Ismail, O. A., Zhang, T., Jenkins, R. G., & Karnes, H. T. (2010). Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix

- effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 878(31), 3303-3316.
- Jaceldo-Siegl, K., Haddad, E., Oda, K., Fraser, G. E., & Sabate, J. (2014). Tree nuts are inversely associated with metabolic syndrome and obesity: the Adventist health study-2. *PLoS One*, 9(1), e85133.
- Jackson, C. L., & Hu, F. B. (2014). Long-term associations of nut consumption with body weight and obesity. *The American journal of clinical nutrition*, 100(Supplement 1), 408S-411S.
- Jenab, M., Sabate, J., Slimani, N., Ferrari, P., Mazuir, M., Casagrande, C., . . . Riboli, E. (2006). Consumption and portion sizes of tree nuts, peanuts and seeds in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts from 10 European countries. *The British journal of nutrition*, 96 Suppl 2, S12-23.
- Jenab, M., Slimani, N., Bictash, M., Ferrari, P., & Bingham, S. A. (2009). Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. *Human Genetics*, 125(5-6), 507-525.
- Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Banach, M. S., Srichaikul, K., Vidgen, E., Mitchell, S., . . . Josse, R. G. (2011). Nuts as a replacement for carbohydrates in the diabetic diet. *Diabetes Care*, 34(8), 1706-1711.
- Jin, J. S., Zhao, Y. F., Nakamura, N., Akao, T., Kakiuchi, N., Min, B. S., & Hattori, M. (2007). Enantioselective dehydroxylation of enterodiol and enterolactone precursors by human intestinal bacteria. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(11), 2113-2119.
- Kaaks, R., & Riboli, E. (1997). Validation and calibration of dietary intake measurements in the EPIC project: methodological considerations. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *International Journal of Epidemiology*, 26 Suppl 1, S15-25.
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*, 2014, 943162. doi: 10.1155/2014/943162.
- Kendall, C. W., Josse, A. R., Esfahani, A., & Jenkins, D. J. (2010). Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *The British journal of nutrition*, 104(4), 465-473.
- Keszthelyi, D., Troost, F. J., & Masclee, A. A. (2009). Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 21(12), 1239-1249.
- Keunchkarian, S., Reta, M., Romero, L., & Castells, C. (2006). Effect of sample solvent on the chromatographic peak shape of analytes eluted under reversed-phase liquid chromatographic conditions. *Journal of chromatography. A*, 1119(1-2), 20-28.
- Krauss, R. M., Eckel, R. H., Howard, B., Appel, L. J., Daniels, S. R., Deckelbaum, R. J., . . . Bazzarre, T. L. (2000). AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*, 102(18), 2284-2299.
- Kris-Etherton, P. M., Hu, F. B., Ros, E., & Sabate, J. (2008). The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *The Journal of nutrition*, 138(9), 1746S-1751S.
- Lahaie, M., Mess, J. N., Furtado, M., & Garofolo, F. (2010). Elimination of LC-MS/MS matrix effect due to phospholipids using specific solid-phase extraction elution conditions. *Bioanalysis*, 2(6), 1011-1021.
- Lanza, I. R., Zhang, S., Ward, L. E., Karakelides, H., Raftery, D., & Nair, K. S. (2010). Quantitative metabolomics by H-NMR and LC-MS/MS confirms altered metabolic pathways in diabetes. *PloS one*, 5(5), e10538.
- Lopez-Uriarte, P., Nogues, R., Saez, G., Bullo, M., Romeu, M., Masana, L., . . . Salas-Salvado, J. (2010). Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. *Clinical Nutrition*, 29(3), 373-380.

- Luo, C., Zhang, Y., Ding, Y., Shan, Z., Chen, S., Yu, M., . . . Liu, L. (2014). Nut consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*, *100*(1), 256-269.
- Lutsey, P. L., Steffen, L. M., & Stevens, J. (2008). Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*, *117*(6), 754-761.
- Llorach, R., Garcia-Aloy, M., Tulipani, S., Vazquez-Fresno, R., & Andres-Lacueva, C. (2012). Nutrimental strategies to develop new biomarkers of intake and health effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(36), 8797-8808.
- Llorach, R., Garrido, I., Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Tulipani, S., Bartolome, B., & Andres-Lacueva, C. (2010). Metabolomics study of human urinary metabolome modifications after intake of almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) skin polyphenols. *Journal of Proteome Research*, *9*(11), 5859-5867.
- Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Jauregui, O., Monagas, M., & Andres-Lacueva, C. (2009). An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *Journal of Proteome Research*, *8*(11), 5060-5068.
- Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Monagas, M., & Andres-Lacueva, C. (2013). Metabolomic fingerprint in patients at high risk of cardiovascular disease by cocoa intervention. *Molecular Nutrition & Food Research*, *57*(6), 962-973.
- Madsen, R., Lundstedt, T., & Trygg, J. (2010). Chemometrics in metabolomics--a review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta*, *659*(1-2), 23-33.
- Mahjoub, S., & Masrouf-Roudsari, J. (2012). Role of oxidative stress in pathogenesis of metabolic syndrome. *Caspian journal of internal medicine*, *3*(1), 386-396.
- Martinez-Lapiscina, E. H., Pimenta, A. M., Beunza, J. J., Bes-Rastrollo, M., Martinez, J. A., & Martinez-Gonzalez, M. A. (2010). Nut consumption and incidence of hypertension: the SUN prospective cohort. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, *20*(5), 359-365.
- McCombie, G., Browning, L. M., Titman, C. M., Song, M., Shockcor, J., Jebb, S. A., & Griffin, J. L. (2009). omega-3 oil intake during weight loss in obese women results in remodelling of plasma triglyceride and fatty acids. *Metabolomics*, *5*(3), 363-374.
- Mendizabal, Y., Llorens, S., & Nava, E. (2013). Hypertension in metabolic syndrome: vascular pathophysiology. *International Journal of Hypertension*, *2013*, 230868.
- Miglioranza Scavuzzi, B., Miglioranza, L. H., Henrique, F. C., Pitelli Paroschi, T., Lozovoy, M. A., Simao, A. N., & Dichi, I. (2015). The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 1-12.
- Mingrone, G., & Castagneto, M. (2006). Medium-chain, even-numbered dicarboxylic acids as novel energy substrates: an update. *Nutrition Reviews*, *64*(10 Pt 1), 449-456.
- Mitchell, J. M., Fan, T. W., Lane, A. N., & Moseley, H. N. (2014). Development and in silico evaluation of large-scale metabolite identification methods using functional group detection for metabolomics. *Frontiers in Genetics*, *5*, 237.
- Mithril, C., Dragsted, L. O., Meyer, C., Tetens, I., Biloft-Jensen, A., & Astrup, A. (2013). Dietary composition and nutrient content of the New Nordic Diet. *Public health nutrition*, *16*(5), 777-785.
- Moco, S., Martin, F. P., & Rezzi, S. (2012). Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. *Journal of Proteome Research*, *11*(10), 4781-4790.
- Monteiro, R., & Azevedo, I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators of inflammation*, doi: 10.1155/2010/289645.
- Mora-Cubillos, X., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Bullo, M., Tinahones, F. J., & Andres-Lacueva, C. (2015). Plasma metabolomic biomarkers of mixed nuts exposure inversely

- correlate with severity of metabolic syndrome. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(12), 2480-90.
- Nestel, P. J., Straznicki, N., Mellett, N. A., Wong, G., De Souza, D. P., Tull, D. L., . . . Meikle, P. J. (2014). Specific plasma lipid classes and phospholipid fatty acids indicative of dairy food consumption associate with insulin sensitivity. *The American journal of clinical nutrition*, 99(1), 46-53.
- Nunez-Sanchez, M. A., Garcia-Villalba, R., Monedero-Saiz, T., Garcia-Talavera, N. V., Gomez-Sanchez, M. B., Sanchez-Alvarez, C., . . . Espin, J. C. (2014). Targeted metabolic profiling of pomegranate polyphenols and urolithins in plasma, urine and colon tissues from colorectal cancer patients. *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(6), 1199-1211.
- O'Gorman, A., Gibbons, H., & Brennan, L. (2013). Metabolomics in the identification of biomarkers of dietary intake. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 4(5), e201301004.
- O'Neil, C. E., Fulgoni, V. L., 3rd, & Nicklas, T. A. (2015). Tree Nut consumption is associated with better adiposity measures and cardiovascular and metabolic syndrome health risk factors in U.S. Adults: NHANES 2005-2010. *Nutrition Journal*, 14, 64.
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*, 16(1), 1-12.
- Obuchowski, N. A., Lieber, M. L., & Wians, F. H., Jr. (2004). ROC curves in clinical chemistry: uses, misuses, and possible solutions. *Clinical chemistry*, 50(7), 1118-1125.
- Odriozola, L., & Corrales, F. J. (2015). Discovery of nutritional biomarkers: future directions based on omics technologies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66 Suppl 1, S31-40.
- Oh da, Y., & Walenta, E. (2014). Omega-3 Fatty Acids and FFAR4. *Frontiers in endocrinology*, 5, 115.
- Oresic, M. (2009). Metabolomics, a novel tool for studies of nutrition, metabolism and lipid dysfunction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 19(11), 816-824.
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(4), 263-269
- Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Vos, F., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64 Suppl 3, S112-120.
- Petkovic, M., Schiller, J., Muller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., & Arnhold, J. (2001). Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Analytical biochemistry*, 289(2), 202-216.
- Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Gehres, N., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2014). Pilot Walnut Intervention Study of Urolithin Bioavailability in Human Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(42), 10264-73.
- Pisani, P., Faggiano, F., Krogh, V., Palli, D., Vineis, P., & Berrino, F. (1997). Relative validity and reproducibility of a food frequency dietary questionnaire for use in the Italian EPIC centres. *International journal of epidemiology*, 26 Suppl 1, S152-160.
- Potischman, N. (2003). Biologic and methodologic issues for nutritional biomarkers. *The Journal of nutrition*, 133 Suppl 3, 875S-880S.
- Potischman, N., & Freudenheim, J. L. (2003). Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview. *Journal of Nutrition*, 133 Suppl 3, 873S-874S.
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., . . . Wishart, D. S. (2011). The human serum metabolome. *PLoS One*, 6(2), e16957.
- Puupponen-Pimia, R., Seppanen-Laakso, T., Kankainen, M., Maukonen, J., Torronen, R., Kolehmainen, M., . . . Oksman-Caldentey, K. M. (2013). Effects of ellagitannin-rich berries on blood lipids, gut microbiota, and urolithin production in human subjects with symptoms of metabolic syndrome. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(12), 2258-2263.

- Rabassa, M., Trespalacios, P., Urpi-Sarda, M., Llorach, R., Tulipani, S., Zamora-Ros, R., . . . Andres-Lacueva, C. (2011). Polifenoles como antioxidantes. In A. Z. J. González-Aguilar GA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa L (Ed.), *Antioxidantes en alimentos y salud* (pp. 155). Mexic: Trillas.
- Rappaport, S. M. (2011). Implications of the exposome for exposure science. *Journal of exposure science & environmental epidemiology*, 21(1), 5-9.
- Rappaport, S. M., Barupal, D. K., Wishart, D., Vineis, P., & Scalbert, A. (2014). The blood exposome and its role in discovering causes of disease. *Environmental health perspectives*, 122(8), 769-774.
- Redon, J., & Coca, A. (2003). Guidelines for the diagnosis, evaluation and treatment of hypertension: the point of view of the Spanish Society of Hypertension. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 121(19), 739-740.
- Regueiro, J., Sanchez-Gonzalez, C., Vallverdu-Queralt, A., Simal-Gandara, J., Lamuela-Raventos, R., & Izquierdo-Pulido, M. (2014). Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food chemistry*, 152, 340-348.
- Rezzi, S., Ramadan, Z., Fay, L. B., & Kochhar, S. (2007). Nutritional metabonomics: applications and perspectives. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 513-525.
- Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E., & Clish, C. B. (2012). Targeted metabolomics. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, Chapter 30, Unit 30 32 31-24.
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J. C., & Muller, M. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12, 77.
- Ros, E. (2010). Health benefits of nut consumption. *Nutrients*, 2(7), 652-682.
- Ros, E. (2015). Nuts and CVD. *The British journal of nutrition*, 113 Suppl 2, S111-120.
- Ros, E., Martinez-Gonzalez, M. A., Estruch, R., Salas-Salvado, J., Fito, M., Martinez, J. A., & Corella, D. (2014). Mediterranean diet and cardiovascular health: Teachings of the PREDIMED study. *Advances in nutrition*, 5(3), 330S-336S.
- Rothwell, J. A., Fillatre, Y., Martin, J. F., Lyan, B., Pujos-Guillot, E., Fezeu, L., . . . Manach, C. (2014). New biomarkers of coffee consumption identified by the non-targeted metabolomic profiling of cohort study subjects. *PLoS One*, 9(4), e93474.
- Rothwell, J. A., Urpi-Sarda, M., Boto-Ordóñez, M., Knox, C., Llorach, R., Eisner, R., . . . Scalbert, A. (2012). Phenol-Explorer 2.0: a major update of the Phenol-Explorer database integrating data on polyphenol metabolism and pharmacokinetics in humans and experimental animals. *The journal of biological databases and curation*, 2012, bas031.
- Sabate, J., Oda, K., & Ros, E. (2010). Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. *Archives of internal medicine*, 170(9), 821-827.
- Salas-Salvado, J., Bullo, M., Babio, N., Martinez-Gonzalez, M. A., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., . . . Ros, E. (2011). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes care*, 34(1), 14-19.
- Salas-Salvado, J., Bullo, M., Perez-Heras, A., & Ros, E. (2006). Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition*, 96 Suppl 2, S46-51.
- Salas-Salvado, J., Guasch-Ferre, M., Bullo, M., & Sabate, J. (2014). Nuts in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition*, 100(Supplement 1), 399S-407S.
- Salas-Salvado, J., Martinez-Gonzalez, M. A., Bullo, M., & Ros, E. (2011). The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases*, 21 Suppl 2, B32-48.
- Sanchez-Gonzalez, C., Ciudad, C., Noe, V., & Izquierdo-Pulido, M. (2015). Health benefits of walnut polyphenols: An exploration beyond their lipid profile. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0.

