

Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vílchez
Martín”



**Estudio ómico y metaómico de la neurotoxicidad y
efectos en la reproducción de contaminantes a través de
la microbiota intestinal**

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:**

Cecilio Parra Martínez

Fecha de lectura: 18 de diciembre de 2024

Bajo la dirección de las doctoras:

Tamara García Barrera

Belén Callejón Leblic

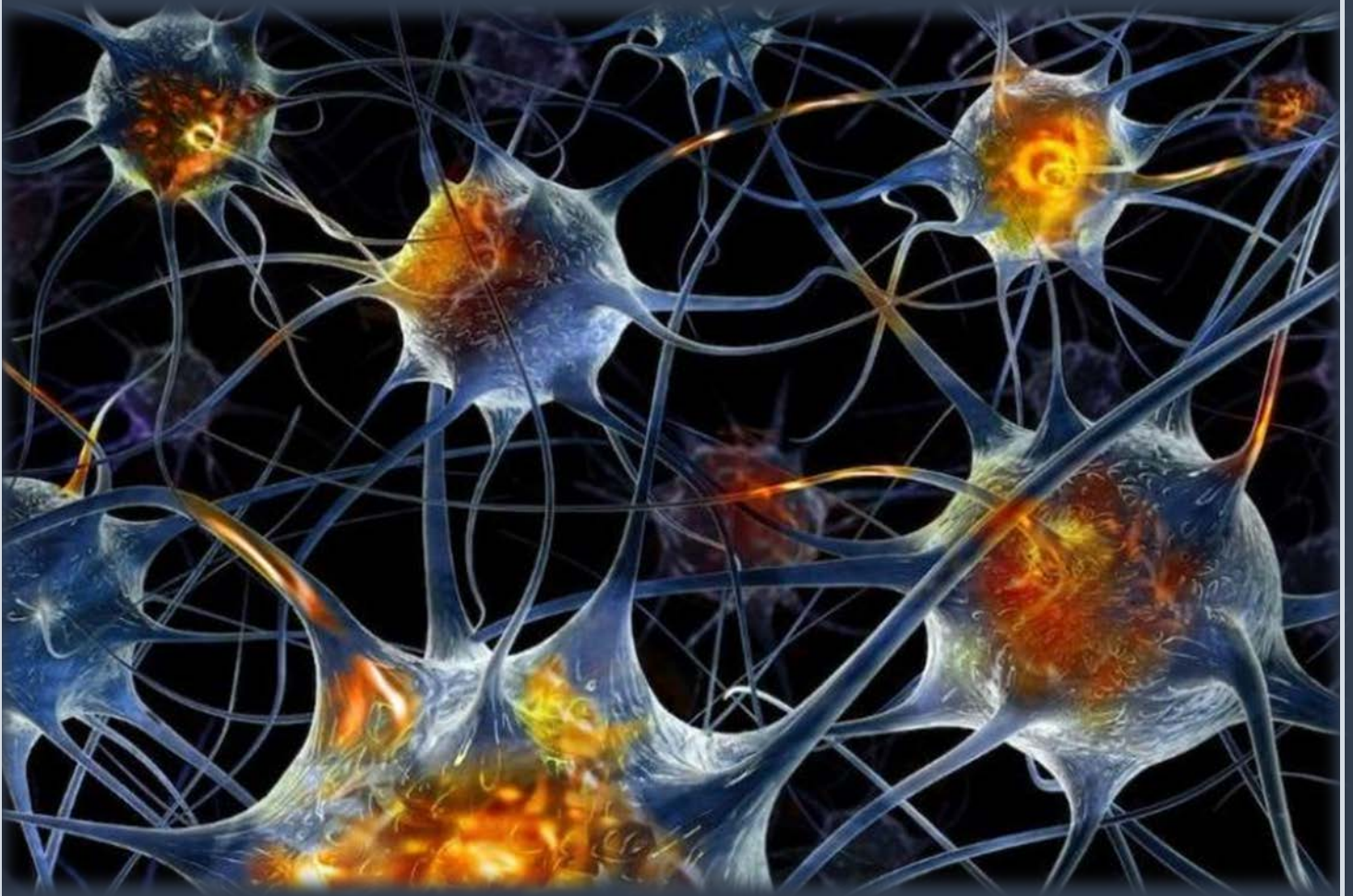
Huelva, 2024



UNIVERSIDAD DE HUELVA

ESTUDIO ÓMICO Y METAÓMICO DE LA NEUROTOXICIDAD Y
EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN DE CONTAMINANTES A TRAVÉS DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL

Cecilio Parra Martínez



Huelva, 2024





UNIVERSIDAD DE HUELVA



Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

**ESTUDIO ÓMICO Y METAÓMICO DE LA NEUROTOXICIDAD Y
EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN DE CONTAMINANTES A TRAVÉS DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL**

**Multi-omic methodologies to delve into the neurotoxicity and
reproductive health damages induced by environmental pollutants
through the gut microbiota**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por:

Cecilio Parra Martínez

Bajo la dirección de las doctoras:

Tamara Carmen García Barrera

María Belén Callejón Leblic

Huelva, 2024

Universidad de Huelva

Departamento de Química "Profesor José Carlos Vílchez Martín"

Facultad de Ciencias Experimentales



**ESTUDIO ÓMICO Y METAÓMICO DE LA NEUROTOXICIDAD Y
EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN DE CONTAMINANTES A TRAVÉS DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL**

**Multi-omic methodologies to delve into the neurotoxicity and
reproductive health damages induced by environmental pollutants
through the gut microbiota**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Huelva presentada por

Cecilio Parra Martínez

Bajo la dirección de las Doctoras:

Tamara Carmen García Barrera

María Belén Callejón Leblic

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental

Escuela de Doctorado de la Universidad de Huelva

Línea de Investigación ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL, BIOANÁLISIS Y BIOTECNOLOGÍA

Huelva, 2024

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no hubiera sido posible sin el apoyo determinadas personas e instituciones a las que quiero mostrar mi agradecimiento.

Mi primer y más sincero agradecimiento a nivel profesional e investigador es para mis directoras de tesis, comenzando por la Dra. Tamara a quien le tengo gran admiración por todo su trabajo y quehacer como líder de uno de los más importantes y productivos grupos de investigación, tanto en la Universidad de Huelva, como a nivel internacional pero, sobre todo, por creer en mí desde el primer momento en el que me entrevistó para optar a mi contrato predoctoral del Ministerio que ha culminado en esta tesis que hoy defiendo. Son muchísimas las cosas que me gustaría expresar aquí para mostrar mi inmensa gratitud por lo que me has enseñado, pero de todas ellas, destaco tu gran calidad humana y dedicación investigadora porque suponen mi claro ejemplo a seguir. Similarmente, a mi también directora la Dra. M^a Belén, agradezco todos los momentos compartidos con cada una de las investigaciones, tus enriquecedoras observaciones sobre los datos, redacción, tu cooperación para mis exposiciones en congresos y un largo etcétera fruto de compaginar tu dirección de tesis con el compañerismo mostrado, facilitando mi labor diaria que, en investigación, no siempre es un camino de luces.

Agradezco la oportunidad de formar parte del grupo de investigación Análisis Medioambiental y Bioanálisis, donde he podido crecer como científico y persona y sobretodo aprender la relevancia de la química analítica y sus intrínquilis internos.

Me es un honor poder agradecer al Dr. Mihály Dernovics sus sabias enseñanzas y su constante transmisión de conocimiento durante la realización de mi estancia bajo su tutela en Hungría y enriqueció mi insaciable curiosidad.

Agradecer también a la Prof. Joanna Szpunar su invitación y guía para la realización de mi estancia de investigación en su grupo de investigación en Pau que, junto a la Dra. Katarzyna Bierla y el Dr. Ange Angaiïts, pude profundizar en otros buenos métodos de trabajo.

Quiero también dejar un agradecimiento al Prof. Daniel Globish que no solo me invitó a su grupo de investigación en la universidad de Uppsala junto al Dr. Alejandro Torregrosa, donde pude desarrollar una nueva motivación por la química con nuevos matices de profundidad, sino que también me abrió las puertas con un gran acogimiento humano en su grupo donde me pude sentir como en casa.

También quiero agradecer al Prof. Dr. Ávalos Cordero con el que inicié mi camino a la investigación al tutorizarme el TFG y también TFM, por el que siempre sentiré un magnifico recuerdo de liderazgo, enseñanza y trato humano valorando en muchas ocasiones mi gran capacidad de trabajo.