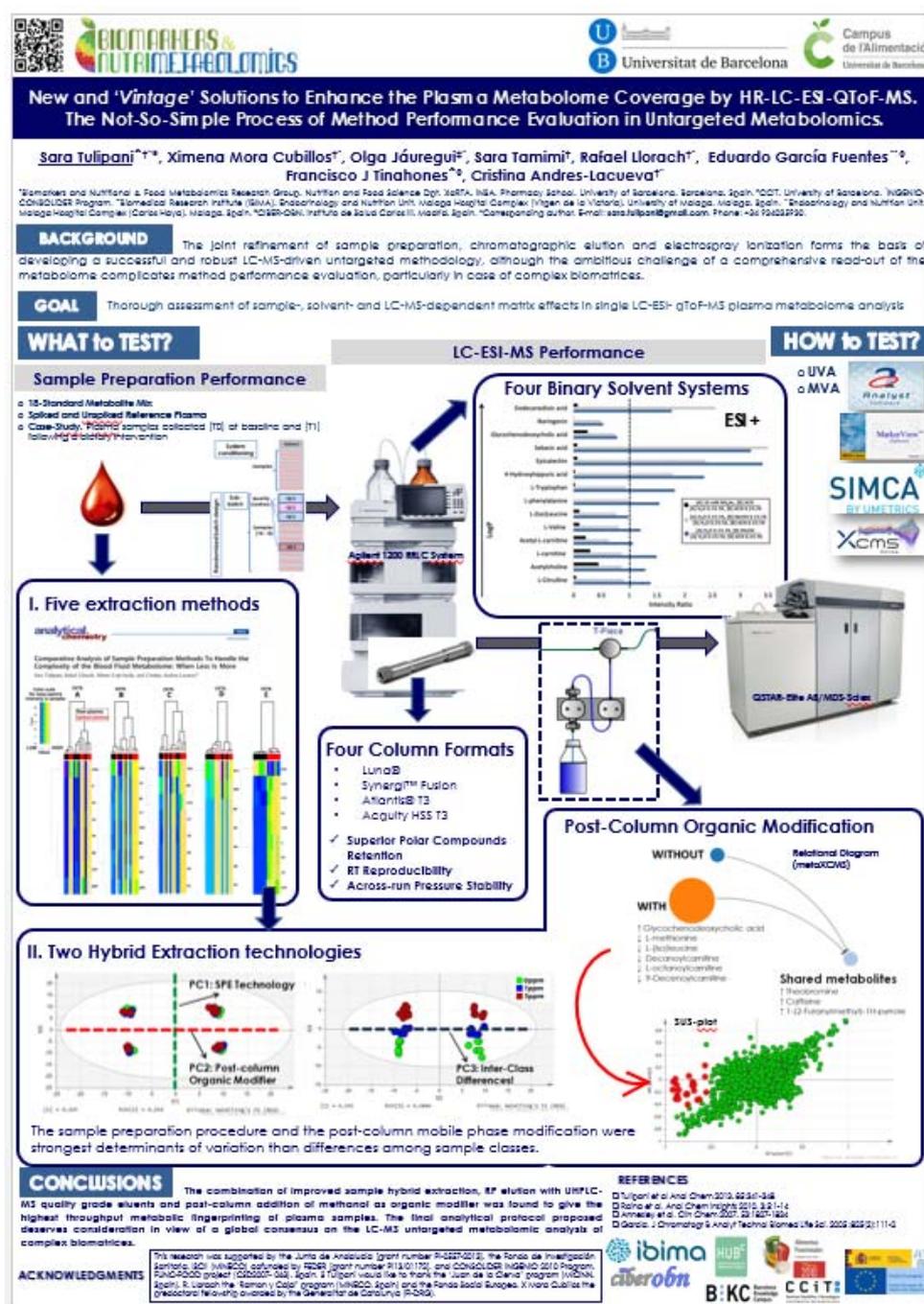
- Scalbert, A., Brennan, L., Manach, C., Andres-Lacueva, C., Dragsted, L. O., Draper, J., . . . Wishart, D. S. (2014a). The food metabolome: a window over dietary exposure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(6), 1286-1308.
- Seeram, N. P., Henning, S. M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., & Heber, D. (2006). Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *The Journal of nutrition*, 136(10), 2481-2485.
- Selma, M. V., Beltran, D., Garcia-Villalba, R., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2014). Description of urolithin production capacity from ellagic acid of two human intestinal *Gordonibacter* species. *Food & function*, 5(8), 1779-84.
- Selma, M. V., Tomas-Barberan, F. A., Beltran, D., Garcia-Villalba, R., & Espin, J. C. (2014). *Gordonibacter urolithinifaciens* sp. nov., an urolithin-producing bacterium isolated from human gut. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 7), 2346-52.
- Simmons, R. K., Alberti, K. G., Gale, E. A., Colagiuri, S., Tuomilehto, J., Qiao, Q., . . . Roglic, G. (2010). The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia*, 53(4), 600-605.
- Smilde, A. K., Hendriks, M. M. W. B., Westerhuis, J. A., & Hoefsloot, H. C. J. (2013). Data Processing in Metabolomics *Metabolomics in Practice* (pp. 261-284): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Stahnke, H., Reemtsma, T., & Alder, L. (2009). Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 81(6), 2185-2192.
- Suarez Lopez, M. M., Kizlansky, A., & Lopez, L. B. (2006). Assessment of protein quality in foods by calculating the amino acids score corrected by digestibility. *Nutricion Hospitalaria*, 21(1), 47-51.
- Sumner, L. W., Amberg, A., Barrett, D., Beale, M. H., Beger, R., Daykin, C. A., . . . Viant, M. R. (2007). Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*, 3(3), 211-221.
- Szymanska, E., van Dorsten, F. A., Troost, J., Paliukhovich, I., van Velzen, E. J., Hendriks, M. M., . . . Smilde, A. K. (2012). A lipidomic analysis approach to evaluate the response to cholesterol-lowering food intake. *Metabolomics*, 8(5), 894-906.
- Taylor, H. L., Jacobs, D. R., Jr., Schucker, B., Knudsen, J., Leon, A. S., & Debacker, G. (1978). A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *Journal of Chronic Diseases*, 31(12), 741-755.
- Theodoridis, G., Gika, H. G., & Wilson, I. D. (2008). LC-MS-based methodology for global metabolite profiling in metabonomics/metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(3), 251-260.
- Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., & Wilson, I. D. (2012). Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Analytical Chimica Acta*, 711, 7-16.
- Tomas-Barberan, F., Garcia-Villalba, R., Gonzalez-Sarrias, A., Selma, M. V., & Espin, J. C. (2014). Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age and health status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6535-8.
- Trygg, J., Holmes, E., & Lundstedt, T. (2007). Chemometrics in metabonomics. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 469-479.
- Tulipani, S., Llorach, R., Jauregui, O., Lopez-Uriarte, P., Garcia-Aloy, M., Bullo, M., . . . Andres-Lacueva, C. (2011). Metabolomics unveils urinary changes in subjects with metabolic syndrome following 12-week nut consumption. *Journal of Proteome Research*, 10(11), 5047-5058.
- Tulipani, S., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., & Andres-Lacueva, C. (2013). Comparative analysis of sample preparation methods to handle the complexity of the blood fluid metabolome: when less is more. *Analytical chemistry*, 85(1), 341-348.

- Tulipani, S., Mora-Cubillos, X., Jauregui, O., Llorach, R., Garcia-Fuentes, E., Tinahones, F. J., & Andres-Lacueva, C. (2015). New and Vintage Solutions to Enhance the Plasma Metabolome Coverage by LC-ESI-MS Untargeted Metabolomics. The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation. *Analytical Chemistry*, 87(5), 2639-47.
- Tulipani, S., Urpi-Sarda, M., Garcia-Villalba, R., Rabassa, M., Lopez-Uriarte, P., Bullo, M., . . . Andres-Lacueva, C. (2012). Urolithins are the main urinary microbial-derived phenolic metabolites discriminating a moderate consumption of nuts in free-living subjects with diagnosed metabolic syndrome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8930-8940.
- USDA. (2015a). 2015 - 2020 Dietary Guidelines for Americans. 8th Edition. [en línea, consulta: 10 mayo 2016]. Disponible en: <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>
- USDA. (2015b). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 28. [en línea, consulta: 13 abril 2016]. Disponible en: http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods?qlookup=&fgcd=Nut+and+Seed+Products&manu=&SYNCHRONIZER_TOKEN=00e08f851-0927-4419-8407-af0980c0909b0929fe0927&SYNCHRONIZER_URI=%0922Fndb%0922Fsearch.
- Ussar, S., Griffin, N. W., Bezy, O., Fujisaka, S., Vienberg, S., Softic, S., . . . Kahn, C. R. (2015). Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metabolism*, 22(3), 516-30.
- Uzunlulu, M., Telci Caklili, O., & Oguz, A. (2016). Association between Metabolic Syndrome and Cancer. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 68(3), 173-179.
- van Rooy, M. J., & Pretorius, E. (2015). Metabolic syndrome, platelet activation and the development of transient ischemic attack or thromboembolic stroke. *Thrombosis Research*, 135(3), 434-442.
- Wagele, B., Witting, M., Schmitt-Kopplin, P., & Suhre, K. (2012). MassTRIX reloaded: combined analysis and visualization of transcriptome and metabolome data. *PLoS One*, 7(7), e39860.
- Westerhuis, J., Hoefsloot, H. J., Smit, S., Vis, D., Smilde, A., van Velzen, E. J., . . . van Dorsten, F. (2008). Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics*, 4(1), 81-89.
- Wheelock, A. M., & Wheelock, C. E. (2013). Trials and tribulations of 'omics data analysis: assessing quality of SIMCA-based multivariate models using examples from pulmonary medicine. *Molecular Biosystems*, 9(11), 2589-2596.
- Wiklund, S., Johansson, E., Sjostrom, L., Mellerowicz, E. J., Edlund, U., Shockcor, J. P., . . . Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models. *Analytical Chemistry*, 80(1), 115-122.
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 106(10), 3698-3703.
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, 19(9), 482-493.
- Wishart, D. S. (2009). Computational strategies for metabolite identification in metabolomics. *Bioanalysis*, 1(9), 1579-1596.
- Wishart, D. S. (2011). Advances in metabolite identification. *Bioanalysis*, 3(15), 1769-1782.
- Wishart, D. S., Jewison, T., Guo, A. C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., . . . Scalbert, A. (2013). HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D801-807.
- Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., . . . Querengesser, L. (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, 35, D521-526.
- World Health Organization. (2011). Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010 [en línea, consulta: 13 abril 2016]. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789240686458_eng.pdf.

-
- Wurde mann, D., Tindall, B. J., Pukall, R., Lunsdorf, H., Strompl, C., Namuth, T., . . . Oxley, A. P. (2009). *Gordonibacter pamela eae* gen. nov., sp. nov., a new member of the Coriobacteriaceae isolated from a patient with Crohn's disease, and reclassification of *Eggerthella hongkongensis* Lau et al. 2006 as *Paraeggerthella hongkongensis* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 6), 1405-1415.
- Xi, B., Gu, H., Baniyadi, H., & Raftery, D. (2014). Statistical analysis and modeling of mass spectrometry-based metabolomics data. *Methods in Molecular Biology*, 1198, 333-353.
- Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M., & Wishart, D. S. (2013). Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics: Official journal of the Metabolomic Society*, 9(2), 280-299.
- Xiao, S., Fei, N., Pang, X., Shen, J., Wang, L., Zhang, B., . . . Zhao, L. (2014). A gut microbiota-targeted dietary intervention for amelioration of chronic inflammation underlying metabolic syndrome. *FEMS microbiology ecology*, 87(2), 357-367.
- Yamamoto, H., Fujimori, T., Sato, H., Ishikawa, G., Kami, K., & Ohashi, Y. (2014). Statistical hypothesis testing of factor loading in principal component analysis and its application to metabolite set enrichment analysis. *BMC Bioinformatics*, 15, 51.
- Yang, J., Zhao, X., Lu, X., Lin, X., & Xu, G. (2015). A data preprocessing strategy for metabolomics to reduce the mask effect in data analysis. *Frontiers in molecular biosciences*, 2, 4.
- Yin, P., Peter, A., Franken, H., Zhao, X., Neukamm, SS., Rosenbaum, L., Lucio, M., Zell, A., Häring, HU., Xu, G., Lehmann, R. (2013). Preanalytical aspects and sample quality assessment in metabolomics studies of human blood. *Clinical Chemistry*, 59(5), 833-845.
- Zamora-Ros, R., Rabassa, M., Cherubini, A., Urpi-Sarda, M., Llorach, R., Bandinelli, S., . . . Andres-Lacueva, C. (2011). Comparison of 24-h volume and creatinine-corrected total urinary polyphenol as a biomarker of total dietary polyphenols in the Invecchiare InCHIANTI study. *Analytical Chimica Acta*, 704(1-2), 110-115.
- Zanotti, I., Dall'Asta, M., Mena, P., Mele, L., Bruni, R., Ray, S., & Del Rio, D. (2015). Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food & function*, 6(1), 13-31.
- Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137(2), 293-300.
- Zhang, T., & Watson, D. G. (2015). A short review of applications of liquid chromatography mass spectrometry based metabolomics techniques to the analysis of human urine. *Analyst*, 140(9), 2907-2915.
- Zhang, X., Yap, Y., Wei, D., Chen, G., & Chen, F. (2008). Novel omics technologies in nutrition research. *Biotechnol Advances*, 26(2), 169-176.

9. ANEXOS

Comunicación póster: Sara Tulipani, Ximena Mora-Cubillos, Olga Jáuregui, Sara Tamimi, Rafael Llorach, Eduardo García Fuentes, Francisco J Tinahones, Cristina Andres-Lacueva. New and 'Vintage' Solutions to Enhance the Plasma Metabolome Coverage by HR-LC-ESI-q-ToF- MS. The Not-So-Simple Process of Method Performance Evaluation in Untargeted Metabolomics. Poster presentado en ocasión del *EMBO Practical Course on Metabolomics Bioinformatics for Life Scientists* (EBI-EMBL, Hinxton, Cambridge, 17-21 de marzo de 2014).



Revisión científica: Nasiruddin Khan, Olha Khymenets, Mireia Urpí-Sardà, Sara Tulipani, Mar Garcia-Aloy, María Monagas, Ximena Mora-Cubillos, Rafael Llorach and Cristina Andres-Lacueva. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease. *Nutrients*. Feb 2014; 6(2): 844–880.

Nutrients 2014, 6, 844–880; doi:10.3390/nu6020844

OPEN ACCESS

nutrients

ISSN 2072-6643

www.mdpi.com/journal/nutrients

Review

Cocoa Polyphenols and Inflammatory Markers of Cardiovascular Disease

Nasiruddin Khan ^{1,2,†}, Olha Khymenets ^{2,†,*}, Mireia Urpí-Sardà ², Sara Tulipani ^{2,3}, Mar Garcia-Aloy ², María Monagas ⁴, Ximena Mora-Cubillos ², Rafael Llorach ² and Cristina Andres-Lacueva ²

¹ Biomarkers Research Program, Biochemistry Department, College of Science, King Saud University, P.O. Box 2455, King Abdullah road, Riyadh 11451, Saudi Arabia; E-Mail: nasiruddin2006@gmail.com

² Biomarkers and Nutritional & Food Metabolomics Research Group, Department of Nutrition and Food Science, XaRTA, INSA, Campus Torribera; INGENIO-CONSOLIDER Program, Fun-C-Food CSD2007-063, Ministry of Science and Innovation, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av Joan XXIII, s/n, Barcelona 08028, Spain; E-Mails: murpi@ub.edu (M.U.-S.); sara.tulipani@gmail.com (S.T.); margarcia@ub.edu (M.G.-A.); ximenamora@ub.edu (X.M.-C.); rafallorach@ub.edu (R.L.); candres@ub.edu (C.A.-L.)

³ Biomedical Research Institute (IBIMA), Service of Endocrinology and Nutrition, Hospital Complex (Virgen de la Victoria), Campus de Teatinos s/n, University of Málaga, Málaga 29010, Spain

⁴ Institute of Food Science Research (CIAL), CSIC-UAM. C/Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, Madrid 28049, Spain; E-Mail: m.monagas@csic.es

† These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: okhymenets@ub.edu; Tel.: +34-93-40-35-930; Fax: +34-93-40-35-931.

Received: 29 November 2013; in revised form: 30 December 2013 / Accepted: 6 February 2014 /

Published: 21 February 2014

Abstract: Epidemiological studies have demonstrated the beneficial effect of plant-derived food intake in reducing the risk of cardiovascular disease (CVD). The potential bioactivity of cocoa and its polyphenolic components in modulating cardiovascular health is now being studied worldwide and continues to grow at a rapid pace. In fact, the high polyphenol content of cocoa is of particular interest from the nutritional and pharmacological viewpoints. Cocoa polyphenols are shown to possess a range of cardiovascular-protective properties, and can play a meaningful role through modulating different inflammatory

markers involved in atherosclerosis. Accumulated evidence on related anti-inflammatory effects of cocoa polyphenols is summarized in the present review.

Keywords: cocoa polyphenols; bioavailability; inflammation; CVD

1. Introduction

Of an estimated 17.3 million deaths globally from all causes in 2008, cardiovascular disease (CVD) accounted for 30% [1]. The cardiovascular epidemic is rapidly advancing in the world. It has been projected that by 2030 nearly 23.6 million people will die from cardiovascular disorders [2,3]. However, the majority of these deaths caused by CVD are preventable [4,5]. Epidemiological and clinical studies have shown that lifestyle modifications such as nutrition and exercise are initial protective measures to reduce the risk of CVD [6–9]. The consumption of plant-derived food, such as whole grains, fruits, and vegetables, has been recognized as one of the principal preventive factors in the risk of all-cause and CVD mortality [10–12]. Moreover, the absolute quantity and frequency of fruit and vegetable intake have been associated with lower CVD risk and, therefore, with lower CVD mortality [13,14]. The mechanisms by which fruit and vegetables exert their protective effects are not entirely clear, but experimental and population studies [15,16] have indicated that plant polyphenols are principal mediators. Numerous scientific reports accumulated over recent decades suggest that plant polyphenols may exert their activities on the antioxidant system, signaling and transcription pathways, thus affecting principal mechanisms involved in cardiovascular events, such as systemic inflammation, lipid metabolism, hemostatic and vascular events, and immune response [17–23].

Cocoa products are among the richest sources of polyphenols in our diets. Nowadays cocoa has become a widely consumed food component, with growing demand across the world [24]. Interest in the biological activities of cocoa (*Theobroma cacao*) polyphenols has increased steadily, since the first studies on the positive link between plant food polyphenol consumption and health outcomes were reported. Cocoa has the highest flavanol content of all foods on a per-weight basis and is a significant contributor to the total dietary intake of flavonoids [25,26]. Depending upon geographical origins and plant varieties, the total polyphenol content of cocoa ranges from 40.0 mg GAE/g (GAE; gallic acid equivalent) to 84.2 mg GAE/g [27–30]. However, portions in chocolate, the most commonly consumed processed cocoa product, are significantly lower, with levels of 1.7–8.4 mg/g reported in dark chocolate and even lower levels of 0.7–5 mg/g in milk chocolate [31,32].

Several population studies have reported on the inverse association between cocoa intake (e.g., chocolate) and CVD mortality [33,34]. A number of recent meta-analyses of intervention studies have demonstrated that there is substantial evidence that cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors such as blood pressure [35], insulin resistance [36], lipid profiles [37], and flow-mediated vascular dilatation (FMD) [38]. On the other hand, there are numerous *in vitro* and *in vivo* experimental data supporting the notion that polyphenols may mediate these beneficial effects of cocoa [39–41].

Nowadays, it has become more evident that inflammatory mediators play a key role in the pathology of atherosclerosis, starting from the initial phases of leukocyte recruitment, and finishing with the eventual rupture of the vulnerable atherosclerotic plaque [42–44]. Therefore, atherosclerosis

and cardiovascular pathologies caused by it are readily recognized and treated as inflammatory diseases [45]. Practically all cardiovascular risk factors are to a different extent linked to inflammation, while inflammation itself is recognized as a cardiovascular risk factor [46,47].

The participation of dietary polyphenols in the modulation of inflammation and how this could contribute to the reduction of cardiovascular risk was recently discussed [48]. There is a growing body of evidence on the anti-inflammatory activities of cocoa polyphenols. The protective role of cocoa in CVD inflammation has been considered in a number of human intervention studies, and numerous *in vitro* studies have also been carried out, led by an interest in disclosing the mechanisms and identifying the agents responsible for the anti-inflammatory cardio-protective activities of cocoa. Accordingly, polyphenols have been proposed as principal anti-inflammatory mediators. In this review, we aim to summarize these findings in order to assess the effects of cocoa polyphenols on cardiovascular-related inflammation.

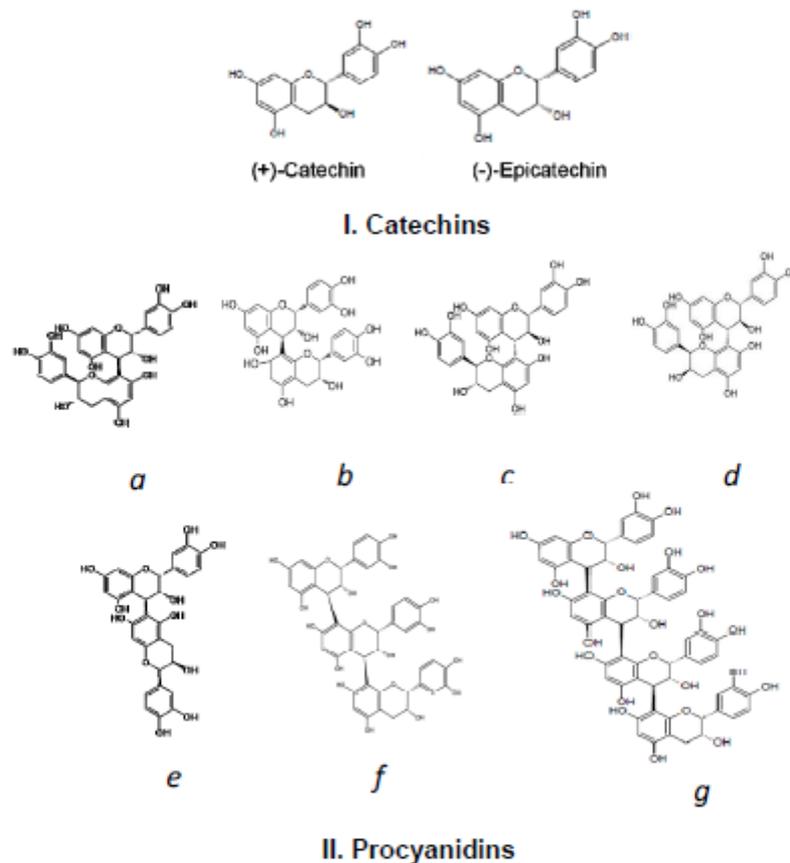
2. Cocoa Polyphenols

Polyphenols in cocoa beans could contribute to about 12%–18% of the dry weight [49], making them practically inedible due to the bitterness and astringency [50]. Wollgast and Anklam [51] reported that catechins, anthocyanins, and proanthocyanidins constitute about 37%, 4% and 58% of cocoa bean polyphenols, respectively. Flavanols are the most important class of cocoa polyphenols [51,52]. They are presented by monomers ((+)- and (-)-isomers of catechin and epicatechin and their derivatives) and build-up of (epi)catechin subunit polymers (proanthocyanidins) [53]. Phenolic acids, flavonols and their glycosides, some stilbenes, simple phenols, and isocoumarins are also present in minor amounts [54–56]. Cyanidin-3- α -L-arabinoside and cyanidin-3- β -D-galactoside have been reported to be principal anthocyanins of cocoa, however, mainly in unprocessed fresh beans [51]. (-)-Epicatechin constitutes about 35% of the total phenolic content of cocoa beans, while other catechins, such as (+)-catechin, (+)-gallocatechin, and (-)-epigallocatechin, are present in smaller quantities. Dimers (B1, B2, B3, B4 and B5), trimers (C1), and oligomers (tetramer D) of flavan-3,4-diols, linked by 4 \rightarrow 8 or 4 \rightarrow 6 bounds (B-type linkage), represent the main cocoa polymers, procyanidins [53,57,58]. The structures of the main cocoa polyphenols, monomeric and polymeric flavanols, are shown in Figure 1. Some other procyanidins have been identified in smaller amounts in fresh cocoa beans: dodecamer and three A-type (2 \rightarrow 7 or 2 \rightarrow 5 along with 4 β \rightarrow 8 linkage) procyanidin dimmers [53,59] probably derive from oxidative conversion of B-type procyanidins [60,61]. In general, unfermented (fresh) cocoa beans contain flavanols with a varied range of polymerization, from monomers up to decamers [62].

The polyphenol content of cocoa could vary up to 4-fold depending on different varieties [63] and origins [64]. In addition to the above factors, cocoa beans undergo several steps of primary and secondary processing due to which the ratio and types of polyphenols found in cocoa beans are different from those found in the finished products [65]. For instance, the processes of fermentation and alkalization reduce the polyphenol content [63,66–68] and, consequently, the antioxidant activity of cocoa beans [32,67]. Thus, (-)-epicatechin and (+)-catechin decrease depending on the extent of cocoa bean fermentation: unfermented, partly fermented or fully fermented. In addition, high temperatures and long duration of processing also decrease the polyphenol content [51,68,69]. Some

special methodological adjustments could be applied in order to prevent cocoa polyphenols from oxidation during different stages of cocoa processing, increasing their content in a final product [70,71].

Figure 1. (I) Main cocoa flavanol monomers: (+)-catechin; (-)-epicatechin; (II) Main cocoa flavanol polymers: (a–e)—dimers: procyanidin B1, B2, B3, B4, B5, respectively; (f)—trimer: procyanidin C1; (g)—tetramer: procyanidin D.



Semi-finished products such as cocoa liquor, and cocoa butter and cocoa powder derived from it, which are manufactured during secondary processing, are usually used in manufacturing final cocoa products (e.g., cocoa powder and chocolate) [72]. Sometimes unprocessed cocoa bean powder is introduced, mainly in order to enrich the polyphenol content of the final product [50,73]. The content of polyphenols in the final product is defined by the amount and type of cocoa components. Thus, cocoa powder is shown to have higher polyphenol content than cocoa butter [39,74], since it is mainly the low-fat solid component of cocoa nibs. Non-fat cocoa solids (NFCS) are considered to represent the total phenolic content in cocoa products [75]. Based on NFCS, cocoa powder represents the highest phenolic content (72%–87%), followed by baking chocolate (45%–49%), dark chocolate (20%–30%), semi-sweet chocolate (15%–19%), and milk chocolate (5%–7%) [76]. The quantitative determination of polyphenol content in a cocoa product can be assessed by using either total polyphenols [31] or the

measurements of (–)-epicatechin and (+)-catechin [26], and also B-type procyanidin contents [73]. Based on weight in grams, (–)-epicatechin and (+)-catechin content follows a decreasing order, cocoa powder > dark chocolate > milk chocolate [77], while each content could be widely variable. For example, for cocoa powder it can range from 116.02 to 730.26 µg/g for (–)-epicatechin, and from 81.40 to 447.62 µg/g for (+)-catechin, the total monomeric content ranging from 182.84 to 1066.13 µg/g [68]. In general, according to the polyphenol database Phenol-Explorer [78], the mean values of (–)-epicatechin and (+)-catechin are about 158 and 107, 70 and 20, and 15 and 5 mg/100 g FW in cocoa powder, dark chocolate, and milk chocolate, respectively. However, the amount of consumed cocoa polyphenols would also depend on serving size, thus, in a normal diet, dark chocolate would provide more polyphenols than other cocoa products [39].

As a consequence of whole processing, cocoa-derived products mainly contain less bioavailable (–)-catechin enantiomer, in contrast to cocoa beans and most foods that contain (+)-catechin [79,80]. Analyses of polyphenols have shown a relative abundance of oligomers and individual components in cocoa liquor, which follows the order: monomers > trimers > dimers > tetramers and epicatechin > procyanidin B2 > procyanidin C1 > catechin, respectively [81]. The trend in cocoa powder was different and followed the order: monomers > dimers > trimers > tetramers and epicatechin > catechin > procyanidin B2 > procyanidin C1, respectively [81]. Trace amounts of gallicocatechin and epigallocatechin [55] and quercetin aglycone as well as some quercetin glycosides have been identified in cocoa liquor and cocoa powder [56,82]. Some additional flavonoids, such as naringenin, luteolin, apigenin and some glycosides of these compounds, and quercetin-glucuronide were also reported [68,77].

On the whole, during cocoa processing the polyphenol content is reduced more than ten times [74,83], with the undesirable bitter and astringent taste diminishing sometimes in final cocoa products. Cocoa food products existing on the market are characterized by highly diverse polyphenol content, mainly due to the differences in cocoa processing and product manufacturing, in addition to intrinsic geographical and genetic plant divergence [61,73,77,84]. Epidemiological and clinical studies on the health benefits of cocoa polyphenols should account for this variability in addition to other aspects, such as the bioavailability of putatively bioactive cocoa polyphenols, which we will discuss in the following section.

3. Bioavailability of Cocoa Polyphenols

In order to provide conclusive evidence for the effectiveness of cocoa polyphenols in disease prevention and human health improvement, it is essential to determine the nature and distribution of these compounds in our diet. In addition, the bioavailability of the ingested cocoa polyphenols will circumscribe organism exposure to these putatively bioactive compounds, affecting a magnitude of related health outcomes. There are a number of factors influencing the bioavailability of cocoa polyphenols, starting from their dietary consumption and finishing with their fate in the human organism.

The daily consumption of cocoa catechins and procyanidins depends on cultural and regional dietary habits [75]. It has been estimated that in some regions (e.g., Belgium/Luxemburg) cocoa product consumption could reach up to 6 kg in cocoa beans/person per annum, the world average being 0.55 kg/person per annum [85]. The majority of intervention and cross-sectional studies regarding the

health effects of cocoa have been conducted using cocoa beverages or chocolate as the most habitually used cocoa products [86], therefore bioavailability and intervention studies have also been focused mainly on these cocoa products. The protagonists of these studies are the major cocoa flavanols, epicatechin and procyanidins, since they have so far been foreseen as the principal bioactive cocoa polyphenols due to both their abundance and their relevance to biological activities and physicochemical structures [49,87,88].

Upon ingestion of cocoa products in doses close to habitual diet monomeric and polymeric cocoa flavanols are rapidly absorbed. Thus, it was shown that procyanidins and monomers could be detected in plasma as early as 0.5 h and maximal plasma concentration of these compounds was reached at about 2 h after ingestion [89–100]. The plasmatic T_{max} of detected cocoa flavanols did not normally exceed 3 h, and their elimination from plasma in most cases was already achieved 6 h after cocoa consumption [94–96]. However, some epicatechin metabolites could have a delayed appearance and could remain in systemic circulation for up to 24 h, suggesting their intestinal microbiota catabolic origin [97,98]. Rapid plasmatic appearance suggests that the detected polyphenols are mainly absorbed in the small intestine. This was ratified by the data coming from *in vitro* and *in vivo* bioavailability studies on catechins and procyanidins [99,101,102]. However, absorption of flavan-3-ols in the small intestine is not complete, and depends not only on flavanol chemistry, but also on their structural isomerism and stereoisomerism [103]. Therefore, epicatechins and catechins were shown to have different levels of absorption [93,94], and plasma concentration of (+) and (−) forms of catechin were found to be different after cocoa product consumption [79,104]. The level of absorption, furthermore, depends on the range of polymerization, which will also limit their bioavailability [49]. *In vitro* studies suggested that flavanols only up to trimers were able to pass through the small intestine [101,102]. In humans, only traces of procyanidin B2 were detected in human plasma after ingestion of cocoa products [93,94]. More complex flavanols appeared to be stable under acidic conditions mimicking stomach digestion [105], so that, being unabsorbed in the small intestine, they are transited to the large intestine, where they are subjected to catabolic activities of intestinal microbiota [106].

Under absorption in the gastrointestinal tract, cocoa flavanols (monomers) are recognized by the organism as xenobiotics and are extensively transformed into various metabolites [107]. (−)-Epicatechin in its sulfate, glucuronides or methyl conjugated forms were the main forms representing about 33%, 28%, and 33% of total epicatechin metabolites in human plasma and urine [97], the most relevant being (−)-epicatechin-3'-β-d-glucuronide, (−)-epicatechin 3'-sulfate, 3'-O-methyl(−)-epicatechin sulfates [97,108]. In fact, epicatechin aglycone was undetectable both in plasma and urine according to recent findings, where advanced methods were applied [97,108].

Due to the gastrointestinal and hepatic metabolism, the conjugated metabolites are destined to be rapidly eliminated from the human body. Cocoa flavanols, absorbed in the small intestine, are normally cleared from the body over 24 h, like the majority of dietary polyphenols. On the other hand, a large proportion of unabsorbed flavanols, e.g., polymers and monomers, are subjected to colonic microflora catabolic activities [106,109,110]. Consequently, low-molecular-weight microbiota catabolites of these flavanols are absorbed from the colon, belatedly emerging in systemic circulation as phase II conjugates [106,107,111]. Valerolactones and valeric acids were reported to be first-step microbiota-derived catabolites [106,112] of unabsorbed small intestine epicatechin and procyanidins [112–115], whereas various phenolic acids were identified as intermediate and last-step

products of microbial flavanol catabolism [106,111,113,116]. On the other hand, a part of unabsorbed flavanols can accumulate in the low digestive tract and are finally excreted from the human body with faeces [106,117,118]. Plasmatic concentrations vary widely among reported flavanol microbiota metabolites, some of them reaching micromolar levels in response to cocoa polyphenol consumption [114]. The studies in human urine have not only indicated the bioavailability but also demonstrated the importance of the phase II conjugated metabolites and some colonic microbiota metabolites as promising biomarkers of cocoa consumption [119–121], justifying their application for dietary compliance control in cocoa intervention studies along with hydrolyzed epicatechin [114,122–124].

Recently, the scientific community has become aware that the microbe-derived metabolites of polyphenols represent a large proportion of dietary polyphenol intake [106,125–128], impacting on their bioavailability and potentially exhibiting some bioactive effects [129–132]. Moreover, regular consumption of polyphenol-rich cocoa could in turn influence the colonic bacterial population and metabolic activities [133], enlarging inter-individual flavanol bioavailability variation [134]. For example, a significant difference in bacterial metabolite profiles between regular cocoa product consumers and non-consumers was reported in response to dark chocolate intervention [135]. Nowadays, microbial cocoa metabolites are being reconsidered with regard to their health-related bioactivities, including those related to CVD inflammation, which we will address later in the corresponding section.

The interaction between different nutrients, the food matrix and texture are one of several important factors that affect the bioavailability of cocoa polyphenols. The effect of milk, the most commonly used food element in cocoa-formulated products, on the bioavailability of both primary cocoa polyphenols and their host and microbiota metabolites has been studied with different cocoa products [96,113,136–140]. However, conclusions on this issue have remained controversial. In addition, carbohydrates and proteins [141–143], along with the complex food matrix and cocoa product physical stage (liquid vs. solid) [144,145], were also considered to interfere in the mechanism of flavanol uptake, affecting the bioaccessibility and bioavailability of cocoa polyphenols in human subjects.

Although in the majority of the intervention studies the doses of cocoa products were close to high rather than average in habitual consumption, systemically circulating (plasmatic) concentrations of cocoa flavanols were reported to be relatively low—from nano- to micro-molar range for epicatechin and not always detected nano-molar concentrations for procyanidins [95,98,100,146]. Low maximum concentration (C_{max}), a short half-life, extensive metabolic conjugation and rapid excretion, all add up to relatively low cocoa polyphenol bioavailability, compromising their relevance for health effects and bioactivities reported in *in vitro* and *in vivo* mechanistic studies [147]. On the other hand, there are data showing that sustained chronic consumption of cocoa products can lead to a relatively low but significant accumulation of cocoa polyphenols in human plasma [148], sufficient to exert some health-relevant bioactivity. These data support the idea that high doses of cocoa polyphenols might not always be needed to manifest biological activities, and the time of interaction could also be important.