Me es un enorme placer tener la oportunidad de poder agradecer a mis compañeros de laboratorio porque han aportado color al día a día, con quienes he aprendido a encontrar y compartir problemas, así como el placer de hallar soluciones juntos. A Sara quien fue una gran maestra y alguien de quien admirar su labor trabajadora. A Rafa quien continua con el testigo ejemplarmente, A Gema que siempre muestra su fuerza y comparte aprendizaje de vida, así como a Mayca, Jesús, Cristina y Ana el tiempo en la facultad habría sido vacuo sin vosotros.

Al personal técnico, de administración y gestión de servicios de la Facultad de Ciencias Experimentales, compañeros y personal del decanato que mantiene con su trabajo y esfuerzo las condiciones para que esta tesis y muchas otras puedan completarse satisfactoriamente.

Desde lo más profundo de mi hipotálamo quiero agradecer a mis padres porque todo paso que he dado ha sido gracias a ellos, no solo me han cuidado y educado, han sido un apoyo incondicional y fundamental en todos los aspectos de mi vida, han sufrido mis peores inclemencias emocionales, mi desorden y manías y, también, me han valorado con cada uno de mis pequeños logros mostrándome orgullo por el esfuerzo en conseguir el resultado, jamás en mi vida podré agradecerles o mostrarles cuán importante me ha sido y me continúa siendo su apoyo y cariño. A la Dra. Concha, mi madre, por su enorme y constante apoyo en toda mi carrera científica y personal, la mejor confidente y consejera y, no hay mejor mecenas que mi padre, Santiago, capaz de cargarme y

abrazarme incansablemente con su enorme espalda, sé que compartirás la felicidad por cumplir mis metas, pues son fruto de tu esfuerzo al despertar cada mañana.

A mis hermanos Santi y Ángel con quienes todo conflicto ha sido un placer y a quienes espero seguir molestando y apoyando por muchos kilómetros que nos acaben separando. Santi es un luchador al que he admirado toda mi vida y cuya visión del mundo sigue enseñándome y maravillándome en cada intercambio, quien me enseñó primeramente a vencer los celos y crecer como individuo. Y Ángel, el alumno más duro que he podido tener y a la vez un gran maestro por tener mentalidad crítica y bien informada, todo un parangón de la constancia y el esfuerzo. Y ¡cómo no! A mis dos increíbles sobrinos, Santi Jr. e Isaac, que con apenas 4 y 2 añitos ya son capaces de enseñarme la vida con esa inocente perspectiva cuando en mis estancias me decían por videoconferencias que tenían muuuuchas ganas verme, pero... ¡de verdad, eh! Sencillamente, os adoro.

A mis padrinos, quienes siempre han estado ahí respetando mis decisiones y alentándome a seguir mi propio camino de explorador.

Por último agradecer los apoyos emocionales que vinieron desde fuera de la familia, los hermanos que encontré en el camino, Pablo, Víctor, Eulogio, Guille, Pule, etc. y a Alicia, sin ellos la vida habría estado coja todos estos años.

Fuentes de financiación

Este trabajo de Tesis Doctoral fue apoyado por los proyectos de Generación del Conocimiento: PG2018-096608-B-C21 y PID2021-123073NB-C21 del Ministerio de Ciencia e Innovación de España (MICIN), MCI/AEI/ FEDER “Una manera de hacer Europa”, UHU-1256905 y UHU-202009 del Programa Operativo Andaluz FEDER 2014-2020 (Consejería de Economía, Conocimiento, Empresa y Universidades, Junta de Andalucía, España). Se agradece asimismo a FEDER (Comunidad Europea) el apoyo financiero y subvención UNHU13-1E-1611. El autor de esta Tesis agradece al MICIN el contrato predoctoral con nº de ref. PRE2019-091650. Así como también a la concesión de la ayuda para la Generación del Conocimiento del MCIN/ AEI /10.13039/501100011033/ FEDER “Una manera de hacer Europa”.

También se agradece la concesión del MCIN/AEI del Gobierno español, al Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC) como Centro de Excelencia Severo Ochoa (CEX2021-001189-S MCIN/AEI / 10.13039/ 501100011033), al Servicio de experimentación animal SAEX UCO y la financiación del acceso abierto: Universidad de Huelva/CBUA.

Queremos agradecer especialmente a los pacientes, al Biobanco del Principado de Asturias (PT20/0161) financiado conjuntamente por el Servicio de Salud del Principado de Asturias, el Instituto de Salud Carlos III y la Fundación Bancaria Cajastur e integrado en la Red Nacional de Biobancos y Biomodelos de España; al Biobanco HUB-ICOIDIBELL (PT20/00171) integrado en la Plataforma de Biobancos y Biomodelos del ISCIII y la Xarxa Banc de Tumors de Catalunya (XBTC); a la Red de Biobancos de la Región de Murcia, BIOBANC-MUR, inscrita en el Registro Nacional de Biobancos con número de registro B.0000859 y apoyada por el Instituto de Salud Carlos III (proyecto PT20/00109), por el Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca, IMIB y, por la Consejería de Salud de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia y, finalmente, al Biobanco de tejidos CIEN y la Fundación Biobanco Hospital Universitario de Alorcón.

Todos y cada uno de ellos han hecho posible la realización de las investigaciones que conforman la presente Tesis Doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xviii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xix
RESUMEN/ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Contaminantes ambientales y “cócteles químicos”.....	13
1.2. El papel del selenio como agente protector de contaminantes.....	18
1.3. Cerebro y neurotoxicidad.....	20
1.4. La microbiota intestinal.....	25
1.4.1. Eje microbiota intestinal-cerebro.....	25
1.4.2. Comunicación microbiota intestinal-gónadas.....	31
1.5. La enfermedad de Alzheimer.....	34
1.5.1. Criterios de diagnóstico de EA.....	38
1.5.2. Estadios de Braak en la EA.....	39
1.5.3. El papel de los elementos químicos en la EA.....	41
1.6. Análisis y técnicas con espectrometría de masas.....	42
1.6.1. Tratamiento de la muestra y técnicas de separación de analitos para el análisis por MS.....	44
1.6.2. Fuentes de ionización en MS.....	46
1.6.3. Analizadores de masas en MS.....	50
1.7. Metodologías Ómicas.....	54
1.7.1. La metabolómica.....	56
1.7.2. La metalómica.....	59
1.7.3. La metataxonómica.....	60
2. OBJETIVOS.....	65
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
3.1. Diseño experimental.....	71
3.1.1. Capítulos 1 y 2: Impacto potencial de los cócteles químicos y efecto de la suplementación de Se en el metaboloma cerebral y testicular de ratones y su posible conexión con la microbiota intestinal.....	71

3.1.2. Capítulo 3: Estudio del metaloma en diferentes áreas del cerebro humano post-mortem con EA en diferentes estadios Braak.....	72
3.2. Procedimientos experimentales	75
3.2.1. Metabolómica cerebral, testicular y microbiota intestinal de ratones <i>Mus Musculus</i>	75
3.2.1.1. Preparación del tejido cerebral y testicular de ratones modelo para el análisis metabolómico.....	75
3.2.1.2. Análisis mediante cromatografía de gases y de líquidos.....	76
3.2.1.3. Procesamiento de datos de metabolitos cerebrales y testiculares.....	77
3.2.1.4. Perfil de la microbiota intestinal.....	78
3.2.2. Metaloma en tejido cerebral humano con patología de EA en diferentes estadios de Braak.....	79
3.2.2.1. Preparación de la muestra.....	80
3.2.2.2. Determinación del metaloma por ICP-QQQ-MS.....	81
3.3. Análisis estadístico de los resultados.....	81
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
4.1. Capítulo 1: Metabolómica cerebral de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” y a la suplementación con Se a través del eje intestino-cerebro.....	89
4.2. Capítulo 2: Interacción entre el intestino y las gónadas en ratones expuestos a un “cóctel químico” que combina la metabolómica y el perfil microbiano mediante secuenciación de amplicones.....	125
4.3. Capítulo 3: El metaloma cerebral post mortem del paciente con Alzheimer depende de los estadios de Braak y de las regiones cerebrales.....	159
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	239
5.1. Conclusiones.....	241
5.2. Conclusions.....	243
REFERENCIAS.....	247
ANEXOS.....	285
Anexo 1. Tabla extendida del Capítulo 1.....	287
Anexo 2. Tabla extendida del Capítulo 2.....	291
Anexo 3. Tabla extendida del Capítulo 3.....	295

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Influencia en la salud de algunos metales pesados.

Figura 2. Principales estructuras del córtex frontal, ganglios basales y sistema límbico.

Figura 3. Mecanismo patogénico de la neurotoxicidad por diversas toxinas ambientales.