The absorption of cocoa polyphenols, characterized as epicatechin 24 h urinary recovery data, was considered to be poor, reaching not more than 30% of the total ingested (–)-epicatechin both with chocolate and with cocoa powder [97,98]. Some studies reported much lower recoveries [96,103],

especially when the cocoa polyphenol doses were closer to habitual dietary consumption and cocoa products were co-administrated with milk [96]. The participation of procyanidins in epicatechin bioavailability due to catabolic activities of colonic microflora is still being questioned due to the controversy in reported data [108,115]. Data on cocoa polyphenol absorption did not account for microbial-derived metabolites. So far, addressing this issue has proved challenging, since the majority of identified microbiota flavanol catabolites are not epicatechin specific and could also be related to other dietary polyphenols and/or unrelated microbial activities [106].

Although levels of circulating cocoa polyphenol metabolites appeared to be dose dependent [95,100], high inter-individual variability, mainly defined by individual metabolic phenotypes [149,150], was reported in practically all bioavailability studies. On the other hand, large inter-individual differences in colonic flavanol bioconversion, attributed to the individual colonic microbiota composition, are also expected to have an impact on variation in the bioavailability of cocoa polyphenols [127,134]. Such variability is difficult to control on the population level due to the nature of its matter; therefore, it still remains one of the main concerns in interventional studies regarding polyphenols' health-benefiting activities, as it compromises the accurate estimation and correct interpretation of studied outcomes.

4. Cocoa Polyphenols and CVD Inflammatory Markers

Evidence from several epidemiological studies has demonstrated the favorable association of cocoa and its derived products with a lower risk of CVD mortality [33,40,151]. Thus, the effect of high cocoa consumption in Kuna Indians who lived in their indigenous islands in Panama has been related to lower blood pressure and low mortality rates as compared to Kunas emigrated to the urban areas of Panama City, revealing its favorable effect [152]. In the Dutch Zutphen Study, in a cohort of elderly men, high cocoa intake was related to lower blood pressure and was inversely associated with cardiovascular and all-cause mortality [33]. In Women's Health Study, chocolate intake was also found to be inversely associated with cardiovascular mortality, along with other foods rich in flavonoids, such as some fruits and red wine [153].

Although the mechanism for the beneficial effects of cocoa and its derived products still remains to be fully elucidated, the potential biological role of flavanols has been suggested by various human interventions [36,38–40] and *in vitro/in vivo* mechanistic studies [39–41]. So far, among the most relevant impacts of cocoa polyphenols on cardiovascular health should be highlighted their effect on the most significant markers of CVD: oxLDL [124,154,155], lipid profile [124,154,156], blood pressure [35,157,158], nitric oxide [52,159], hemostasis [91,148,160] and endothelial dysfunction [159,161,162].

Thus, it is well known that alteration in plasma cholesterol levels (LDL-c and HDL-c) is related to the progression of atherosclerosis and CVD [163]. Dietary medium-term intervention with cocoa powder in mild hypercholesterolemic subjects showed significantly lower levels of LDL-c [164], while the level of HDL-c was found to be increased in normo- and mild hyper-cholesterolemic subjects after dark chocolate or cocoa powder consumption [154,164,165]. A recent study in women affected by normal weight obese syndrome, which is characterized by a higher risk of cardiovascular morbidity and mortality, suggested that regular consumption of dark chocolate had favorable effects on HDL-c, lipoprotein ratios and inflammation markers [166]. Oxidized LDLs play a crucial role in the

progression of atherosclerosis [167]. There are several studies that have established oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) as a useful marker for cardiovascular diseases [168–171]. Cocoa polyphenols have been shown to decrease the oxidation of LDL in *in vitro* studies [172,173]. In addition, intervention studies have demonstrated that isolated LDLs are less prone to *in vitro* oxidation after the consumption of various cocoa products [154,155,174–176]. Moreover, a recent study including 42 high-risk human subjects reported a significant decrease in plasma oxLDL levels in addition to a significant increase in plasma HDL-c concentration after chronic cocoa consumption [124]. The role of cocoa polyphenols has also been investigated for their effect on vascular systems, which could lead to reduced risk of CVD. The main targets include nitric oxide (NO) concentration and endothelial function, along with decreased susceptibility of LDL to oxidation and inhibition of platelet activation and aggregation [155,177,178]. In numerous studies, which were recently reviewed [179], both acute and sustained consumption of flavanol-containing cocoa products were reported to have a dose-dependent beneficial effect on endothelial function via an improvement in FMD. An increase in the plasma nitric oxide (NO) concentration has been shown in healthy subjects after the consumption of cocoa beverages containing different contents of flavanols. This change in plasma NO-modulated FMD indicates an association between increased bioavailability of NO and improved endothelial function [180]. Cocoa polyphenols from dietary sources may also improve endothelial functions by augmenting NO-synthase activity [52,159,181,182], leading to a decrease in systolic and diastolic blood pressure [162,183,184]. Platelet aggregation occurs during the initiation of coronary thrombosis and several studies support evidence about the potent activity of cocoa polyphenols as inhibitors of platelet aggregation and adhesion, thus reducing clot formation [185,186].

Cardiovascular pathology is accompanied by chronic low-intensity inflammation, involving the participation of a variety of cells (endothelial, smooth muscular, monocytes, lymphocytes and platelets), adhesion molecules (selectins, integrins and immunoglobulin superfamily molecules), cytokines (pro-inflammatory and anti-inflammatory), chemokines, growth factors and enzymes (metalloproteases, cyclooxygenases and lipoxygenases) [187]. These inflammatory mediators appear to play a key role in each step of atherogenesis, starting from the initial phases of leukocyte recruitment, to the eventual rupture of the vulnerable atherosclerotic plaque [44]. Some of these key players are often used in the evaluation of a grade of pathological changes or response to treatment, usually referring to them as CVD-related inflammatory markers [188]. Apart from this, inflammation itself is considered a risk factor for CVD [187,189,190]. Therefore, circulating levels of the inflammatory markers could also reflect the current inflammatory state of the individuals, exhibiting their risk status in respect of CVD. The accumulated evidence on the health benefits of cocoa for disorders of a chronic inflammatory nature, such as CVD, prompted the need to focus on the association between bioactive cocoa polyphenols and inflammatory mediators of CVD, with the purpose of identifying and recognizing factors involved and mechanisms underlying this interaction.

4.1. Human Studies

Up until now, only one epidemiologic study has reported on the relationship between cocoa consumption and inflammation. Thus, a large cohort study involving men and women randomly recruited from the general population demonstrated a J-shaped relationship between dark chocolate

consumption and serum hs-CRP, a CVD inflammatory marker. Those subjects who usually consumed up to 1 serving (20 g) of dark chocolate every 3 days had significantly lower serum hs-CRP concentrations than non-consumers [191]. Most of the evidence on the possible interaction between cocoa polyphenols and CVD-related inflammation was obtained in clinical intervention studies involving human subjects. The human intervention studies evaluating the effect of cocoa polyphenols on inflammatory mediators of CVD are presented in Table 1.

As well as the above-mentioned epidemiological study, CRP (C-reactive protein), a biomarker strongly associated with coronary heart disease and inflammation [192], was evaluated in several clinical trials with cocoa (Table 1). However, only a few of these studies reported on changes in CRP levels due to cocoa consumption. Thus, one of the first intervention trials performed by Mathur [176] and Kurlandsky [193] reported no changes in hs-CRP circulation in healthy subjects due to medium-term intervention with dark chocolate. However, a decrease in the CRP systemic levels of healthy subjects was observed after short- and medium-term daily consumption of cocoa beverages in two recent studies [194,195]. The decrease in circulating CRP was shown to be linear in response to the polyphenol content of the consumed cocoa beverages, according to the data from the latest study [195]. It is worth noting that both studies had crossover designs with well-matched treatment controls (adjusted for other important cocoa bioactive compounds, such as theobromine and caffeine), which reinforce the evidence on the role of cocoa polyphenols in this interaction. A short-term intervention study reported on specific gender changes in hs-CRP upon dark chocolate consumption observed in healthy female but not male volunteers [196]. However, these findings should be confirmed in a bigger, controlled matched intervention on a well-recruited female population to avoid any impact of hormonal status during the menstrual cycle on systemic inflammation [197]. In contrast to crossover studies on healthy subjects, no impact of cocoa consumption was observed on the hs-CRP level in subjects with compromised cardiovascular health in the few available studies [123,198,199]. Thus, in a medium-term crossover study with hypertensive pre-diabetic subjects, dark chocolate consumption was compared to white chocolate with an impact on certain CVD markers, including circulating levels of CRP. Although authors reported a beneficial effect of medium-term consumption of dark chocolate on vascular function, insulin sensitivity, and BP in hypertensive patients, no effects were observed on the hs-CRP level [199]. No change in hs-CRP levels was detected either in subjects at high cardiovascular risk in another crossover study after chronic cocoa powder in milk intake [123]. A parallel arm intervention study [198], involving patients with coronary artery disease, reports that over a 6-week period, flavanol-rich cocoa does not modify vascular function in patients with established CAD. Along with vascular functions evaluated postprandially (90 min) and after chronic consumption (3 and 6 weeks), circulating hs-CRP was evaluated. However, it was not affected either by acute or chronic consumption of cocoa-derived products.

Table 1. Human intervention studies considering the relationship between cocoa polyphenols and cardiovascular disease (CVD)-related inflammatory markers (studies are presented in chronological order). Ref. = Reference.

Cocoa Source (dose)	Intervention		Polyphenol Content	Comparison	Population		Markers of Dietary Compliance	Cocoa Consumption Impact	Ref.
	Type (time)	Study Design			N	Subjects Status			
High- vs. Low-procyanidin chocolate (37 g/dose)	AI	CO	High-procyanidin chocolate: 148 mg tot. Pr Low-procyanidin chocolate: 3.3 mg tot. Pr	H vs. L	10	Healthy	2 h plasma (BM) 6 h plasma (BM)	2 h postprandial: ↓leukotriene/prostacyclin ratio ↓leukotrienes (C ₄ + D ₄ + E ₄) ↑prostacyclins	[89]
Dark chocolate + cocoa beverage (36.9 g + 30.95 g/day)	MTI (6 weeks)	NC	Chocolate (daily): 168.3 mg Pr Cocoa beverage (daily): 483.1 mg Pr	Before/After	25	Healthy	Plasma (tot. PPh)	No effect: IL-1beta, IL-6, TNF-α, hs-CRP, P-selectin	[176]
Dark chocolate (41 g/day)	MTI (6 weeks)	PA	NA	Before/After DC vs. Ctrl group	10	Healthy	NA	↓ICAM-1 No effect: VCAM-1 and hs-CRP	[193]
Chocolate and cocoa beverage (48 g chocolate + 18 g cocoa beverage/day)	AI (90 min) MTI (6 weeks)	PA PA	Flavanol group (daily): 444 mg flavanols 107 mg epicatechin Control group (daily): 19.6 mg flavanols 4.7 mg epicatechin	Before/After Flavanol vs. Placebo (Ctrl)	40	Coronary artery disease (CAD)	NA	No effect (acute or chronic): ICAM-1, VCAM-1, E- and P-selectins and hs-CRP	[198]
Low- and High-flavanol cocoa beverages (36 g powder (18.8 g cocoa) per 240 mL W)	MTI (6 weeks)	PA	High-flavanol group: 446 mg tot. flavanols Low-flavanol group: 43 mg tot. flavanols	Before/After H vs. L group	32	Postmenopausal hypercholesterolemic women	Fasting plasma (BM)	↓sVCAM-1(High-flavanol group) No effect: ICAM-1; E- and P-selectins	[200]
Dark chocolate 70% (100 g/day)	STI (7 days)	NC	Daily: 700 mg flavonoids	Before/After	28	Healthy	NA	↓hs-CRP (females only, n = 19) No effect: hs-CRP (common group)	[196]

Table 1. Cont.

Dark chocolate (50 g/day × 2 times/day)	MTI (15 days)	CO	Dark chocolate (daily): 1008 mg tot. PPh 110.9 mg epicatechin 36.12 mg catechin White chocolate(daily): 0.13 g tot. PPh 0.04 mg catechin	DC vs. WC (Ctrl)	19	Hypertensive prediabetic	NA	No effects: hs-CRP	[199]
Cocoa beverage (31 g/150 mL W × 2 times/day)	MTI (2 weeks)	CO	Flavanol beverage (daily): 451 mg tot. PPh 57 mg epicatechin 31 mg catechin 338 mg Pr Control beverage (daily): 14 mg tot. PPh 1 mg epicatechin 4 mg catechin 8 mg Pr	Before/After Flavanol vs. Control beverage (Ctrl)	20	Hypertensive	Fasting plasma (BM)	No effect: TNF- α , IL-6, MCP-1, E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1	[201]
Cocoa powder (20 g/250 mL M × 2 times/day)	MTI (4 weeks)	CO	Daily: 40.41 mg (+)-catechin 46.08 mg (-)-epicatechin 36.54 mg procyanidin B2 495.2 mg tot.PPh 425.7 mg tot.Pr	Cocoa (CM) vs. M (Ctrl)	42	CVD high risk	24 h urine (BM)	↓VLA-4, CD40, CD36 (monocytes) ↓P-selectin and ICAM-1 (serum) Non-significant changes: ↓VCAM-1 and MCP-1 No effect: hs-CRP, IL-6, E-selectin	[123]
High- and Low-cocoa flavanol beverage (NA)	MTI (4 weeks)	CO	High-cocoa flavanol (daily): 494 mg tot. Flavanols Low-cocoa flavanol (daily): 23 mg tot. flavanols	Before/After H vs. L	20	Healthy	Fasting plasma (BM) 24 h urine (BM)	↓CRP (High-cocoa flavanol group)	[194]

Table 1. Cont.

Different flavanol content cocoa beverages vs. Control beverage (28 g cocoa powder in W × 2 times/day)	STI (5 days)	CO	Cocoa beverages (daily): 180 mg flavanols (Low) 400 mg flavanols (Medium) 900 mg flavanols (High) Control beverage (daily): 30 mg flavanols	L, M, H vs. Control beverage (Ctrl)	20	Obese healthy	NA	↓CRP ↓IL-6 No effect: ICAM	[195]
Dark chocolate 70% (25 g × 2 times/day)	MTI (4 weeks)	NC	Daily: 2135 mg PPh	Before/After	20	Hypertensive (excess body weight)	NA	Non-significant changes: ↓ICAM-1 ↓VCAM-1, ↓E-selectin	[202]
Dark chocolate 70% (100 g/day)	STI (7 days)	NC	444 mg/kg catechin 908 mg/kg epicatechin	Before/After	15	Normal weight obese women	NA	↓IL-1Ra and No effect: IL-1α, IL-1β, IL-6, and TNF-α	[166]
Cocoa product rich in fibre (15 g/200 mL M × 2 times/day)	MTI (4 weeks)	CO	13.9 mg/g soluble PPh	Cocoa vs. M (Ctrl)	24 20	Healthy and Hypercholesterolemic subjects	NA	↓IL-1β, IL-10 No effect: IL-6, TNF-α, IL-8, MCP-1, VCAM and ICAM	[156]
Cocoa powder (40 g/250 mL M or W)	AI (6 h)	CO	Daily: 40.41 mg (+)-catechin 46.08 mg (-)-epicatechin 36.54 mg procyanidin B2 495.2 mg tot.PPh 425.7 mg tot.Pr	Before/After Cocoa (CM+CW) vs. W (Ctrl) CM vs. CW	18	Healthy	2 h plasma (BM) 6 h urine (BM)	↓NF-κB ↓E-selectin ↓ICAM-1 No effect: VCAM-1	[203]

AI—acute intervention; BM—biomarkers for dietary compliance (e.g., phase II epicatechin metabolites and/or total epicatechin or total flavanols); C—cocoa; CO—crossover design; CRP—C-reactive protein; hs-CRP—high sensitivity C-reactive protein; Ctrl—control; DC—dark chocolate; ICAM-1, Intercellular Adhesion Molecule-1; IL-6, Interleukin-6; M—Milk; MCP-1—Monocyte Chemoattractant Protein-1; MTI—medium-term intervention; NC—no control design; PA—parallel arm design; PPh—polyphenols; STI—short-term intervention; VCAM-1—Vascular Cell Adhesion Molecule-1; VLA-4—Very Late Activation Antigen-4; W—water; WC—white chocolate.

The differences in the circulating levels of cell adhesion molecules may reveal a stage for pathophysiological events due to activation or damage to various cells [204–206]. Some studies with solid designs (crossover and parallel arm), involving both healthy and unhealthy subjects, were not able to detect cocoa intake-provoked changes in the circulation of key adhesion molecules such as ICAM-1 and VCAM-1 [156,195,198,201]. However, some other studies reported a positive impact of cocoa consumption on the different types of CVD inflammation-related adhesion molecules. Thus, in a group of postmenopausal hypercholesterolemic women consuming a high-flavanol cocoa beverage (446 mg of total flavanols), there was a 2.4-fold increase in hyperemic blood flow associated with a significant decrease in plasma levels of VCAM-1, compared to the low-flavanol cocoa beverage group (43 mg of total flavanols). However, no differences were seen for E- and P-selectins, along with ICAM-1 [200]. On the other hand, no significant changes were observed for VCAM-1, but circulating ICAM-1 concentrations significantly decreased after consumption of dark chocolate (41 g/day) by healthy subjects [193]. A study performed by Monagas and colleagues suggests that the chronic consumption of cocoa powder may modulate the expression of adhesion molecules (soluble and expressed on T-cell and monocyte surfaces) related to the early stages of atherosclerosis in subjects at high risk of coronary heart disease. In a randomized crossover medium-term feeding trial they demonstrated a lower serum concentration of P-selectin and ICAM-1 and decreased expression of cell adhesion molecules (very late activation antigen-4 (VLA-4), CD40, and CD36) on the monocyte surface after intervention with cocoa powder in skimmed milk (C + M) vs. only skimmed milk ingestion (M). The circulating levels of VCAM-1 and MCP-1 concentrations were also lower, but not statistically significant, while that of E-selectin remained unchanged after C+M compared with M intake [123]. Their results agreed with the previously reported decrease in ICAM-1 in healthy volunteers due to chronic dark chocolate consumption [193]. However, for the first time a positive effect of cocoa consumption on P-selectin concentrations was reported by Monagas and colleagues, in contrast to previous results obtained on both healthy [176] and health-compromised subjects [198,200].

Nuclear factor κ B (NF- κ B) is a key molecule in the pathophysiology of atherosclerosis involved in the regulation of adhesion molecules and cytokine expression [207]. A recent crossover study on healthy subjects evaluated the effect of acute cocoa consumption in different matrices related to the bioavailability of cocoa polyphenols in NF- κ B activation and the expression of adhesion molecules [203]. The administration of 40 g of cocoa powder either with milk (CM) or water (CW) decreased ICAM concentration 6 h after intake, while E-selectin levels were lower only after CW intervention, with no changes in VCAM-1 concentration either with CM or CW interventions. Acute consumption of cocoa with water (CW) significantly decreased NF- κ B activation in peripheral blood monocytes compared to baseline and to CM [203], whereas milk treatment alone (control) significantly induced NF- κ B activation. On the other hand, cocoa mixed with milk had no effects on NF- κ B activation. The observed differences were attributed to the different bioavailability of polyphenolic compounds present in cocoa powder when taken with milk or water, which was monitored during the study as urinary host phase II (epicatechin-Glucs and -Sulfs) and microbial (sum of the 3,4-dihydroxyphenylacetic, protocatechuic, 4-hydroxybenzoic, 4-hydroxyhippuric, hippuric, caffeic and ferulic acids) metabolites [203]. Therefore, it was suggested that cocoa consumption could confer beneficial anti-inflammatory effects mediated by inhibition of the NF- κ B-dependent transcription pathway or interaction with certain cytokines and the food matrix can modulate this effect.

Interleukins are thought to be involved in the chronic inflammatory response that is typical of atherosclerosis [206]. A one-week regular consumption of dark chocolate (100 g/day) in normal weight obese women showed a significant reduction in the serum level of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and its positive correlation with total cholesterol, LDL cholesterol and CVD risk indexes changes. A neutral effect on other pro-inflammatory cytokine (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α) and hs-CRP levels was reported [166]. Similar results were obtained for inflammatory markers including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and P-selectin along with hs-CRP in a non-controlled clinical trial, which failed to find any changes in interleukins in healthy subjects upon consumption of polyphenol-rich cocoa supplements, consisting of dark chocolate (36.9 g/day) and cocoa powder (30.95 g/day) for 6 weeks [176]. However, a recent crossover study [156] on normo- and hyper-cholesterolemic subjects demonstrated the decreased serum level of IL-1 β and IL-10 after regular 4-week consumption of cocoa products with milk (15 g twice per day) as compared to control (milk). Other measured parameters such as IL-6, TNF- α , IL-8, MCP-1, and vascular and intracellular cell adhesion molecule levels remained unchanged [156].

Recently, leukotrienes (LTs) have been implicated as mediators, biomarkers, and possible therapeutic targets in the context of subclinical atherosclerosis [208]. Leukotrienes are arachidonic acid (AA)-derived lipid mediators of inflammation, exerting a range of pro-inflammatory effects, and have proved to be important mediators in inflammatory conditions such as preclinical atherosclerosis. For this reason, it has been suggested that leukotriene synthesis inhibitors and leukotriene receptor antagonists induce beneficial effects at preclinical stages of the atherosclerotic process [209]. Data from an early short-term crossover intervention study suggest that cocoa polyphenols can favourably alter eicosanoid synthesis in humans, providing a plausible hypothesis for a mechanism by which they can decrease platelet activation in humans [89]. Thus, the consumption of high-procyanidin chocolate resulted in increased prostacyclin and decreased leukotriene concentrations, and, as result, in a decreased leukotriene-prostacyclin ratio, a measure of the pro-inflammatory/anti-inflammatory eicosanoid balance [89].

Although the majority of human studies provide evidence for a possible interaction between cocoa polyphenols and inflammatory mediators involved in CVD, practically all of them warn about certain limitations and appeal for further, better designed intervention studies to confirm the presented outcomes. Overall, in order to determine the biological effect of cocoa polyphenols and to reach any beneficial conclusion that could possibly be implemented in human health, large-scale randomized placebo-controlled studies are required to confirm and expand upon the potential anti-inflammatory role of polyphenol-rich cocoa products. Moreover, the design of human intervention trials should use a relevant amount of cocoa products, which corresponds to real-life doses and could readily be incorporated into the regular human diet.

4.2. Animal Models, in Vitro and Cell Culture Studies

There are not many *in vivo* animal studies specifically focused on the CVD-related activity of cocoa polyphenols, and even fewer considering inflammatory mediators [41]. However, as demonstrated by human studies, animal intervention studies also support the capability of cocoa polyphenols to effectively suppress the production of cytokines and adhesion molecules that promote CVD-related

inflammation. In a recent study by Gu and colleagues [210], male mice previously fed with a high-fat (HF) diet for 8 weeks were randomized to a HF diet or HF diet supplemented with 8% cocoa powder (HF-HFC group) for 10 weeks. Cocoa supplementation significantly decreased the plasma levels of the pro-inflammatory mediators, IL-6 (30.4%) and the expression of several pro-inflammatory genes (*Il6*, *Il12b*, *Nos2*, and *Emr1*) in mice. Moreover, unlike the study reported by Monagas and colleagues [123] in humans, the above study also demonstrated a significant decrease in MCP-1, after cocoa supplementation.

It is noteworthy that the composition of chocolate or cocoa differing in polyphenol contents and dietary doses could lead to different outcomes in CVD risk end points [211,212]. Most of the human intervention studies using chocolate or cocoa powder supplementation have reported a protective effect related to systemic inflammation. On the other hand, a recent study by Yakala *et al.* [213] demonstrated the unfavorable effect of chocolate consumption on cardiovascular parameters. In this study, the effects of chocolate supplementation were studied in ApoE*3-Leiden mice, a model susceptible to diet-induced atherosclerosis, fed with a high-cholesterol control diet supplemented with two different chocolates (A and B), where chocolate A had a relatively high-polyphenol and low-fibre content compared to chocolate B. After both chocolate treatments, an increase in plasma cholesterol and atherosclerotic plaque formation was observed, compared to the mice fed only with a high-cholesterol diet. In addition, mice on a high-cholesterol diet supplemented with chocolate B showed elevated plasma levels of VCAM-1 and E-selectin, whereas the chocolate A showed no effects. Supplementation with chocolate A appeared to be less unfavorable than chocolate B with respect to inflammatory parameters, which was related to the higher circulating polyphenol concentrations present in the A group. Therefore, the discrepancies reported in this study were attributed to the difference in the polyphenol composition of chocolate and quantity consumed. In contrast to the chocolate intervention, a recent study reported that a 7-day high-cocoa diet (4.8 g/kg/day) reduced the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α), along with the production of NO and reactive oxygen species, in rat peritoneal macrophages *ex vivo* [214]. However, no significant changes were found in this study when a lower (2.4 g/kg/day) cocoa diet was applied.

In comparison to animal models, *in vitro* and cell culture models were more extensively applied in research on the CVD anti-inflammatory properties of cocoa polyphenols.

Table 2 represents the studies regarding the effects of cocoa polyphenols on inflammatory mediators discussed previously for human intervention studies. The *in vitro* and cell culture experiments were originally appointed to help identify cellular and molecular targets for the anti-inflammatory activities of cocoa polyphenols.

Table 2. *In vitro* studies on cocoa polyphenol CVD-related anti-inflammatory activities. Ref. = Reference.

Model	Treatment (dose)	Outcomes	Ref.
<i>Leukotrienes</i>			
(a) Isolated rabbit 15-LOX-1 (b) Recombinant human platelet 12-LOX	(a) Cocoa procyanidins: monomers to decamers (2.9 mg/mL) (b) Epicatechin & procyanidin decamers	Dose-dependent: (a) ↓15-LOX-1 activity (b) ↓12-LOX activity	[215]
Recombinant human 5-LOX	Cocoa epicatechin & procyanidins (10 μmol/L)	↓5-LOX activity ↓Pro-inflammatory mediators (LTB4, LTC4, LTD4)	[216]
<i>Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines</i>			
PHA-stimulated PBMC	Cocoa procyanidins: monomers through decamers (25 μg/mL)	↓IL-1β secretion (monomer to tetramer) ↑IL-1β secretion (pentamer to decamer) ↓IL-2 expression (pentamer to heptamer) ↓IL-4 expression & secretion (pentamer to decamer)	[217]
Human PBMC	Cocoa procyanidins: monomers through decamers (25 μg/mL)	↑IL-1β transcription & secretion (pentamers-decamers) ↓IL-1β transcription & secretion (monomers-tetramers)	[218]
Resting and (PHA)-stimulated human PBMC	Cocoa procyanidins: monomers through decamers (25 μg/mL)	Resting PBMCs: ↑IL-4 secretion (hexamer-decamer fraction) PHA-stimulated PBMCs: ↑IL-4 secretion (monomeric fraction) ↓IL-4 secretion (hexamer-decamer fraction)	[219]
Resting and (PHA)-stimulated human PBMC	CFP fractions: monomers through decamers (25 μg/mL)	↓ TNF-α (monomers and dimers) ↑ TNF-α (tetramers through octamers)	[220]
PHA-stimulated PBMC	Cocoa flavanols and their related oligomers (25 μg/mL)	↓ IL-5 release (oligomeric fractions: hexamers to decamers)	[221]
Rat NR8383 macrophages	Cocoa polyphenol extract (10–50 μg/mL tot. PPh) vs. epicatechin (30–60 μg/mL tot. PPh)	↓ TNF-α, MCP-1, IL-1α, IL-6)	[222]

Table 2. Cont.

<i>Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines</i>			
Murine EL4BOU6 lymphocytes	Cocoa extract (5–80 µg/mL tot. PPh) vs. epicatechin (60–120 µg/mL tot. PPh)	↓IL-2 secretion ↑IL-4 secretion ↓T lymphocyte activation	[223]
Human PBMC	Cocoa flavanol fractions: Short (monomers-pentamers) Long-chain (hexamers-decamers) (20 µg/mL)	↑IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α (long-chain fraction)	[224]
LPS-stimulated human PBMC	Cocoa phenolic acids: (3,4-DHPPA, 3-HPA, 3,4-DHPAA, 3-HPAA, 4-HBA) (1 µM)	↓TNF-α ↓IL-6 ↑IL-1β	[225]
<i>NF-κB Activity</i>			
Jurkat T cells	Purified cocoa: [(-)-epicatechin (EC) and (+)-catechin (CT)] and a B dimeric procyanidin (DP-B) (1.7–17.2 µM)	↓NF-κB ↓IL-2 transactivation	[226]

4-DHPAA—3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 3,4-DHPPA—3,4 dihydroxyphenylpropionic acid; 3-HPA—3-hydroxyphenylpropionic acid; 3-HPAA—3-hydroxyphenylacetic acid; 4-HBA—4-hydroxybenzoic acid; CFP—Cocoa flavanols preparation; LOX—lipoxygenase; MCP-1—monocyte chemoattractant protein-1; PBMC—peripheral blood mononuclear cells; PHA—phytohemagglutinin; VSMC—vascular smooth muscle cells.

It has been shown that cocoa polyphenols can inhibit lipoxigenase activity *in vitro* [215,216]. Inflammatory mediators, leukotrienes, are formed via the 5-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism; therefore, cocoa polyphenols might modulate leukotrienes via eicosanoid metabolism [180]. Schewe and colleagues [215,216] reported that cocoa (–)-epicatechin and its low-molecular procyanidins inhibit both dioxygenase and LTA(4) synthase activities of human 5-LOX, the first two consecutive steps in the conversion of arachidonic acid into leukotrienes. Moreover, epicatechin and procyanidin decamer inhibited the recombinant human platelet 12-LOX. They suggested that this mechanism may underlie a putative anti-inflammatory effect of cocoa products. Thus, their outcomes are in line with the results from the *in vivo* study, where healthy subjects had lower levels of the plasma leukotrienes LTC₄, LTD₄ and LTE₄, along with increased levels of prostacyclin, 2 h after procyanidin-rich chocolate consumption [89].

Intervention studies suggest that dietary cocoa polyphenols may modulate atherogenic inflammatory processes via interaction with cytokines. Several *in vitro* studies have studied the immunomodulatory effects of cocoa polyphenols on the production of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells (Table 2). Thus, studies performed by Mao and colleagues [217–221] demonstrated that some fraction of cocoa polyphenols may exhibit anti-inflammatory activities by modulating the production of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-2, IL-6 and TNF- α , and secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-4 [219]. The nature and extent of this modulation were strongly dependent on the degree of polymerization of the tested procyanidins. Thus, smaller fractions of cocoa polyphenols (monomers-tetramers) consistently decreased pro-inflammatory IL-1 β expression, while the larger oligomers (pentamers-decamers) increased its expression [218]. Ramiro and colleagues also reported that cocoa extract and epicatechin mediated a decrease in the secretion and RNA expression of various pro-inflammatory mediators by macrophages, such as MCP-1, TNF- α , IL-1 α , and IL-6 mRNA expressions, suggesting that a cocoa polyphenol inhibitory effect on cytokine secretion is produced, in part, at the transcriptional level [222]. However, a striking increase in the LPS-induced synthesis of IL-1 β , IL-6, IL-10, and TNF- α in the presence of long-chain flavanols from cocoa by mononuclear cells was demonstrated in another *in vitro* study [224]. Epicatechin and cocoa extract were also shown to significantly reduce IL-2R α (CD25) expression and IL-2 secretion on activate peripheral blood mononuclear cells [223]. In resting and PHA-stimulated PBMC, the intermediate-sized cocoa flavanol and procyanidin fractions (tetramers to octamers) were shown to display an increase in TNF- α secretion. The monomers and dimers were slightly inhibitory, while trimers, nonamers and decamers induced TNF- α levels [220]. Cocoa flavanols and their related oligomers were also able to modulate IL-5 in PHA-stimulated peripheral blood mononuclear cells [221].

A study reported the effect of cocoa microbial-derived phenolic acids (3,4 dihydroxyphenylpropionic acid (3,4-DHPPA), 3-hydroxyphenylpropionic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (3,4-DHPAA), 3-hydroxyphenylacetic acid, 4-hydroxybenzoic acid and 4-hydroxyhippuric acid (4-HHA)) on the modulation of the production of pro-inflammatory cytokines, *i.e.*, TNF- α , IL-1 β and IL-6, in LPS-stimulated PBMC [225]. The phenolic acids used were at a biological concentration level (1 mM) within the range (0.1–10 mM) found in plasma samples after cocoa polyphenol intake [227]. Only the dihydroxylated compounds, 3,4-DHPPA and 3,4-DHPAA, with the exception of 4-HHA for TNF- α secretion, significantly inhibited the secretion of these pro-inflammatory cytokines. The concentrations of IL-6 were reduced with 3,4-DHPPA and 3,4-DHPAA pretreatment. This study demonstrated that

dihydroxylated phenolic acids derived from colonic microbial metabolites could probably act as an anti-inflammatory agent, providing favourable effects on CVD [225].