Figura 4. Paradigmas experimentales del eje microbiota intestinal-cerebro en humanos y roedores.

Figura 5. Vías de comunicación del eje microbiota-intestino-cerebro.

Figura 6. Efecto de la microbiota intestinal y la disbiosis en la función reproductiva masculina.

Figura 7. Formación de agregados identificados como biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (EA).

Figura 8. Marcadores biológicos de alteraciones histopatológicas en la enfermedad de Alzheimer (EA).

Figura 9. Progresión de los seis estadios de Braak en enfermedad de Alzheimer (EA).

Figura 10. Etapas del análisis de la espectrometría de masas y espectrómetro de masas.

Figura 11. Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de masas.

Figura 12. Diferentes fuentes de ionización: A) ionización electrónica (EI), B) ionización química (CI), C) ionización por electroespray (ESI) y D) Comparativa entre las diferentes fuentes.

Figura 13. Ionización por plasma de acoplamiento inductivo.

Figura 14. Esquema de un analizador de masas Tiempo de vuelo.

Figura 15. Esquema de un analizador de trampa de iones.

Figura 16. Esquema de un espectrómetro de masas cuadrupolo.

Figura 17. Estudios ómicos convencionales en biología.

Figura 18. Etapas de un experimento metabolómico general.

Figura 19. Diseño experimental para exposición animal.

Figura 20. Regiones del cerebro humano obtenidas para el análisis elemental.

Figura 21. Resumen gráfico del estudio sobre metabolómica cerebral de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se) a través del eje microbiota intestinal-cerebro.

Figura 22. Comparación de las curvas de supervivencia global de los ratones control (C), ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se) mediante el análisis de Kaplan-Meier (software XLStat, v. 2020.2.2.6533, Addinsoft).

Figura 23. Análisis en 3D de componentes principales de metabolitos cerebrales determinados por A) Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), B) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y C) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS).

Figura 24. Gráficas del PLS-DA entre grupos de metabolitos cerebrales de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se). 2D-PLS-DA de muestras de cerebro correspondientes al análisis A) GC-MS, B) UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS y C) UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS.

Figura 25. Gráficas 2D-PLS-DA de comparaciones de grupos por partes en A) ratones expuestos a “cóctel químico” comparados con el control y B) ratones suplementados con Selenio expuestos a “cóctel químico” (CC-Se) comparados con ratones expuestos a “cóctel químico” (CC).

Figura 26. Mapa de calor de las abundancias de los metabolitos cerebrales alterados en los diferentes grupos de ratones control, ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Figura 27. Gráficos de análisis de vías que muestran las rutas metabólicas más deterioradas en los grupos ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Figura 28. Mapas de calor de correlación de Spearman que muestran las asociaciones entre los metabolitos cerebrales y la microbiota intestinal en los grupos A) ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y B) ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Figura 29. Resumen gráfico del estudio sobre interacción entre el intestino y las gónadas en ratones expuestos a un “cóctel químico” que combina la metabolómica y el perfil microbiano mediante secuenciación de amplicones.

Figura 30. Análisis 3D de componentes principales de metabolitos cerebrales determinados por A) Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), B) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y C) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS).

Figura 31. 3D-PLS-DA de muestras testiculares correspondientes al análisis A) Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), B) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y C) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS).

Figura 32. Mapa de calor de los metabolitos testiculares de los ratones control (C), ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Figura 33. (A) Gráficas de análisis de vías que muestran las rutas metabólicas más deterioradas en los grupos de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y (B) tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Figura 34. Mapas de calor de correlación de Spearman que muestran las asociaciones entre los metabolitos de los testículos y la microbiota intestinal en ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC).

Figura 35. Mapas de calor de correlación de Spearman que muestran las asociaciones entre los metabolitos de los testículos y la microbiota intestinal en ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Figura 36. Resumen gráfico del estudio sobre la asociación de los metales en el cerebro del Alzheimer con los estadios de Braak.

Figura 37. PLS-DA para cerebros de control y Braak V-VI de enfermedad de Alzheimer por separado para muestras corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P).

Figura 38. PLS-DA para cerebros de control y Braak I-II de enfermedad de Alzheimer (EA) por separado para muestras corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P).

Figura 39. PLS-DA para cerebros de control y Braak III-IV de enfermedad de Alzheimer (EA) por separado para muestras corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P).

Figura 40. Distribución de elementos en muestras de corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P) de cerebros con enfermedad de Alzheimer (EA) en estadios Braak V-VI.

Figura 41. Distribución de elementos en muestras de corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P) del grupo CONTROL.

Figura 42. Distribución de elementos en muestras de corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P) de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) en estadio Braak I-II.

Figura 43. Distribución de elementos en muestras de corteza frontal (CTX), caudado (C), ganglios basales (BG) y putamen (P) de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) en estadio Braak III-IV.

Figura 44. Mapa de calor de concentración promedio de la abundancia de elementos en a) corteza frontal (CTX), b) caudado (C) c) ganglios basales (BG) y d) putamen (P) del control y grupos de AD con Braak I-IV, Braak III-IV y Braak V-VI.

Figura 45. Mapa de correlación entre elementos en a) corteza frontal (CTX), b) putamen (P), c) ganglios basales (BG) y, d) caudado (C) en estadios Braak V-VI.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de las regiones cerebrales con los diferentes estadios de Braak de enfermedad de Alzheimer (EA).

Tabla 2. Parámetros de la digestión asistida por microondas.

Tabla 3. Metabolitos cerebrales alterados.

Tabla 4. Abundancia de taxones a nivel de género en los grupos de ratones control (C), ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se)

Tabla 5. Metabolitos testiculares de ratones anotados después del análisis mediante la multiplataforma analítica combinando Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS).

Tabla 6. Detalles del análisis de la vía de metabolitos alterados por comparación de pares.

Tabla 7. Concentración promedio y SEM (ng g⁻¹) de elementos en diferentes regiones del cerebro humano: Control (C), Alzheimer en Estadios Braak I-II (I-II), Alzheimer en Estadios Braak III-IV (III-IV) y Alzheimer en Estadios Braak V-VI (V-VI).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Amygdala	Amígdala
Aβ	Amyloid- β plaques	Placas β -amiloides
Aβ42	Amyloid Beta 42	Beta amiloide 42
AD EA	Alzheimer's disease	Enfermedad de Alzheimer
APP	Amyloid precursor protein	Proteína precursora amiloide
APP/PS1	Amyloid precursor protein in brain model mouse	Proteína precursora amiloide en cerebro de ratón modelo
BBB BHE	Blood-brain barrier	Barrera hematoencefálica
BG	Basal Ganglia	Ganglios basales
Cau	Caudate	Caudado
C	Control mice group fed rodent diet	Grupo control de ratones alimentados con dieta para roedores
CC	Mice fed regular diet exposed to the chemical cocktail	Ratones alimentados con una dieta convencional expuestos al cóctel químico
CC-Abx	Antibiotic treated-mice fed regular diet exposed to the chemical cocktail	Ratones tratados con antibióticos alimentados con una dieta convencional expuestos al cóctel químico
CC-Abx-Se	Antibiotic treated-mice fed Se supplemented diet exposed to the chemical cocktail	Ratones tratados con antibióticos alimentados con una dieta suplementada con selenio expuestos al cóctel químico
CC-Se	Mice fed Se supplemented diet exposed to the chemical cocktail	Ratones alimentados con una dieta suplementada con Selenio expuestos al cóctel químico

cer	Ceramide	Ceramida
Ch	Choline	Colina
CNS SNC	Central nervous system	Sistema nervioso central
CTX	Frontal Cortex	Corteza frontal
DCF	Diclofenac	Diclofenaco
EI	Electronic impact	Impacto electrónico
FC	Fold change	Fold change
FLQ	Flumequine	Flumequina
GBA	Gut-brain axis	Eje intestino-cerebro
GC	Gas chromatography	Cromatografía de gases
GF	Germ-Free	Libre de Gérmenes
GPCh	Glycerophosphocholine	Glicerofosfocolina
IARC	International Agency for Research on Cancer	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICP	Inductively Coupled Plasma	Plasma de acoplamiento inductivo
KRI	Kovat's retention indexes	Índices de retención de Kovat
MG	Monoacylglycerol	Monoacilglicerol
MS	Mass spectrometry	Espectrometría de masas
MTBE	Methyl tertiary-butyl ether	Metil terbutil éter
NFT	Neurofibrillary Tangle	Ovillo neurofibrilar
OMS	World Health Organization	Organización Mundial de la Salud
P	Putamen	Putamen