NF-κB is a redox-sensitive transcription factor that regulates the expression of large family of genes, including those encoding proteins involved in inflammation such as IL-1, IL-6, and TNF-α [228]. Flavanols have been shown to modulate the inflammatory effect in cultured RAW264.7 murine macrophages via *NF-κB* pathways, and this depended on the degree of polymerization [229]. Thus, monomers and dimers repressed the TNF-α secretion and *NF-κB*-dependent gene expression induced by interferon γ, whereas the procyanidin C2 enhanced them. Epicatechin monomers were also shown to interact with *NF-κB* and inhibit TNF-α-stimulated activation of T lymphocytes [226]. Epicatechin and procyanidins can inhibit *NF-κB* at different levels in the activation pathways, where the decrease in cell oxidants that are involved in *NF-κB* activation and the prevention of *NF-κB* activation via specific interaction with signaling proteins are seen as main mechanisms [230]. On the whole, the results from these studies demonstrate that cocoa polyphenols can act as modulators of the immune response in immune cells involved in the early stages of atherogenic inflammation.

Although only a few studies have been carried out, animal experiments are expected to contribute much to the mechanistic understanding of the role of cocoa polyphenols in CVD inflammatory processes. However, these models have certain limitations that should be considered while interpreting results and extrapolating them to humans: type and dose for intervention, model vs. human-specific metabolism, etc. Regarding *in vitro* and cell culture studies, the main concern is the type of cocoa polyphenols applied for treatment. Since in CVD-related inflammatory research models usually represent the processes normally occurring close to systemic circulation (immune cells, vascular and endothelial tissues), the main compounds considered in these interactions should be bioavailable metabolites of polyphenols, mainly presented as phase II host and microbial metabolites of epicatechin. In addition, it is difficult to make an alignment between doses of polyphenols tested in *in vitro* models and those normally related to dietary consumption in humans.

5. Conclusions

The data from clinical and experimental studies considered in this review suggest that cocoa products, due to its high polyphenol content, may exert anti-inflammatory properties. Yet much remains to be elucidated on the interaction of cocoa polyphenols with inflammatory mediators involved in cardiovascular pathology. Larger, well-designed, placebo-controlled studies are expected to approach this question. At this point, there is a certain need to address recently raised new aspects regarding cocoa polyphenol bioavailability in future investigations. One of them is the role of cocoa polyphenol metabolites in respect of their anti-inflammatory properties. Cocoa polyphenol bioavailability depends on numerous varying components, which are sometimes difficult to control in clinical and population studies. To get a better approximation of the association between cocoa polyphenol consumption and its health outcomes, a detailed monitoring of cocoa polyphenol bioavailability during intervention studies is required. Two main groups of metabolites should be considered, both in human and in model studies: host and microbiota-derived metabolites. Recent human studies have already started to account for these metabolites, not only as dietary compliance biomarkers, but also to assess their impact on human health [156,166,202,203,210,214]. This is also

supported by the fact that polyphenol microbial metabolites can exert various biological activities, some of them with anti-inflammatory potential [106,123,225]. The role of phase II conjugation is another issue to be considered, especially in mechanistic studies on cocoa polyphenol bioactivities, e.g., their anti-inflammatory properties. Both host and microbial metabolites are mainly present as phase II conjugates in systemic circulation upon dietary intake of cocoa products. Therefore, they are principal forms of cocoa polyphenols available for targeting the inflammatory process *in vivo*. Being distinct from core compounds in their properties, these metabolites warrant being considered as principal mediators in cocoa CVD-related anti-inflammatory activities. On the other hand, a possible intracellular deconjugation metabolism of phase II metabolites, as was recently reported in a case with resveratrol [231], should also be considered and investigated in detail for cocoa polyphenols.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support granted by the following Spanish government programmes: CICYT AGL2009-13906-C02-01, AGL2010-10084-E and FUN-C Food CSD2007-063 from the Ingenio-CONSOLIDER programme of the Spanish Government. The postdoctoral contract fellowship, awarded by the Ministry of Innovation and Science to Olha Khymenets and Sara Tulipani (Juan de la Cierva Program), and the predoctoral fellowships awarded by the Generalitat de Catalunya (FI-DRG) to Ximena Mora-Cubillos and Mar Garcia-Aloy are acknowledged. Mireia Urpí-Sardà and Rafael Llorach would like to thank Ramon y Cajal Program of the Spanish Ministry (MINECO) and the Fondo Social Europeo.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.
2. Lloyd-Jones, D.; Adams, R.J.; Brown, T.M.; Carnethon, M.; Dai, S.; de Simone, G.; Ferguson, T.B.; Ford, E.; Furie, K.; Gillespie, C.; *et al.* Heart disease and stroke statistics—2010 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* **2010**, *121*, e46–e215.
3. Mathers, C.D.; Loncar, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e442.
4. Halfon, N.; Hochstein, M. Life course health development: An integrated framework for developing health, policy, and research. *Milbank Q.* **2002**, *80*, 433–479.
5. Ben-Shlomo, Y.; Kuh, D. A life course approach to chronic disease epidemiology: Conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives. *Int. J. Epidemiol.* **2002**, *31*, 285–293.
6. Wang, D.; He, Y.; Li, Y.; Luan, D.; Zhai, F.; Yang, X.; Ma, G. Joint association of dietary pattern and physical activity level with cardiovascular disease risk factors among Chinese men: A cross-sectional study. *PLoS One* **2013**, *8*, e66210.

7. Chomistek, A.K.; Manson, J.E.; Stefanick, M.L.; Lu, B.; Sands-Lincoln, M.; Going, S.B.; Garcia, L.; Allison, M.A.; Sims, S.T.; LaMonte, M.J.; *et al.* Relationship of sedentary behavior and physical activity to incident cardiovascular disease: Results from the Women's Health Initiative. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2013**, *61*, 2346–2354.
8. Chomistek, A.K.; Cook, N.R.; Flint, A.J.; Rimm, E.B. Vigorous-intensity leisure-time physical activity and risk of major chronic disease in men. *Med. Sci. Sports Exerc.* **2012**, *44*, 1898–1905.
9. Salehi-Abargouei, A.; Maghsoudi, Z.; Shirani, F.; Azadbakht, L. Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)-style diet on fatal or nonfatal cardiovascular diseases-incidence: A systematic review and meta-analysis on observational prospective studies. *Nutrition* **2013**, *29*, 611–618.
10. He, M.; van Dam, R.M.; Rimm, E.; Hu, F.B.; Qi, L. Whole-grain, cereal fiber, bran, and germ intake and the risks of all-cause and cardiovascular disease-specific mortality among women with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* **2010**, *121*, 2162–2168.
11. De Moura, F.F.; Lewis, K.D.; Falk, M.C. Applying the FDA definition of whole grains to the evidence for cardiovascular disease health claims. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 2220S–2226S.
12. Nettleton, J.A.; Steffen, L.M.; Loehr, L.R.; Rosamond, W.D.; Folsom, A.R. Incident heart failure is associated with lower whole-grain intake and greater high-fat dairy and egg intake in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J. Am. Diet. Assoc.* **2008**, *108*, 1881–1887.
13. Dauchet, L.; Ferrieres, J.; Arveiler, D.; Yarnell, J.W.; Gey, F.; Ducimetiere, P.; Ruidavets, J.B.; Haas, B.; Evans, A.; Bingham, A.; *et al.* Frequency of fruit and vegetable consumption and coronary heart disease in France and Northern Ireland: The PRIME study. *Br. J. Nutr.* **2004**, *92*, 963–972.
14. Dauchet, L.; Montaye, M.; Ruidavets, J.B.; Arveiler, D.; Kee, F.; Bingham, A.; Ferrieres, J.; Haas, B.; Evans, A.; Ducimetiere, P.; *et al.* Association between the frequency of fruit and vegetable consumption and cardiovascular disease in male smokers and non-smokers. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, 578–586.
15. Scalbert, A.; Johnson, I.T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S–217S.
16. Arts, I.C.; Hollman, P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 317S–325S.
17. Bhupathiraju, S.N.; Tucker, K.L. Greater variety in fruit and vegetable intake is associated with lower inflammation in Puerto Rican adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 37–46.
18. Clifton, P.M. Effect of grape seed extract and quercetin on cardiovascular and endothelial parameters in high-risk subjects. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *2004*, 272–278.
19. Aviram, M.; Rosenblat, M.; Gaitini, D.; Nitecki, S.; Hoffman, A.; Dornfeld, L.; Volkova, N.; Presser, D.; Attias, J.; Liker, H.; *et al.* Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin. Nutr.* **2004**, *23*, 423–433.
20. George, T.W.; Niwat, C.; Waroonphan, S.; Gordon, M.H.; Lovegrove, J.A. Effects of chronic and acute consumption of fruit- and vegetable-puree-based drinks on vasodilation, risk factors for CVD and the response as a result of the eNOS G298T polymorphism. *Proc. Nutr. Soc.* **2009**, *68*, 148–161.

21. Duthie, S.J.; Jenkinson, A.M.; Crozier, A.; Mullen, W.; Pirie, L.; Kyle, J.; Yap, L.S.; Christen, P.; Duthie, G.G. The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 113–122.
22. Franke, A.A.; Cooney, R.V.; Henning, S.M.; Custer, L.J. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 5170–5178.
23. Naruszewicz, M.; Laniewska, I.; Millo, B.; Dłuzniewski, M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infarction (MI). *Atherosclerosis* **2007**, *194*, e179–e184.
24. Source: UNCTAD Based on the Data from International Cocoa Organization, Quaterly Bulletin of Cocoa Statistics). Available online: <http://www.unctad.info/en/Infocomm/Beverages/Cocoa2/Market/> (accessed on 10 August 2013).
25. Lee, K.W.; Kim, Y.J.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7292–7295.
26. Vinson, J.A.; Proch, J.; Zubik, L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4821–4824.
27. Lea, A.G.H. The Procyanidins of Cocoa. In Proceedings of the American Chemical Society Meeting, Denver, CO, USA, 5–10 April 1987.
28. Lea, A.G.H.; Ford, G.D. *The Polyphenols of Cocoa Part I: Isolation and Characterisation of Procyanidins from Unfermented Beans*; The Cadbury Schweppes Group: London, UK, 1988.
29. Lea, P.J.; Ford, G.D. *Characterisation of the Polyphenols of Cocoa*; Bioflavour: Glasgow, UK, 1990.
30. Niemenak, N.; Rohsius, C.; Elwers, S.; Ndoumou, D.O.; Lieberei, R. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 612–619.
31. Waterhouse, A.L.; Shirley, J.R.; Donovan, J.L. Antioxidants in chocolate. *Lancet* **1996**, *348*, 834.
32. Adamson, G.E.; Lazarus, S.A.; Mitchell, A.E.; Prior, R.L.; Cao, G.; Jacobs, P.H.; Kremers, B.G.; Hammerstone, J.F.; Rucker, R.B.; Ritter, K.A.; et al. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4184–4188.
33. Buijsse, B.; Feskens, E.J.; Kok, F.J.; Kromhout, D. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: The Zutphen Elderly Study. *Arch. Intern. Med.* **2006**, *166*, 411–417.
34. Janszky, I.; Mukamal, K.J.; Ljung, R.; Ahnve, S.; Ahlbom, A.; Hallqvist, J. Chocolate consumption and mortality following a first acute myocardial infarction: The Stockholm Heart Epidemiology Program. *J. Intern. Med.* **2009**, *266*, 248–257.
35. Ried, K.; Sullivan, T.R.; Fakler, P.; Frank, O.R.; Stocks, N.P. Effect of cocoa on blood pressure. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *8*, CD008893.
36. Hooper, L.; Kay, C.; Abdelhamid, A.; Kroon, P.A.; Cohn, J.S.; Rimm, E.B.; Cassidy, A. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 740–751.
37. Jia, L.; Liu, X.; Bai, Y.Y.; Li, S.H.; Sun, K.; He, C.; Hui, R. Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *92*, 218–225.

38. Hooper, L.; Kroon, P.A.; Rimm, E.B.; Cohn, J.S.; Harvey, I.; le Cornu, K.A.; Ryder, J.J.; Hall, W.L.; Cassidy, A. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 38–50.
39. Visioli, F.; Bernaert, H.; Corti, R.; Ferri, C.; Heptinstall, S.; Molinari, E.; Poli, A.; Serafini, M.; Smit, H.J.; Vinson, J.A.; *et al.* Chocolate, lifestyle, and health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2009**, *49*, 299–312.
40. Corti, R.; Flammer, A.J.; Hollenberg, N.K.; Luscher, T.F. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation* **2009**, *119*, 1433–1441.
41. Rimbach, G.; Melchin, M.; Moehring, J.; Wagner, A.E. Polyphenols from cocoa and vascular health—A critical review. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 4290–4309.
42. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2012**, *32*, 2045–2051.
43. Packard, R.R.; Libby, P. Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 24–38.
44. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **2002**, *420*, 868–874.
45. Hansson, G.K. Inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7*, 328–331.
46. Willerson, J.T.; Ridker, P.M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation* **2004**, *109*, II2–II10.
47. Kaplan, R.C.; Frishman, W.H. Systemic inflammation as a cardiovascular disease risk factor and as a potential target for drug therapy. *Heart Dis.* **2001**, *3*, 326–332.
48. Tangney, C.C.; Rasmussen, H.E. Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2013**, *15*, 324.
49. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317–333.
50. Harwood, M.L.; Ziegler, G.R.; Hayes, J.E. Tolerance for high flavanol cocoa powder in semisweet chocolate. *Nutrients* **2013**, *5*, 2258–2267.
51. Wollgast, J.; Anklam, E. Review on polyphenols in theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 423–447.
52. Schroeter, H.; Heiss, C.; Balzer, J.; Kleinbongard, P.; Keen, C.L.; Hollenberg, N.K.; Sies, H.; Kwik-Urbe, C.; Schmitz, H.H.; Kelm, M. (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1024–1029.
53. Porter, L.J.; Ma, Z.; Chan, B.G. Cacao procyanidins: Major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1657–1663.
54. Hurst, W.J.; Glinski, J.A.; Miller, K.B.; Apgar, J.; Davey, M.H.; Stuart, D.A. Survey of the trans-resveratrol and trans-piceid content of cocoa-containing and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8374–8378.
55. Lamuela-Raventos, R.M.; Andres-Lacueva, C.; Permanyer, J.; Izquierdo-Pulido, M. More antioxidants in cocoa. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 834–835.

56. Sanchez-Rabaneda, F.; Jauregui, O.; Casals, I.; Andres-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventos, R.M. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 35–42.
57. Qin, Y.Z.; Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Ensunsa, J.L.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Stability of flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1700–1705.
58. Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds—Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094–1117.
59. Hammerstone, J.F.; Lazarus, S.A.; Mitchell, A.E.; Rucker, R.; Schmitz, H.H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 490–496.
60. Tanaka, T.; Kondou, K.; Kouno, I. Oxidation and epimerization of epigallocatechin in banana fruits. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 311–316.
61. Zhu, Q.Y.; Hammerstone, J.F.; Lazarus, S.A.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Stabilizing effect of ascorbic acid on flavan-3-ols and dimeric procyanidins from cocoa. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 828–833.
62. Kelm, M.A.; Johnson, J.C.; Robbins, R.J.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 1571–1576.
63. Clapperton, J.; Lockwood, R.; Romanczyk, L.; Hammerstone, J.F. Contribution of genotype to cocoa (*Theobroma cacao* L.) flavour. *Trop. Agric.* **1994**, *71*, 303–308.
64. Azizah, O.; Amin, I.; Nawalyah, A.G.; Ilham, A. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1523–1530.
65. Cooper, K.A.; Campos-Gimenez, E.; Jimenez Alvarez, D.; Nagy, K.; Donovan, J.L.; Williamson, G. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and inter-relationships of their concentrations in chocolate. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2841–2847.
66. Kim, H.; Keeney, P.G. (–)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* **1984**, *49*, 1090–1092.
67. Robinson, T.; Ranalli, A.W.; Phillips, A.W. Changes in cocoa tannins during processing. *J. Agric. Food Chem.* **1961**, *9*, 295–298.
68. Andres-Lacueva, C.; Monagas, M.; Khan, N.; Izquierdo-Pulido, M.; Urpi-Sarda, M.; Permanyer, J.; Lamuela-Raventos, R.M. Flavanol and flavonol contents of cocoa powder products: Influence of the manufacturing process. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3111–3117.
69. Kyi, T.M.; Wan Ramli, W.D.; Abu Bakar, M.; Mohd. Wahid, S.; Abdul Amir, H.K.; Meor Zainal, M.T. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of malaysian cocoa beans. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2005**, *40*, 323–331.
70. Payne, M.J.; Hurst, W.J.; Miller, K.B.; Rank, C.; Stuart, D.A. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10518–10527.