PBA	Beta-amyloid peptide	Péptido beta-amiloide
PC	Phosphatidylcholine	Fosfatidilcolina
PCA	Principal components analysis	Análisis de componentes principales
PCh	Phosphocholine	Fosfocolina
PE	Phosphatidylethanolamine	Fosfatidiletanolamina
PG	Phosphatidylglycerol	Fosfatidilglicerol
PI	Phosphatidylinositol	Fosfatidilinositol
PLS-DA	Partial least squares discriminant analysis	Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales
PNS SNP	Peripheral nervous system	Sistema nervioso periférico
PS	Phosphatidylserine	Fosfatidilserina
QC	Quality control samples	Muestras de control de Calidad
QQQ	Triple quadrupole	Triple cuadrupolo
QTOF	Quadrupole-time of flight	Cuadrupolo-tiempo de vuelo
SG	Overall survival	Supervivencia general
ROS	Reactive Oxygen Species	Especies de oxígeno reactivas
TMS	Trimethylsilyl	Trimetilsililo
UHPLC	Ultra-high Performance Liquid Chromatography	Cromatografía líquida de ultra alta eficacia

RESUMEN/ABSTRACT



Resumen: Este trabajo de tesis describe el estudio ómico y metabómico de la reprogramación y eficacia en la replicación de contaminantes a través de la ingeniería metabólica. El estudio se realizó en un organismo modelo, utilizando técnicas de espectrometría de masas y bioinformática para analizar el perfil de metabolitos y la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo de los contaminantes. Los resultados muestran que la reprogramación metabólica puede mejorar la eficiencia de la replicación de los contaminantes, lo que tiene implicaciones importantes en el campo de la ingeniería metabólica y la biotecnología.

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Los contaminantes ambientales degradan la calidad del medio ambiente y perjudican la flora, fauna y la salud humana constituyendo una preocupación mundial de primer orden. Uno de los tipos de contaminantes ambientales más importantes son los químicos siendo los metales pesados de los más críticos y extendidos en los ecosistemas.

El *eje microbiota intestinal-cerebro* supone la interrelación entre sistema nervioso central y tracto gastrointestinal a través de vías nerviosas, hormonales e inmunológicas e implicando a la microbiota intestinal. Esta es determinante en la neuroquímica cerebral y ha demostrado su influencia también en la salud reproductiva, llegando a influir también en el *eje hipotálamo-hipófisis gonadal e hipotálamo-hipófisis tiroideo*.

Asimismo, los avances en neurociencias, en bioquímica y el aumento de la esperanza de vida están promoviendo constantes estudios sobre senilidad y la enfermedad de Alzheimer, cuyos biomarcadores está permitiendo el diagnóstico en estadios más precoces de la enfermedad, desviando los tradicionales criterios neuropatológicos en la fase terminal, hacia la identificación del grado y distribución neurológica de las lesiones asociadas según los Estadios de Braak.

Las *ciencias ómicas* suponen un conjunto de disciplinas que permiten estudiar a gran escala los componentes moleculares de los sistemas biológicos. Según los objetivos de estudio se subdividen en cuatro grandes áreas: la genómica, que analiza el genoma completo; la transcriptómica, dedicada al conjunto de ARNm y visualizando procesos celulares que van a ocurrir; la proteómica, que estudia las proteínas y funciones celulares; y, *la metabolómica*, que analiza el conjunto de metabolitos y estado metabolómico del organismo en estrecha relación con el fenotipo. También la metalómica es otra disciplina que emerge entre las ómicas por el papel esencial de los metales en numerosos procesos biológicos. Además, las meta-ómicas definidas como ómicas cuyo objeto de estudio son los genes, fragmentos de ARN, proteínas, entre otros, provenientes de diferentes organismos (*e.g.* meta-genómica, meta-taxonomía, meta-proteómica, entre otras) complementan este tipo de estudios.

En esta Tesis combinamos la metabolómica, metalómica y meta-taxonomía mediante técnicas analíticas de alta resolución como la *espectrometría de masas*, con objeto de estudiar la neurotoxicidad y efecto de contaminantes en la reproducción, considerando sus posibles efectos sinérgicos o antagónicos a través de la microbiota intestinal, utilizando para ello ratones modelo y cerebros humanos post-mortem con Alzheimer.

Para el estudio del potencial impacto de un “cóctel químico” compuesto de arsénico, cadmio, mercurio, flumequina y diclofenaco sobre el metaboloma cerebral y testicular de ratones y su posible conexión con la microbiota intestinal, así como la suplementación con selenio, aplicamos una plataforma metabolómica no dirigida con las técnicas analíticas de cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas de trampa de iones (GC-MS) y cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a cuadrupolo-tiempo de vuelo (UHPLC-QTOF). Los estudios metalómicos en muestras cerebrales post-mortem con Alzheimer se llevaron a cabo mediante mineralización asistida por microondas y determinación mediante plasma de acoplamiento inductivo con detector de triple cuadrupolo (ICP-QQQ-MS). Los estudios metataxómicos se llevaron a cabo mediante la secuenciación del ARN ribosómico 16S con la plataforma de secuenciación MiSeq-Illumina.

Nuestros resultados mostraron numerosas evidencias de la interacción clave entre la ingesta de selenio, la microbiota y los metabolitos cerebrales, teniendo potenciales efectos sobre la salud en múltiples niveles, incluido el eje microbiota intestinal-cerebro y la salud reproductiva, a pesar de haber sido afectados por los contaminantes. Por otra parte, observamos niveles más elevados de determinados metales y más bajos de otros, asociados a diferentes estadios de Braak en comparación con el grupo control y asociados a diferentes áreas cerebrales.

Concluimos que las metodologías metabolómicas basadas en la combinación de GC-MS y UHPLC-QTOF-MS han permitido determinar una amplia cobertura de metabolitos de diferente naturaleza en muestras de tejido cerebral y testicular de ratones expuestos al cóctel químico y suplementados con selenio. También, el análisis multielemental optimizado en muestras de tejido cerebral post-mortem basado en ICP-QQQ-MS, permitió determinar el metaloma de pacientes con diferentes

estadios de Braak de Alzheimer y en diferentes regiones del cerebro humano.

Palabras clave: ómicas, eje microbiota intestinal-cerebro, eje microbiota intestinal-gónadas, Enfermedad de Alzheimer, espectrometría de masas.

ABSTRACT

Environmental pollutants degrade the quality of the environment and harm flora, fauna and human well-being, constituting a major global concern. The most important type of pollutants are chemicals, with heavy metals being the most critical and widespread in ecosystems.

The *gut-brain axis* involves a bidirectional communication between the central nervous system and the gastrointestinal tract through nervous, hormonal and immunological pathways and involving the gut microbiota. This is a determining factor in brain neurochemistry and has also demonstrated its influence on reproductive health, coming to be called the *gut-gonad-microbiota axis* due to the complex interactions with a potential impact in the hypothalamus-pituitary-gonadal and hypothalamus-pituitary-thyroid axes.

Likewise, advances in neuroscience, biochemistry and increased life expectancy are promoting constant studies on senility and Alzheimer's disease, whose biomarkers are allowing diagnosis in earlier stages, diverting traditional neuropathological criteria in the terminal phase, towards the identification of the degree and neurological distribution of associated lesions according to Braak Stages.

Omics is a set of disciplines that allow the large-scale study of the molecular components of biological systems. According to the study objectives, they are subdivided into four large areas: genomics, which analyzes the entire genome; transcriptomics, which analyzes the set of mRNA and visualizes cellular processes that will occur; proteomics, with the study of proteins and cellular functions; and metabolomics, which analyzes the set of metabolites and metabolomic state of the organism in close relation to the phenotype. Metallomics is also another discipline that emerges among the omics due to the essential role of metals in numerous biological processes. Also, meta-omic methodologies defined as omics that study the whole genome, ARN fragments, proteins, among others, that come from different organisms (e.g. meta-genomics, meta-taxonomics, meta-proteinomics, among others)

This Thesis focuses on metabolomics, metallomics and meta-taxonomics using high-resolution analytical techniques such as mass spectrometry, with the aim of studying the potential neurotoxicity and effect of contaminants on reproduction, considering their possible synergistic or antagonistic effects through the gut microbiota, using model mice and post-mortem human brains with Alzheimer's.

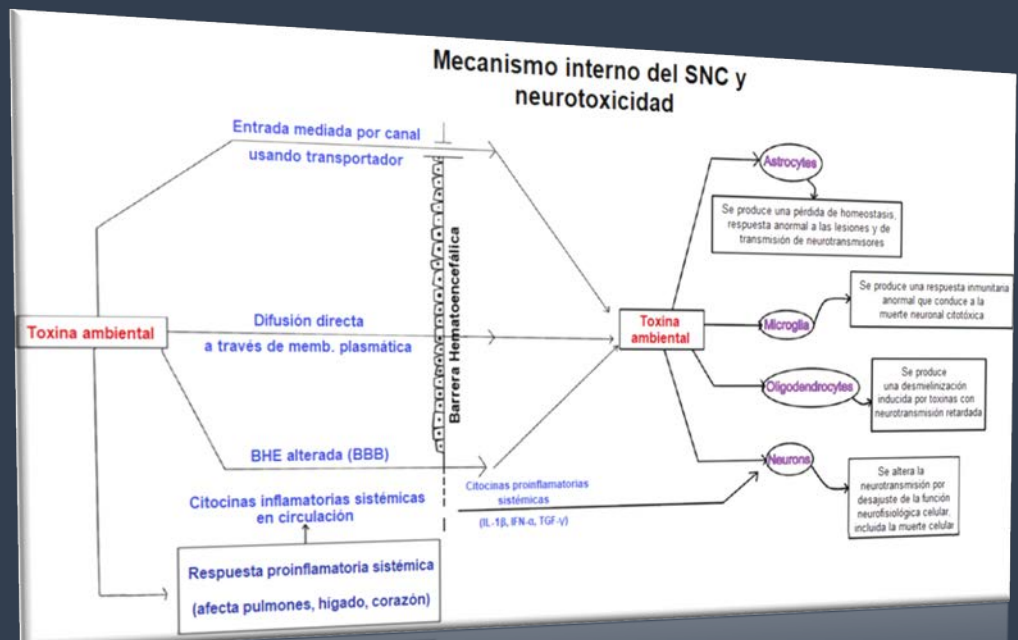
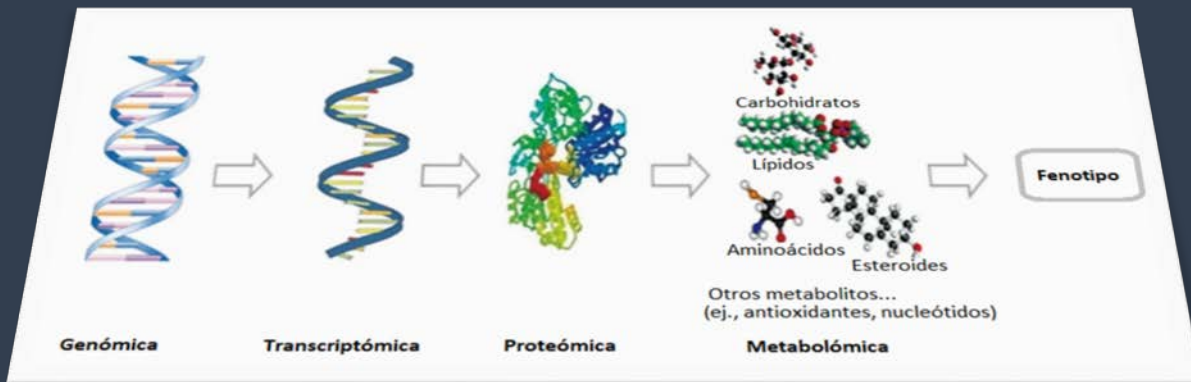
To study the potential impact of a “chemical cocktail” (arsenic, cadmium, mercury, flumequine, and diclofenac) on the brain and testicular metabolome of mice and its possible connection with the gut microbiota, as well as selenium supplementation, we applied an “untargeted” metabolomic platform combining the analytical techniques gas chromatography couple to ion-trap mass spectrometry (GC-MS) and ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight (UHPLC-QTOF). Metallomic studies in post-mortem human brains with Alzheimer were carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry with triple quadrupole (ICP-QQQ-MS) after mineralization of the samples with a microwave oven. Meta-taxonomic studies to determine the microbiota profiles were carried out by 16S rRNA gene sequencing by the platform MiSeq-Illumina

Our results showed numerous evidences of the key interaction between selenium intake, microbiota and brain metabolites, having potential effects on health at multiple levels, including the gut-brain axis and reproductive health, despite being affected by the contaminants. Moreover, we observed higher levels of certain metals and lower levels of others, associated with different Braak stages compared to the control group and associated with different brain areas.

We conclude that the application of metabolomic methodologies based on the combination of GC-MS and UHPLC-QTOF-MS allowed determining a wide coverage of metabolites of different nature in brain and testicular tissue samples of mice exposed to the chemical cocktail and supplemented with selenium. Also, optimized multielement analysis in post-mortem brain tissue samples based on ICP-QQQ-MS allowed determining the metallome of patients with different Braak stages of Alzheimer's and in different regions of the human brain.

Keywords: Omics, gut microbiota-brain axis, gut microbiota-gonad axis, Alzheimer's disease, mass spectrometry.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminantes ambientales y “cócteles químicos”

La contaminación ambiental supone la presencia de uno o más contaminantes, o cualquier mezcla de ellos, con capacidad para degradar la calidad del medio ambiente y perjudicar la flora, fauna y/o el bienestar humano [1]. Estas sustancias adquieren la categoría de contaminantes cuando superan los niveles naturales de presencia o cuando exhiben propiedades tóxicas. El tipo de contaminantes más importantes tanto por su elevado número como por su presencia universal, son los químicos, clasificándose en aniones inorgánicos, metales pesados y compuestos orgánicos.

La exposición persistente de la población humana a sustancias químicas suscita una inquietud global de primer orden, fundamentada en la sólida evidencia que vincula la exposición con el desarrollo de enfermedades [2]. El riesgo químico no se limita a la toxicidad inherente de estos compuestos, sino que se agrava por su persistencia ambiental y su capacidad de acumulación en los tejidos orgánicos, lo que conlleva su biomagnificación a través de la cadena trófica [3].

La contaminación ambiental constituye uno de los desafíos más acuciantes del siglo XXI, exigiendo una atención prioritaria a nivel global. Su impacto trasciende las fronteras geográficas y afecta de manera multifacética a los ecosistemas, la salud humana y la economía. La creciente industrialización, el aumento de la población y los patrones de consumo insostenible han intensificado la liberación de sustancias contaminantes al medio ambiente, generando una serie de problemas ambientales como el cambio climático, la pérdida de biodiversidad y la degradación de los recursos naturales. En este contexto, abordar la problemática de la contaminación ambiental se revela como una necesidad para garantizar la sostenibilidad del planeta y el bienestar de las generaciones futuras.

Los metales pesados se consideran uno de los contaminantes más críticos y extendidos en los ecosistemas contemporáneos [4]. Caracterizados por su resistencia a la biodegradación y a los tratamientos de eliminación convencionales, estos metales exhiben toxicidad debido a su capacidad de sustituir elementos esenciales en los sitios activos enzimáticos y de inducir estrés oxidativo celular entre otros mecanismos (Figura 1) [5].

Uno de los efectos de la toxicidad de los metales más estudiado sobre su afección para la salud ha sido y es, su mayor o menor influencia para el desarrollo de cáncer, llegándose a denominar a los metales y metaloides con esta característica ya establecida como *agentes cancerígenos*. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés: International Agency for Research on Cancer) actualiza los listados de agentes cancerígenos según se va demostrando su carcinogenicidad. La Figura 1 recoge los principales efectos de algunos metales sobre la salud, por ejemplo, los efectos fisiológicos de la toxicidad del arsénico (As, incluido como carcinógeno en el Grupo 1 de la IARC) tiene elevada adversidad por cuanto que afecta a prácticamente todos los sistemas y órganos del cuerpo ya que interfiere con reacciones enzimáticas de amplia distribución: a nivel *dérmico* (hiperqueratosis irregular, queratodermia palmoplantar, líneas Mee en uñas, entre otros, además del cáncer de piel), *hepático* (cirrosis, necrosis hepática, angiosarcoma hepático,...), e igualmente a nivel *renal*, *gastrointestinal*, *cardiovasculares*, *neurológicos*, *respiratorios*, entre otros [6].