71. Hurst, W.J.; Krake, S.H.; Bergmeier, S.C.; Payne, M.J.; Miller, K.B.; Stuart, D.A. Impact of fermentation, drying, roasting and Dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 53.
72. Hii, C.L.; Law, C.L.; Suzannah, S.; Misnawi; Cloke, M. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian J. Food Agro Ind.* **2009**, *2*, 702–722.
73. Gu, L.; House, S.E.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R.L. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4057–4061.
74. De Brito, E.S.; Garcia, N.H.P.; Gallao, M.I.; Cortelazzo, A.L.; Fevereiro, P.S.; Braga, M.R. Structural and chemical changes in cocoa (*Theobroma Cacao*) during fermentation, drying and roasting. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *81*, 281–288.
75. Cooper, K.A.; Donovan, J.L.; Waterhouse, A.L.; Williamson, G. Cocoa and health: A decade of research. *Br. J. Nutr.* **2008**, *99*, 1–11.
76. Miller, K.B.; Stuart, D.A.; Smith, N.L.; Lee, C.Y.; McHale, N.L.; Flanagan, J.A.; Ou, B.; Hurst, W.J. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4062–4068.
77. Miller, K.B.; Hurst, W.J.; Flannigan, N.; Ou, B.; Lee, C.Y.; Smith, N.; Stuart, D.A. Survey of commercially available chocolate- and cocoa-containing products in the United States. 2. Comparison of flavan-3-ol content with nonfat cocoa solids, total polyphenols, and percent cacao. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9169–9180.
78. Neveu, V.; Perez-Jimenez, J.; Vos, F.; Crespy, V.; du Chaffaut, L.; Mennen, L.; Knox, C.; Eisner, R.; Cruz, J.; Wishart, D.; *et al.* Phenol-Explorer: An online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database* **2010**, *2010*, bap024.
79. Donovan, J.L.; Crespy, V.; Oliveira, M.; Cooper, K.A.; Gibson, B.B.; Williamson, G. (+)-Catechin is more bioavailable than (–)-catechin: Relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1029–1034.
80. Kofink, M.; Papagiannopoulos, M.; Galensa, R. (–)-Catechin in cocoa and chocolate: Occurrence and analysis of an atypical flavan-3-ol enantiomer. *Molecules* **2007**, *12*, 1274–1288.
81. Natsume, M.; Osakabe, N.; Yamagishi, M.; Takizawa, T.; Nakamura, T.; Miyatake, H.; Hatano, T.; Yoshida, T. Analyses of polyphenols in cacao liquor, cocoa, and chocolate by normal-phase and reversed-phase HPLC. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 2581–2587.
82. Andrés-Lacueva, C.; Lamuela-Raventós, R.M.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Izquierdo-Pulido, M.; Permanyer, J. An LC method for the analysis of cocoa phenolics. *LC GC Eur.* **2000**, *12*, 902–904.
83. Bonvehi, J.S.; Coll, F.V. Evaluation of the bitterness and astringency of polyphenolic compounds in cocoa powder. *Food Chem.* **1997**, *60*, 365–370.
84. Stahl, L.; Miller, K.B.; Apgar, J.; Sweigart, D.S.; Stuart, D.A.; McHale, N.; Ou, B.; Kondo, M.; Hurst, W.J. Preservation of cocoa antioxidant activity, total polyphenols, flavan-3-ols, and procyanidin content in foods prepared with cocoa powder. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, C456–C461.
85. Emmanuel Ohene Afoakwa. *Chocolate Science and Technology*; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, 2010.

86. Arranz, S.; Valderas-Martinez, P.; Chiva-Blanch, G.; Casas, R.; Urpi-Sarda, M.; Lamuela-Raventos, R.M.; Estruch, R. Cardioprotective effects of cocoa: Clinical evidence from randomized clinical intervention trials in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 936–947.
87. Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572–584.
88. Corcoran, M.P.; McKay, D.L.; Blumberg, J.B. Flavonoid basics: Chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *J. Nutr. Gerontol. Geriatr.* **2012**, *31*, 176–189.
89. Schramm, D.D.; Wang, J.F.; Holt, R.R.; Ensunsa, J.L.; Gonsalves, J.L.; Lazarus, S.A.; Schmitz, H.H.; German, J.B.; Keen, C.L. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 36–40.
90. Rein, D.; Lotito, S.; Holt, R.R.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Fraga, C.G. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2109S–2114S.
91. Holt, R.R.; Schramm, D.D.; Keen, C.L.; Lazarus, S.A.; Schmitz, H.H. Chocolate consumption and platelet function. *JAMA* **2002**, *287*, 2212–2213.
92. Pearson, D.A.; Paglieroni, T.G.; Rein, D.; Wun, T.; Schramm, D.D.; Wang, J.F.; Holt, R.R.; Gosselin, R.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. The effects of flavanol-rich cocoa and aspirin on *ex vivo* platelet function. *Thromb Res.* **2002**, *106*, 191–197.
93. Steinberg, F.M.; Holt, R.R.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 645–652.
94. Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Sullards, M.C.; Zhu, Q.Y.; Schramm, D.D.; Hammerstone, J.F.; Fraga, C.G.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 798–804.
95. Richelle, M.; Tavazzi, I.; Enslin, M.; Offord, E.A. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, *53*, 22–26.
96. Mullen, W.; Borges, G.; Donovan, J.L.; Edwards, C.A.; Serafini, M.; Lean, M.E.; Crozier, A. Milk decreases urinary excretion but not plasma pharmacokinetics of cocoa flavan-3-ol metabolites in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1784–1791.
97. Actis-Goretta, L.; Leveques, A.; Giuffrida, F.; Romanov-Michailidis, F.; Viton, F.; Barron, D.; Duenas-Paton, M.; Gonzalez-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Williamson, G.; *et al.* Elucidation of (–)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 787–795.
98. Baba, S.; Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Takizawa, T.; Nakamura, T.; Terao, J. Bioavailability of (–)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic. Res.* **2000**, *33*, 635–641.
99. Actis-Goretta, L.; Leveques, A.; Rein, M.; Teml, A.; Schafer, C.; Hofmann, U.; Li, H.; Schwab, M.; Eichelbaum, M.; Williamson, G. Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (–)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. *Am. J. Clin. Nutr.* **2013**, *98*, 924–933.

100. Wang, J.F.; Schramm, D.D.; Holt, R.R.; Ensunsa, J.L.; Fraga, C.G.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2115S–2119S.
101. Deprez, S.; Mila, I.; Huneau, J.F.; Tome, D.; Scalbert, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer, and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2001**, *3*, 957–967.
102. Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Srai, S.K.; Debnam, E.S.; Rice-Evans, C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 588–593.
103. Ottaviani, J.I.; Momma, T.Y.; Heiss, C.; Kwik-Urbe, C.; Schroeter, H.; Keen, C.L. The stereochemical configuration of flavanols influences the level and metabolism of flavanols in humans and their biological activity *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 237–244.
104. Ritter, C.; Zimmermann, B.F.; Galensa, R. Chiral separation of (+)/(–)-catechin from sulfated and glucuronidated metabolites in human plasma after cocoa consumption. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 723–730.
105. Rios, L.Y.; Bennett, R.N.; Lazarus, S.A.; Remesy, C.; Scalbert, A.; Williamson, G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 1106–1110.
106. Monagas, M.; Urpi-Sarda, M.; Sanchez-Patan, F.; Llorach, R.; Garrido, I.; Gomez-Cordoves, C.; Andres-Lacueva, C.; Bartolome, B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* **2010**, *1*, 233–253.
107. Donovan, J.L.; Manach, C.; Faulks, R.M.; Kroon, P.A. Absorption and Metabolism of Plant Secondary Metabolites. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*; Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., Eds.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2006; pp. 303–351.
108. Ottaviani, J.I.; Momma, T.Y.; Kuhle, G.K.; Keen, C.L.; Schroeter, H. Structurally related (–)-epicatechin metabolites in humans: Assessment using *de novo* chemically synthesized authentic standards. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 1403–1412.
109. Fogliano, V.; Corollaro, M.L.; Vitaglione, P.; Napolitano, A.; Ferracane, R.; Travaglia, F.; Arlorio, M.; Costabile, A.; Klinder, A.; Gibson, G. *In vitro* bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55*, S44–S55.
110. Stoupi, S.; Williamson, G.; Drynan, J.W.; Barron, D.; Clifford, M.N. A comparison of the *in vitro* biotransformation of (–)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 747–759.
111. Rios, L.Y.; Gonthier, M.P.; Remesy, C.; Mila, I.; Lapierre, C.; Lazarus, S.A.; Williamson, G.; Scalbert, A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 912–918.
112. Meng, X.; Sang, S.; Zhu, N.; Lu, H.; Sheng, S.; Lee, M.J.; Ho, C.T.; Yang, C.S. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 1042–1050.

113. Urpi-Sarda, M.; Llorach, R.; Khan, N.; Monagas, M.; Rotches-Ribalta, M.; Lamuela-Raventos, R.; Estruch, R.; Tinahones, F.J.; Andres-Lacueva, C. Effect of milk on the urinary excretion of microbial phenolic acids after cocoa powder consumption in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4706–4711.
114. Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Llorach, R.; Lamuela-Raventos, R.M.; Jauregui, O.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Andres-Lacueva, C. Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7258–7267.
115. Appeldoorn, M.M.; Vincken, J.P.; Aura, A.M.; Hollman, P.C.; Gruppen, H. Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1084–1092.
116. Urpi-Sarda, M.; Monagas, M.; Khan, N.; Lamuela-Raventos, R.M.; Santos-Buelga, C.; Sacanella, E.; Castell, M.; Permanyer, J.; Andres-Lacueva, C. Epicatechin, procyanidins, and phenolic microbial metabolites after cocoa intake in humans and rats. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1545–1556.
117. Depeint, F.; Gee, J.M.; Williamson, G.; Johnson, I.T. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.* **2002**, *61*, 97–103.
118. Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S–2085S.
119. Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Tulipani, S.; Garcia-Aloy, M.; Monagas, M.; Andres-Lacueva, C. Metabolomic fingerprint in patients at high risk of cardiovascular disease by cocoa intervention. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 962–973.
120. Llorach-Asuncion, R.; Jauregui, O.; Urpi-Sarda, M.; Andres-Lacueva, C. Methodological aspects for metabolome visualization and characterization: A metabolomic evaluation of the 24 h evolution of human urine after cocoa powder consumption. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 373–381.
121. Llorach, R.; Urpi-Sarda, M.; Jauregui, O.; Monagas, M.; Andres-Lacueva, C. An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5060–5068.
122. Ito, H.; Gonthier, M.P.; Manach, C.; Morand, C.; Mennen, L.; Remesy, C.; Scalbert, A. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 500–509.
123. Monagas, M.; Khan, N.; Andres-Lacueva, C.; Casas, R.; Urpi-Sarda, M.; Llorach, R.; Lamuela-Raventos, R.M.; Estruch, R. Effect of cocoa powder on the modulation of inflammatory biomarkers in patients at high risk of cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 1144–1150.
124. Khan, N.; Monagas, M.; Andres-Lacueva, C.; Casas, R.; Urpi-Sarda, M.; Lamuela-Raventos, R.M.; Estruch, R. Regular consumption of cocoa powder with milk increases HDL cholesterol and reduces oxidized LDL levels in subjects at high-risk of cardiovascular disease. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2012**, *22*, 1046–1053.

125. Selma, M.V.; Espin, J.C.; Tomas-Barberan, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6485–6501.
126. Williamson, G.; Clifford, M.N. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *Br. J. Nutr.* **2010**, *104*, S48–S66.
127. Van Duynhoven, J.; Vaughan, E.E.; Jacobs, D.M.; Kemperman, R.A.; van Velzen, E.J.; Gross, G.; Roger, L.C.; Possemiers, S.; Smilde, A.K.; Dore, J.; *et al.* Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4531–4538.
128. Dall'Asta, M.; Calani, L.; Tedeschi, M.; Jechiu, L.; Brighenti, F.; Del Rio, D. Identification of microbial metabolites derived from *in vitro* fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition* **2012**, *28*, 197–203.
129. Prakash, S.; Rodes, L.; Coussa-Charley, M.; Tomaro-Duchesneau, C. Gut microbiota: Next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biol. Targets Ther.* **2011**, *5*, 71–86.
130. Clemente, J.C.; Ursell, L.K.; Parfrey, L.W.; Knight, R. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **2012**, *148*, 1258–1270.
131. Flint, H.J.; Scott, K.P.; Louis, P.; Duncan, S.H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *9*, 577–589.
132. Lozupone, C.A.; Stombaugh, J.I.; Gordon, J.I.; Jansson, J.K.; Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **2012**, *489*, 220–230.
133. Cardona, F.; Andres-Lacueva, C.; Tulipani, S.; Tinahones, F.J.; Queipo-Ortuno, M.I. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* **2013**, *24*, 1415–1422.
134. Bolca, S.; van de Wiele, T.; Possemiers, S. Gut metabolotypes govern health effects of dietary polyphenols. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 220–225.
135. Martin, F.P.; Montoliu, I.; Nagy, K.; Moco, S.; Collino, S.; Guy, P.; Redeuil, K.; Scherer, M.; Rezzi, S.; Kochhar, S. Specific dietary preferences are linked to differing gut microbial metabolic activity in response to dark chocolate intake. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 6252–6263.
136. Serafini, M.; Bugianesi, R.; Maiani, G.; Valtuena, S.; de Santis, S.; Crozier, A. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* **2003**, *424*, 1013.
137. Roura, E.; Andres-Lacueva, C.; Estruch, R.; Lourdes Mata Bilbao, M.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventos, R.M. The effects of milk as a food matrix for polyphenols on the excretion profile of cocoa (–)-epicatechin metabolites in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* **2008**, *100*, 846–851.
138. Roura, E.; Andres-Lacueva, C.; Estruch, R.; Mata-Bilbao, M.L.; Izquierdo-Pulido, M.; Waterhouse, A.L.; Lamuela-Raventos, R.M. Milk does not affect the bioavailability of cocoa powder flavonoid in healthy human. *Ann. Nutr. Metab.* **2007**, *51*, 493–498.
139. Schroeter, H.; Holt, R.R.; Orozco, T.J.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Nutrition: Milk and absorption of dietary flavanols. *Nature* **2003**, *426*, 787–788.
140. Keogh, J.B.; McInerney, J.; Clifton, P.M. The effect of milk protein on the bioavailability of cocoa polyphenols. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, S230–S233.

141. Schramm, D.D.; Karim, M.; Schrader, H.R.; Holt, R.R.; Kirkpatrick, N.J.; Polagruto, J.A.; Ensunsa, J.L.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sci.* **2003**, *73*, 857–869.
142. Rodriguez-Mateos, A.; Oruna-Concha, M.J.; Kwik-Urbe, C.; Vidal, A.; Spencer, J.P. Influence of sugar type on the bioavailability of cocoa flavanols. *Br. J. Nutr.* **2012**, *108*, 2243–2250.
143. Ferruzzi, M.G.; Bordenave, N.; Hamaker, B.R. Does flavor impact function? Potential consequences of polyphenol-protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods. *Physiol. Behav.* **2012**, *107*, 591–597.
144. Neilson, A.P.; Ferruzzi, M.G. Influence of formulation and processing on absorption and metabolism of flavan-3-ols from tea and cocoa. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2011**, *2*, 125–151.
145. Neilson, A.P.; George, J.C.; Janle, E.M.; Mattes, R.D.; Rudolph, R.; Matusheski, N.V.; Ferruzzi, M.G. Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility *in vitro* and bioavailability in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 9418–9426.
146. Wan, Y.; Vinson, J.A.; Etherton, T.D.; Proch, J.; Lazarus, S.A.; Kris-Etherton, P.M. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 596–602.
147. Rimbach, G.; Egert, S.; de Pascual-Teresa, S. Chocolate: (Un)healthy source of polyphenols? *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 1–3.
148. Murphy, K.J.; Chronopoulos, A.K.; Singh, I.; Francis, M.A.; Moriarty, H.; Pike, M.J.; Turner, A.H.; Mann, N.J.; Sinclair, A.J. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1466–1473.
149. Martin, F.P.; Rezzi, S.; Pere-Trepat, E.; Kamlage, B.; Collino, S.; Leibold, E.; Kastler, J.; Rein, D.; Fay, L.B.; Kochhar, S. Metabolic effects of dark chocolate consumption on energy, gut microbiota, and stress-related metabolism in free-living subjects. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5568–5579.
150. Rice-Evans, C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 797–807.
151. Kris-Etherton, P.M.; Keen, C.L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr. Opin. Lipidol.* **2002**, *13*, 41–49.
152. McCullough, M.L.; Chevaux, K.; Jackson, L.; Preston, M.; Martinez, G.; Schmitz, H.H.; Coletti, C.; Campos, H.; Hollenberg, N.K. Hypertension, the Kuna, and the epidemiology of flavanols. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, *47*, S103–S109.
153. Mink, P.J.; Scrafford, C.G.; Barraj, L.M.; Hamack, L.; Hong, C.P.; Nettleton, J.A.; Jacobs, D.R., Jr. Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality: A prospective study in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 895–909.
154. Baba, S.; Osakabe, N.; Kato, Y.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Kido, T.; Fukuda, K.; Muto, Y.; Kondo, K. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 709–717.
155. Osakabe, N.; Baba, S.; Yasuda, A.; Iwamoto, T.; Kamiyama, M.; Takizawa, T.; Itakura, H.; Kondo, K. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic. Res.* **2001**, *34*, 93–99.