EFFECTOS DE ALGUNOS METALES EN LA SALUD

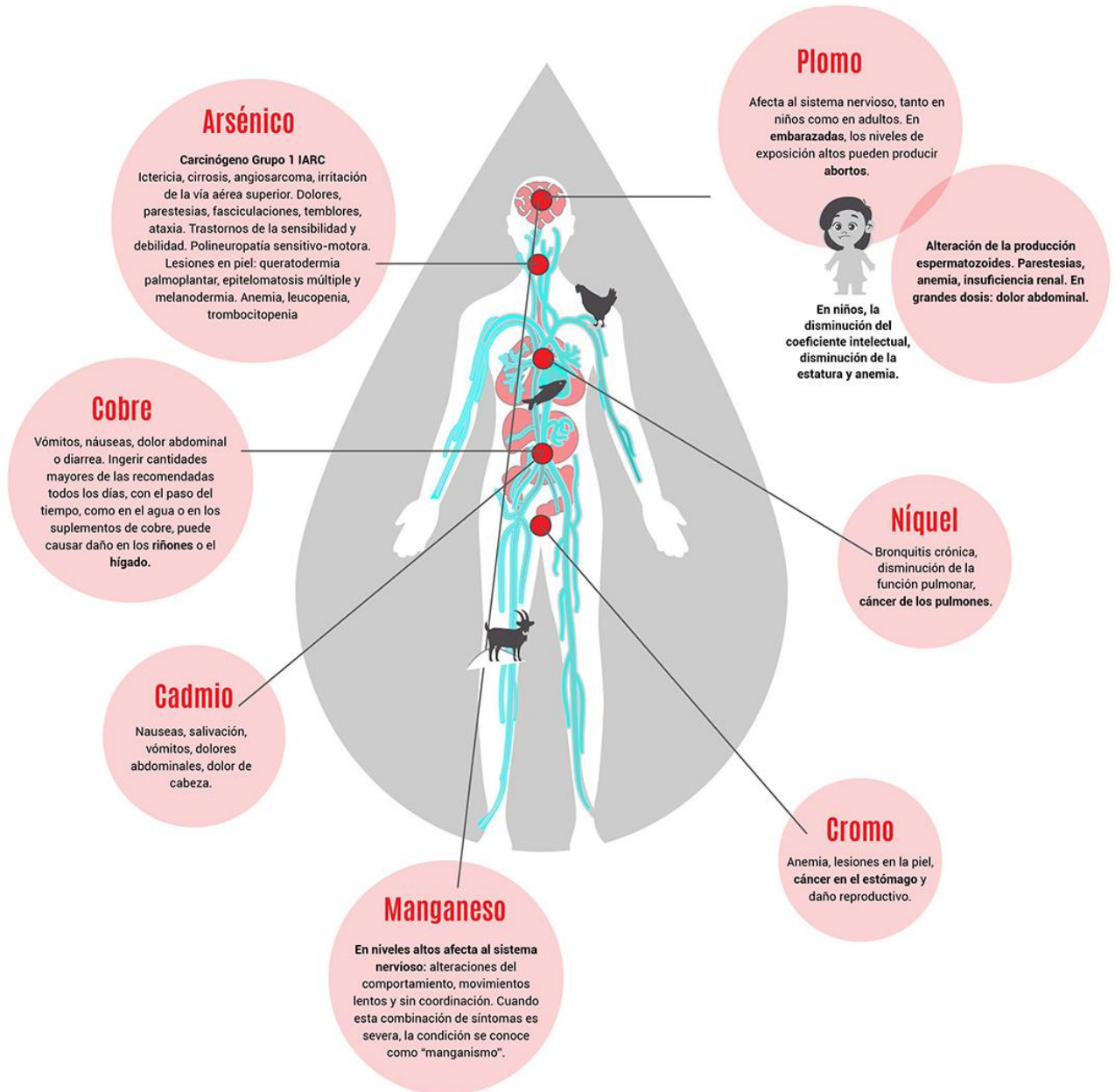


Figura 1. Influencia en la salud de algunos metales pesados[6].

Paralelamente, la presencia de fármacos en el medio ambiente ha suscitado creciente preocupación. Aunque sus concentraciones ambientales suelen ser consideradas subtóxicas, una sólida evidencia científica apunta a su potencial para inducir alteraciones endocrinas, epigenéticas y del desarrollo en organismos acuáticos y humanos tras exposiciones prolongadas [7].

Estudios epidemiológicos y experimentales indican que los metales y los fármacos coexisten en el medio ambiente e interactúan de manera que pueden tanto aumentar como disminuir su impacto en la salud humana [8–10]. A pesar de la frecuente exposición de forma conjunta a múltiples compuestos bioacumulables derivados de constantes actividades antropogénicas, es escasa la bibliografía científica dedicada al estudio de sus interacciones [11–14].

Dado el creciente reconocimiento de las interacciones entre metales pesados y productos farmacéuticos en el medio ambiente, en esta Tesis hemos definido como “cóctel químico” de referencia a la mezcla de los elementos (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg), y los fármacos diclofenaco (DCF) y flumequina (FLQ). Los componentes del “cóctel químico” fueron seleccionados por su prevalencia ambiental y sus reconocidos efectos adversos sobre los ecosistemas y sus habitantes, incluyendo el ser humano. El As, metaloide de distribución global, puede ingresar al organismo a través de diversas vías, incluyendo dérmica, oral e inhalatoria. Incluso a concentraciones reducidas, este elemento presenta riesgos para la salud, desde procesos inflamatorios hasta oncogénesis [15]. Su exposición prolongada a través del consumo de agua y alimentos contaminados puede causar cáncer y lesiones cutáneas, así como también se ha asociado a enfermedades cardiovasculares y diabetes. La exposición intrauterina y en la primera infancia se ha relacionado con efectos negativos en el desarrollo cognitivo y un aumento de la mortalidad en jóvenes adultos [16].

Por otra parte, la exposición a As se ha identificado como un factor de riesgo asociado con la infertilidad masculina, tal como se evidencia en estudios previos [17]. Investigaciones epidemiológicas han corroborado esta relación, demostrando una asociación positiva entre la exposición a As y el incremento de marcadores de estrés oxidativo, así como una disminución de la calidad seminal [18, 19]. Además, se ha observado que el As correlaciona significativamente con el aumento de la excreción de hormonas sexuales en hombres en edad reproductiva [20, 21]. Estudios en animales han revelado los efectos adversos de As sobre la reproducción masculina, incluyendo la alteración de la morfología y función testicular, la disminución de la producción espermática, la reducción de la motilidad espermática y la modificación de la morfología

y función del esperma [22–24]. No obstante, la evaluación de la fertilidad masculina a través de la tasa de embarazo femenino en casos de exposición al As ha sido objeto de escasos estudios.

El Cd, ampliamente utilizado en procesos industriales, se caracteriza por su prolongada persistencia biológica (aproximadamente 20-30 años) y su acumulación predominante en tejidos blandos, especialmente hígado y riñón [25]. La exposición dietética constituye la segunda fuente más relevante de Cd, asociándose a nefropatías, hepatopatías, desmineralización ósea y trastornos tiroideos y metabólicos [26]. Por otro lado, su exposición también ha sido ampliamente asociada con efectos adversos sobre la fertilidad masculina incluyendo la alteración endocrina, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la regulación epigenética como lo demuestran numerosos estudios en modelos animales y humanos [27, 28].

El Hg es un metal de origen natural proveniente de la actividad volcánica, la erosión de las rocas, o la actividad humana, siendo esta última la causa principal de sus emisiones indicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS)[29] (combustión de carbón en centrales eléctricas, calefacciones y cocinas, procesos industriales, incineración de residuos y la extracción minera de Hg, entre otros metales). Representa un riesgo significativo para la salud pública debido a su toxicidad y con una creciente presencia antropogénica [30]. La inhalación de Hg o ingestión de sus compuestos, o la exposición cutánea a ellos, han dado lugar a trastornos neurológicos y del comportamiento, incluyendo temblores, insomnio, pérdida de memoria, efectos neuromusculares, cefalea o disfunciones cognitivas y motoras [29, 31, 32]. Algunos estudios han demostrado la presencia de signos subclínicos leves de toxicidad para el sistema nervioso central (SNC) en trabajadores expuestos durante varios años a niveles atmosféricos de al menos 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de Hg elemental, además de efectos en los riñones que van desde la proteinuria, a la insuficiencia renal [29].

La exposición a Hg puede penetrar la barrera hemato-testicular, ejerciendo efectos nocivos directos sobre la integridad espermática, lo cual se confirma por los hallazgos del grupo de Siyu Li [28] mediante las técnicas de tinción de hematoxilina-eosina (HE) y

TUNEL. Estudios previos han documentado la capacidad del Hg inorgánico para alterar la secreción de andrógenos y dañar las células testiculares.

La exposición a este metal pesado puede desencadenar una disfunción reproductiva severa en ratones machos, atribuible a la fibrosis testicular. La fibrosis testicular se caracteriza por un aumento de colágeno, un engrosamiento de la membrana basal y la formación de granulomas., Además se ha demostrado que la exposición a Hg inorgánico puede conllevar efectos adversos sobre el tejido testicular [33].