156. Sarria, B.; Martinez-Lopez, S.; Sierra-Cinos, J.L.; Garcia-Diz, L.; Mateos, R.; Bravo, L. Regular consumption of a cocoa product improves the cardiometabolic profile in healthy and moderately hypercholesterolaemic adults. *Br. J. Nutr.* **2014**, *111*, 122–134.
157. Fisher, N.D.; Hollenberg, N.K. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. *J. Hypertens.* **2006**, *24*, 1575–1580.
158. Heiss, C.; Finis, D.; Kleinbongard, P.; Hoffmann, A.; Rassaf, T.; Kelm, M.; Sies, H. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2007**, *49*, 74–80.
159. Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Dejam, A.; Perre, S.; Schroeter, H.; Sies, H.; Kelm, M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2005**, *46*, 1276–1283.
160. Innes, A.J.; Kennedy, G.; McLaren, M.; Bancroft, A.J.; Belch, J.J. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets* **2003**, *14*, 325–327.
161. Balzer, J.; Rassaf, T.; Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Lauer, T.; Merx, M.; Heussen, N.; Gross, H.B.; Keen, C.L.; Schroeter, H.; *et al.* Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *51*, 2141–2149.
162. Faridi, Z.; Njike, V.Y.; Dutta, S.; Ali, A.; Katz, D.L. Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: A randomized controlled crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 58–63.
163. Lichtenstein, A.H.; Appel, L.J.; Brands, M.; Carnethon, M.; Daniels, S.; Franch, H.A.; Franklin, B.; Kris-Etherton, P.; Harris, W.S.; Howard, B.; *et al.* Summary of American heart association diet and lifestyle recommendations revision 2006. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2006**, *26*, 2186–2191.
164. Baba, S.; Natsume, M.; Yasuda, A.; Nakamura, Y.; Tamura, T.; Osakabe, N.; Kanegae, M.; Kondo, K. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 1436–1441.
165. Mursu, J.; Voutilainen, S.; Nurmi, T.; Rissanen, T.H.; Virtanen, J.K.; Kaikkonen, J.; Nyyssonen, K.; Salonen, J.T. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 1351–1359.
166. Di Renzo, L.; Rizzo, M.; Sarlo, F.; Colica, C.; Iacopino, L.; Domino, E.; Sergi, D.; de Lorenzo, A. Effects of dark chocolate in a population of Normal Weight Obese women: A pilot study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2013**, *17*, 2257–2266.
167. Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20963–20966.
168. Witztum, J.L.; Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Investig.* **1991**, *88*, 1785–1792.
169. Fraley, A.E.; Tsimikas, S. Clinical applications of circulating oxidized low-density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **2006**, *17*, 502–509.

170. Holvoet, P.; Lee, D.H.; Steffes, M.; Gross, M.; Jacobs, D.R., Jr. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA* **2008**, *299*, 2287–2293.
171. Ishigaki, Y.; Oka, Y.; Katagiri, H. Circulating oxidized LDL: A biomarker and a pathogenic factor. *Curr. Opin. Lipidol.* **2009**, *20*, 363–369.
172. Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M.; Takizawa, T.; Terao, J.; Kondo, K. Catechins and their oligomers linked by C4→C8 bonds are major cacao polyphenols and protect low-density lipoprotein from oxidation *in vitro*. *Exp. Biol. Med.* **2002**, *227*, 51–56.
173. Richelle, M.; Tavazzi, I.; Offord, E. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3438–3442.
174. Kurosawa, T.; Itoh, F.; Nozaki, A.; Nakano, Y.; Katsuda, S.; Osakabe, N.; Tsubone, H.; Kondo, K.; Itakura, H. Suppressive effects of cacao liquor polyphenols (CLP) on LDL oxidation and the development of atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis* **2005**, *179*, 237–246.
175. Kurosawa, T.; Itoh, F.; Nozaki, A.; Nakano, Y.; Katsuda, S.; Osakabe, N.; Tsubone, H.; Kondo, K.; Itakura, H. Suppressive effect of cocoa powder on atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi-hypercholesterolemic rabbits. *J. Atheroscler. Thromb.* **2005**, *12*, 20–28.
176. Mathur, S.; Devaraj, S.; Grundy, S.M.; Jialal, I. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3663–3667.
177. Vita, J.A. Endothelial function and clinical outcome. *Heart* **2005**, *91*, 1278–1279.
178. Rein, D.; Paglieroni, T.G.; Wun, T.; Pearson, D.A.; Schmitz, H.H.; Gosselin, R.; Keen, C.L. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 30–35.
179. Monahan, K.D. Effect of cocoa/chocolate ingestion on brachial artery flow-mediated dilation and its relevance to cardiovascular health and disease in humans. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *527*, 90–94.
180. Sies, H.; Schewe, T.; Heiss, C.; Kelm, M. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 304S–312S.
181. Fisher, N.D.; Hughes, M.; Gerhard-Herman, M.; Hollenberg, N.K. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J. Hypertens.* **2003**, *21*, 2281–2286.
182. Heiss, C.; Dejam, A.; Kleinbongard, P.; Schewe, T.; Sies, H.; Kelm, M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *JAMA* **2003**, *290*, 1030–1031.
183. Grassi, D.; Necozione, S.; Lippi, C.; Croce, G.; Valeri, L.; Pasqualetti, P.; Desideri, G.; Blumberg, J.B.; Ferri, C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* **2005**, *46*, 398–405.
184. Fraga, C.G. Cocoa, diabetes, and hypertension: Should we eat more chocolate? *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 541–542.
185. Flammer, A.J.; Hermann, F.; Sudano, I.; Spieker, L.; Hermann, M.; Cooper, K.A.; Serafini, M.; Luscher, T.F.; Ruschitzka, F.; Noll, G.; *et al.* Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* **2007**, *116*, 2376–2382.

186. Holt, R.R.; Actis-Goretta, L.; Momma, T.Y.; Keen, C.L. Dietary flavanols and platelet reactivity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, *47*, S187–S196.
187. Ross, R. Atherosclerosis—An inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **1999**, *340*, 115–126.
188. Pearson, T.A.; Mensah, G.A.; Alexander, R.W.; Anderson, J.L.; Cannon, R.O., 3rd; Criqui, M.; Fadl, Y.Y.; Fortmann, S.P.; Hong, Y.; Myers, G.L.; *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease: Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* **2003**, *107*, 499–511.
189. Tracy, R.P. Inflammation in cardiovascular disease: Cart, horse, or both? *Circulation* **1998**, *97*, 2000–2002.
190. Libby, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *83*, 456S–460S.
191. Di Giuseppe, R.; di Castelnuovo, A.; Centritto, F.; Zito, F.; de Curtis, A.; Costanzo, S.; Vohnout, B.; Sieri, S.; Krogh, V.; Donati, M.B.; *et al.* Regular consumption of dark chocolate is associated with low serum concentrations of C-reactive protein in a healthy Italian population. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1939–1945.
192. Abraham, J.; Campbell, C.Y.; Cheema, A.; Gluckman, T.J.; Blumenthal, R.S.; Danyi, P. C-reactive protein in cardiovascular risk assessment: A review of the evidence. *J. Cardiometab. Syndr.* **2007**, *2*, 119–123.
193. Kurlandsky, S.B.; Stote, K.S. Cardioprotective effects of chocolate and almond consumption in healthy women. *Nutr. Res.* **2006**, *26*, 509–516.
194. Tzounis, X.; Rodriguez-Mateos, A.; Vulevic, J.; Gibson, G.R.; Kwik-Urbe, C.; Spencer, J.P. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *93*, 62–72.
195. Stote, K.S.; Clevidence, B.A.; Novotny, J.A.; Henderson, T.; Radecki, S.V.; Baer, D.J. Effect of cocoa and green tea on biomarkers of glucose regulation, oxidative stress, inflammation and hemostasis in obese adults at risk for insulin resistance. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2012**, *66*, 1153–1159.
196. Hamed, M.S.; Gambert, S.; Bliden, K.P.; Bailon, O.; Singla, A.; Antonino, M.J.; Hamed, F.; Tantry, U.S.; Gurbel, P.A. Dark chocolate effect on platelet activity, C-reactive protein and lipid profile: A pilot study. *South. Med. J.* **2008**, *101*, 1203–1208.
197. Schisterman, E.F.; Mumford, S.L.; Sjaarda, L.A. Failure to consider the menstrual cycle phase may cause misinterpretation of clinical and research findings of cardiometabolic biomarkers in premenopausal women. *Epidemiol. Rev.* **2014**, *36*, 71–82.
198. Farouque, H.M.; Leung, M.; Hope, S.A.; Baldi, M.; Schechter, C.; Cameron, J.D.; Meredith, I.T. Acute and chronic effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in subjects with coronary artery disease: A randomized double-blind placebo-controlled study. *Clin. Sci.* **2006**, *111*, 71–80.
199. Grassi, D.; Desideri, G.; Necozione, S.; Lippi, C.; Casale, R.; Properzi, G.; Blumberg, J.B.; Ferri, C. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 1671–1676.

200. Wang-Polagruto, J.F.; Villablanca, A.C.; Polagruto, J.A.; Lee, L.; Holt, R.R.; Schrader, H.R.; Ensunsa, J.L.; Steinberg, F.M.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2006**, *47*, S177–S186.
201. Muniyappa, R.; Hall, G.; Kolodziej, T.L.; Karne, R.J.; Crandon, S.K.; Quon, M.J. Cocoa consumption for 2 wk enhances insulin-mediated vasodilatation without improving blood pressure or insulin resistance in essential hypertension. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *88*, 1685–1696.
202. Nogueira Lde, P.; Knibel, M.P.; Torres, M.R.; Nogueira Neto, J.F.; Sanjuliani, A.F. Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight. *Int. J. Hypertens.* **2012**, *2012*, 147321.
203. Vazquez-Agell, M.; Urpi-Sarda, M.; Sacanella, E.; Camino-Lopez, S.; Chiva-Blanch, G.; Llorente-Cortes, V.; Tobias, E.; Roura, E.; Andres-Lacueva, C.; Lamuela-Raventos, R.M.; *et al.* Cocoa consumption reduces NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in humans. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2013**, *23*, 257–263.
204. Ridker, P.M.; Hennekens, C.H.; Roitman-Johnson, B.; Stampfer, M.J.; Allen, J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* **1998**, *351*, 88–92.
205. Blann, A.D.; Seigneur, M.; Steiner, M.; Miller, J.P.; McCollum, C.N. Circulating ICAM-1 and VCAM-1 in peripheral artery disease and hypercholesterolaemia: Relationship to the location of atherosclerotic disease, smoking, and in the prediction of adverse events. *Thromb. Haemost.* **1998**, *79*, 1080–1085.
206. Von der Thüsen, J.H.; Kuiper, J.; van Berkel, T.J.C.; Biessen, E.A.L. Interleukins in atherosclerosis: Molecular pathways and therapeutic potential. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 133–166.
207. Thurberg, B.L.; Collins, T. The nuclear factor- κ B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **1998**, *9*, 387–396.
208. Funk, C.D. Leukotriene inflammatory mediators meet their match. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 66ps3.
209. Riccioni, G.; Back, M. Leukotrienes as modifiers of preclinical atherosclerosis? *Sci. World J.* **2012**, *2012*, 490968.
210. Gu, Y.; Yu, S.; Lambert, J.D. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *Eur. J. Nutr.* **2014**, *53*, 149–158.
211. Vinson, J.A.; Proch, J.; Bose, P.; Muchler, S.; Taffera, P.; Shuta, D.; Samman, N.; Agbor, G.A. Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vivo* antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8071–8076.
212. Desch, S.; Schmidt, J.; Kobler, D.; Sonnabend, M.; Eitel, I.; Sareban, M.; Rahimi, K.; Schuler, G.; Thiele, H. Effect of cocoa products on blood pressure: Systematic review and meta-analysis. *Am. J. Hypertens.* **2010**, *23*, 97–103.
213. Yakala, G.K.; Wielinga, P.Y.; Suarez, M.; Bunschoten, A.; van Golde, J.M.; Arola, L.; Keijer, J.; Kleemann, R.; Kooistra, T.; Heeringa, P. Effects of chocolate supplementation on metabolic and cardiovascular parameters in ApoE3L mice fed a high-cholesterol atherogenic diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 2039–2048.

214. Ramos-Romero, S.; Pérez-Cano, F.J.; Pérez-Berezo, T.; Castellote, C.; Franch, A.; Castell, M. A seven-day high cocoa diet decreases oxidant and inflammatory properties of peritoneal macrophages in rats. *Proc. Nutr. Soc.* **2010**, *69*, E253.
215. Schewe, T.; Sadik, C.; Klotz, L.O.; Yoshimoto, T.; Kuhn, H.; Sies, H. Polyphenols of cocoa: Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 1687–1696.
216. Schewe, T.; Kuhn, H.; Sies, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1825–1829.
217. Mao, T.; van de Water, J.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Gershwin, M.E. Cocoa procyanidins and human cytokine transcription and secretion. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2093S–2099S.
218. Mao, T.K.; Powell, J.; van de Water, J.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Hammerstone, J.F.; Gershwin, M.E. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 beta in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sci.* **2000**, *66*, 1377–1386.
219. Mao, T.K.; Powell, J.; van de water, J.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Gershwin, M.E. Effect of cocoa procyanidins on the secretion of interleukin-4 in peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Food* **2000**, *3*, 107–114.
220. Mao, T.K.; van de Water, J.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Gershwin, M.E. Modulation of TNF-alpha secretion in peripheral blood mononuclear cells by cocoa flavanols and procyanidins. *Dev. Immunol.* **2002**, *9*, 135–141.
221. Mao, T.K.; van de Water, J.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Gershwin, M.E. Effect of cocoa flavanols and their related oligomers on the secretion of interleukin-5 in peripheral blood mononuclear cells. *J. Med. Food* **2002**, *5*, 17–22.
222. Ramiro, E.; Franch, A.; Castellote, C.; Perez-Cano, F.; Permanyer, J.; Izquierdo-Pulido, M.; Castell, M. Flavonoids from *Theobroma cacao* down-regulate inflammatory mediators. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8506–8511.
223. Ramiro, E.; Franch, A.; Castellote, C.; Andres-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Castell, M. Effect of *Theobroma cacao* flavonoids on immune activation of a lymphoid cell line. *Br. J. Nutr.* **2005**, *93*, 859–866.
224. Kenny, T.P.; Keen, C.L.; Schmitz, H.H.; Gershwin, M.E. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Biol. Med.* **2007**, *232*, 293–300.
225. Monagas, M.; Khan, N.; Andres-Lacueva, C.; Urpi-Sarda, M.; Vazquez-Agell, M.; Lamuela-Raventos, R.M.; Estruch, R. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br. J. Nutr.* **2009**, *102*, 201–206.
226. Mackenzie, G.G.; Carrasquedo, F.; Delfino, J.M.; Keen, C.L.; Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF- κ B activation at multiple steps in Jurkat T cells. *FASEB J.* **2004**, *18*, 167–169.
227. Kroon, P.A.; Clifford, M.N.; Crozier, A.; Day, A.J.; Donovan, J.L.; Manach, C.; Williamson, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80*, 15–21.
228. Saliou, C.; Valacchi, G.; Rimbach, G. Assessing bioflavonoids as regulators of NF- κ B activity and inflammatory gene expression in mammalian cells. *Methods Enzymol.* **2001**, *335*, 380–387.

229. Park, Y.C.; Rimbach, G.; Saliou, C.; Valacchi, G.; Packer, L. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-alpha secretion, and NF-κB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Lett.* **2000**, *465*, 93–97.
230. Fraga, C.G.; Oteiza, P.I. Dietary flavonoids: Role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51*, 813–823.
231. Patel, K.R.; Andreadi, C.; Britton, R.G.; Homer-Glister, E.; Karmokar, A.; Sale, S.; Brown, V.A.; Brenner, D.E.; Singh, R.; Steward, W.P.; *et al.* Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Science Transl. Med.* **2013**, *5*, 205ra133.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).