Entre los productos farmacéuticos se destaca el DCF, que constituye un fármaco de amplio espectro terapéutico, empleado habitualmente por sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas [34] y, dada su elevada utilización y su limitada eliminación en los procesos de potabilización, el DCF emerge como uno de los contaminantes farmacéuticos más prevalentes en los entornos acuáticos y terrestres [35]. También, la FLQ, antibiótico sintético perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas, presenta actividad predominantemente frente a bacterias Gram-negativas. Su empleo extendido en la industria agropecuaria para el control de enfermedades animales ha derivado en una significativa carga ambiental por el antibiótico y sus correspondientes metabolitos [36].

1.2. El papel del selenio como agente protector de contaminantes

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial con un papel destacado en la regulación de la función inmune, el metabolismo tiroideo [37] y la prevención del cáncer [38]. La deficiencia de Se se ha asociado a diversas patologías, como la insuficiencia cardíaca, la miodegeneración nutricional y la enfermedad de Keshan [39, 40]. La suplementación con Se promueve la formación de selenoproteínas, enzimas que desempeñan un papel crucial en la defensa antioxidante y la regulación redox [41]. Además, el Se es esencial para la salud reproductiva influyendo el desarrollo gonadal, la gametogénesis y la fertilización [42].

Así pues, la suplementación con Se ha demostrado que la combinación de este oligoelemento con otros micronutrientes esenciales puede optimizar la eficiencia reproductiva en los hombres [43].

Por otra parte, se ha demostrado el beneficio de la suplementación con Se en la enfermedad de Alzheimer (EA, o AD por sus siglas en inglés: Alzheimer's disease) ya que se ha demostrado la deposición de placas β amiloides ($A\beta$) en el cerebro de ratones modelo (APP/PS1) [44]. Asimismo, el Se ha mostrado ser eficaz en la disminución del estrés oxidativo en el SNC, lo que contribuye a mitigar los efectos de la EA demostrando la capacidad de Se para reducir esta enfermedad [45].

El Se también ha sido identificado como un antagonista de metales pesados como el Hg, el As y el Cd [46–49]. La interacción antagonista entre el Hg y el Se fue descrita por primera vez en 1967 en estudios con ratas expuestas a cloruro de mercurio y selenito [50]. No obstante, se ha observado que la exposición simultánea a compuestos de Hg y Se puede aumentar la retención de Hg en el organismo, posiblemente debido a la formación de complejos inertes de Se-Hg, lo que representa un mecanismo de protección contra la toxicidad del Hg [50, 51].

La evidencia científica sugiere que el Se, en sus diversas formas químicas, ejerce un efecto antagónico sobre la toxicidad del As y el Cd en diversos órganos, incluyendo el hígado, el riñón, el bazo, el cerebro y el corazón [46, 52, 53]. Estos hallazgos se han observado tanto en modelos animales como en estudios de cultivo celular. Se ha propuesto que el mecanismo de acción del Se frente a la toxicidad del As y el Cd se basa principalmente en la formación de complejos inorgánicos estables que reducen la biodisponibilidad de estos metales pesados [52, 53]. Además, las enzimas antioxidantes dependientes de Se desempeñan un papel crucial en la neutralización de las ROS generadas por la exposición a metales pesados, contribuyendo así a la protección de los tejidos y órganos afectados.

Finalmente, cabe destacar estudios recientes que han revelado la capacidad del Se dietético para modular la composición y función del microbioma intestinal, lo que a su vez puede afectar al metabolismo y a la inmunidad del huésped [54–57]. La dieta se

reconoce como un factor determinante en la configuración del microbioma intestinal, con efectos tanto locales como sistémicos [58, 59], incluyendo la regulación de las hormonas reproductivas [60]. Se ha demostrado que la disbiosis intestinal inducida por una dieta alta en grasas puede dar lugar a trastornos neurológicos y alteraciones en la espermatogénesis [61, 62].

Sin embargo, la suplementación con Se no es ninguna panacea a causa de que su exceso puede ser tan perjudicial como su escasez, dándose un rango en el cual la acumulación de Se comienza a causar problemas de salud y dicho rango varía enormemente entre poblaciones e individuos dado que dicha varianza es dependiente de mutaciones genéticas, variaciones epigenéticas e incluso del rol del microbioma. En este sentido, podemos apuntar de manera simplista que la relación entre toma de Se y efecto para la salud es en forma de una “U”, en la cual su deficiencia está ligada a enfermedades, por lo que estas enfermedades descienden con Se en un rango pequeño hacia un estado de mejor salud y, si finalmente su ingesta continua, se producen enfermedades como la Selenosis o diabetes de tipo 2 y se asocia entonces a un peor estado de salud con un mayor incremento de cáncer y mortalidad [63].

1.3. Cerebro y neurotoxicidad

El cerebro es un órgano de gran complejidad al ser centro de control de nuestro organismo. Su correcto funcionamiento depende de una intrincada red de conexiones neuronales que permiten procesar información, generar pensamientos y emociones y coordinar nuestras acciones. Sin embargo, este órgano tan vital también es vulnerable pese a su barrera hematoencefálica (BHE, o BBB por sus siglas en inglés: blood brain barrier) a una amplia gama de factores ambientales, entre los que destacan las sustancias químicas [64, 65].

La neurotoxicidad ambiental, definida como el daño al SNC y al sistema nervioso periférico (SNP, o PNS por sus siglas en inglés: peripheral nervous system) causado por sustancias químicas presentes en el entorno, puede manifestarse de diversas formas

desde alteraciones sutiles en la función cognitiva, hasta trastornos neurológicos graves [66]. La exposición a neurotoxinas en cualquier etapa del desarrollo puede interrumpir procesos celulares secuenciales provocando un deterioro macroscópico, microscópico y funcional. Estos efectos pueden variar entre individuos estando condicionados asimismo por la duración, dosis e intensidad de la exposición [29], así como por factores como la edad, el estilo de vida y las propiedades neurotóxicas intrínsecas de las sustancias y las sinergias entre ellas.

Las principales fuentes de neurotóxicos ambientales incluyen la actividad minera, las prácticas agrícolas inadecuadas y la gestión irresponsable de los procesos productivos en las industrias farmacéutica, alimentaria y de bebidas. Estas actividades liberan una gran variedad de sustancias tóxicas al medio ambiente, como metales pesados (Cd, As, plomo (Pb), níquel (Ni), Hg, cromo (Cr), zinc (Zn), cobalto (Co), etc.), plagicidas, herbicidas, antibióticos y sales de Hg [67–70].

Los neurotóxicos ambientales inducen una serie de alteraciones en el cerebro incluyendo estrés oxidativo, inflamación y neurodegeneración, las cuales pueden llevar a disfunciones cognitivas y conductuales, afectando significativamente la calidad de vida de las personas [71]. Entre las múltiples vías de exposición, la dieta y la calidad del aire desempeñan un papel fundamental en la manifestación de la neurotoxicidad y en el desarrollo neurológico [72].

Determinadas regiones cerebrales como el área postrema, el hipotálamo, la glándula pineal, los ganglios autónomos y las terminales nerviosas motoras y sensoriales, carecen de la protección con la que cuentan el SNC, la BHE y el SNP, barrera hematoaxónica, lo que las hace vulnerables a la entrada y lesiones por neurotoxinas [66]. En la Figura 2 se pueden observar las áreas cerebrales en las que más no centramos durante la realización de esta Tesis Doctoral.

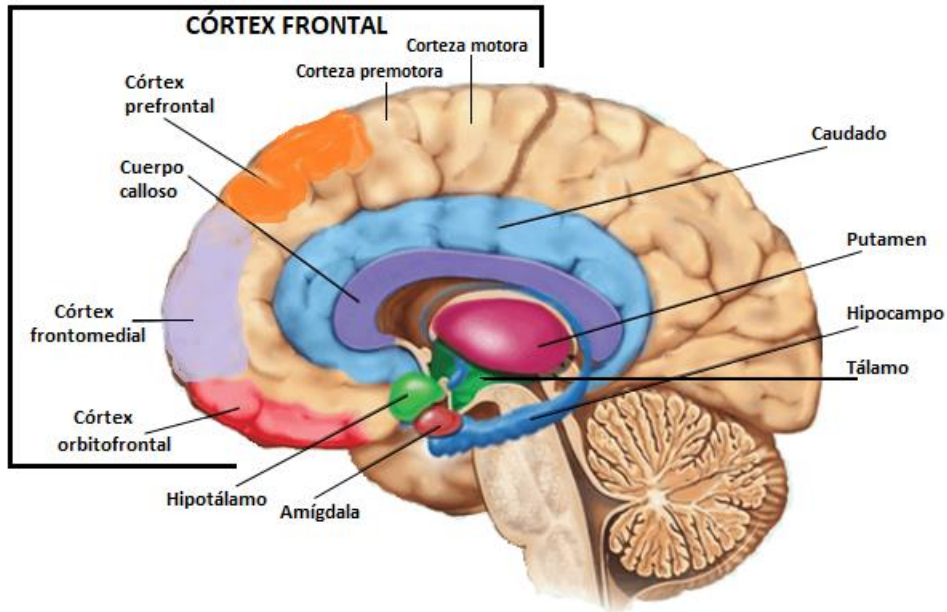


Figura 2. Principales estructuras del córtex frontal, ganglios basales y sistema límbico.

Los lóbulos frontales son responsables de numerosas y diversas funciones esenciales debido a que tienen amplias conexiones con otros sectores de la corteza y con las estructuras subcorticales como los ganglios basales [73]. Entre estas funciones destacan las más básicas como el control motor, la programación motriz o la atención, o funciones superiores como el lenguaje, el razonamiento abstracto, la metacognición o la cognición social [74]. Así, la región frontal se considera “*el centro de programación y control de la actividad*”, incluyendo la inhibición a estímulos irrelevantes y las funciones ejecutivas como la flexibilidad cognitiva y perseveración de la conducta hacia un fin, la direccionalidad y la selectividad de procesos en la toma de decisiones, la estabilidad de la actividad voluntaria, la concentración, el control y regulación interno, entre otros [75, 76].

En la zona más externa de la corteza frontal se distinguen tres grandes áreas anatomofuncionales (Figura 2): el córtex prefrontal dorsolateral (recibe y procesa la información sensorial ya elaborada de forma compleja desde otras áreas corticales), el frontomedial (recibe la información interoceptiva referente a órganos internos, de las estructuras corticales y subcorticales como el núcleo del tracto solitario, área hipotalámica lateral, núcleo paraventricular del tálamo, corteza insular) y el

orbitofrontal (procesamiento del valor de afecto que tienen los objetos que incluye la información proveniente de los sentidos: gusto, olfato y también somestésica, tacto y propiocepción, sentido de posición y equilibrio muscular). Esta última, zona orbital, permite reconocer objetos comestibles y nocivos, así como determinar su valor en forma de recompensa, dado que está basada en sus relaciones con la amígdala y la formación hipocampal [77].

Los *ganglios basales* (GB) son estructuras neuronales localizadas en regiones subcorticales compuestas por otros núcleos entre los que se encuentran: el cuerpo estriado que lo componen el núcleo caudado y núcleo lenticular, o lentiforme, formado a su vez por putamen y globo pálido, todas ellas con relevante papel en funciones motoras, cognitivas y de aprendizaje e interconectadas con el sistema límbico y de recompensa cuyo núcleo emocional es la amígdala, o cuerpo amigdalino [78]. Los GB trabajan en conjunto con la corteza cerebral, el tálamo y el tronco encefálico (Figura 2), formando circuitos neuronales esenciales que afectan a casi todos los aspectos del aprendizaje y comportamiento dado que las funciones de cada núcleo dependerá de los neurotransmisores utilizados, en general, núcleos excitadores y núcleos inhibidores [79, 80].

Núcleo Caudado y Putamen (núcleo estriado): El caudado, cerca del ventrículo lateral del cerebro y, localizado más lateralmente el putamen, forman juntos el núcleo estriado. Son críticos en la coordinación de movimientos automáticos y la ejecución de patrones motores aprendidos. También están implicados en funciones cognitivas como el procesamiento de retroalimentación y la planificación de movimientos.

En el *sistema límbico y de recompensa*, la estría terminal conecta la amígdala con el diencefalo y con las áreas frontales dorsomediales, además tiene conexiones hacia el tronco encefálico donde sinaptan con núcleos del sistema nervioso autónomo produciendo respuestas viscerales implicadas con las emociones. A través de estas conexiones la amígdala afecta las señales de salida motora al guiar conductas dirigidas por las emociones, así como impulsos necesarios para la supervivencia como buscar comida, calor, comodidad, escapar del dolor, mitigar la sed, huir ante el peligro, entre otros [79].

En relación al cerebro y neurotoxicidad, las toxinas ambientales acceden al SNC a través de la BHE utilizando cuatro mecanismos (Figura 3): primero, a través transportadores utilizando canales específicos; segundo, aprovechando la característica lipofílica de la toxina para atravesar directamente la membrana plasmática; tercero, ingresando a través de una BHE interrumpida y cuarto, mediante la entrada directa de citocinas proinflamatorias sistémicas, producidas por la acción de toxinas en órganos sistémicos como pulmones, hígado y corazón [81].

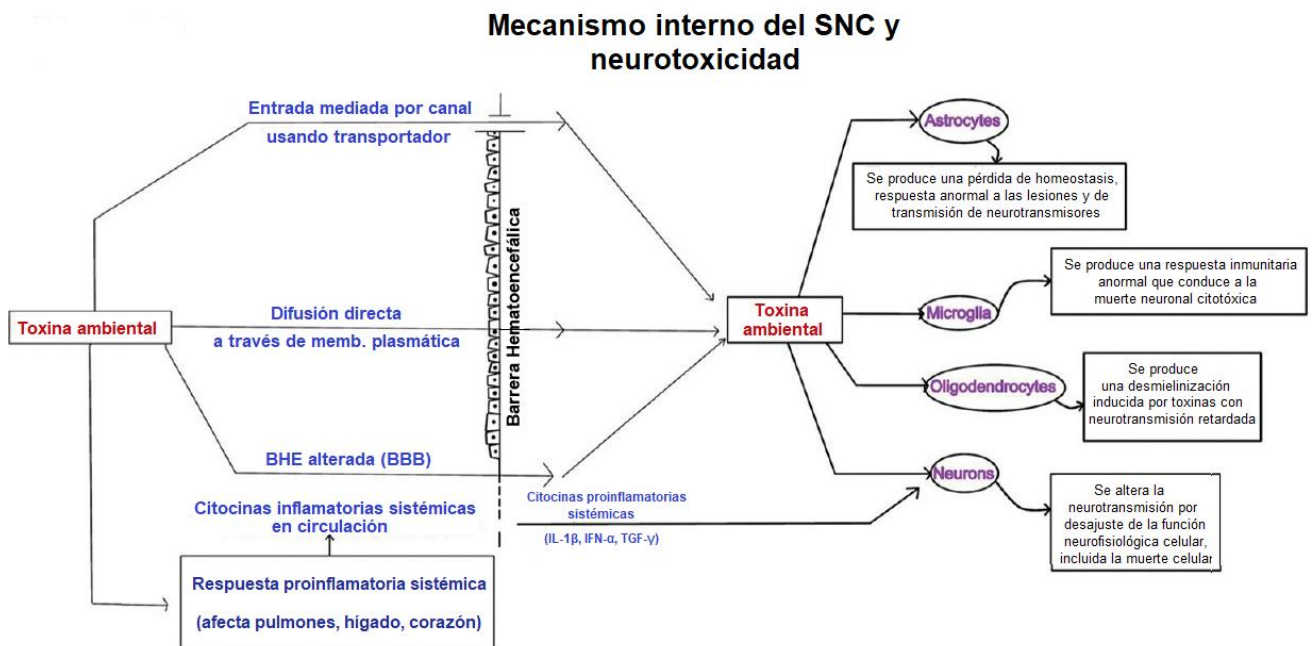


Figura 3. Mecanismo patológico de la neurotoxicidad por diversas toxinas ambientales (adaptada de [66]).

Una vez en el SNC, estas toxinas afectan el funcionamiento fisiológico normal de diversas células incluidas neuronas, microglia, astrocitos y oligodendrocitos, lo que estimula la liberación de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β , el factor de necrosis tumoral- α y el interferón- γ , causando neuroinflamación y neurodegeneración en el SNC [82] (ver Figura 3).

A pesar de los avances en la investigación, aún existe un vacío de conocimiento sobre los efectos sinérgicos de múltiples contaminantes. Es importante seguir investigando los mecanismos mediante los cuales los neurotóxicos dañan el cerebro y desarrollar estrategias para prevenir y mitigar sus efectos.

1.4. La microbiota intestinal

El concepto Microbiota hace referencia al conjunto de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, archeas, virus y protozoos, que colonizan un determinado lugar [83]. Concretamente, la microbiota intestinal se define como el conjunto de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal de un individuo. A pesar de que desde el punto de vista inmunológico los microorganismos son reconocidos como patógenos, muchos de ellos se encuentran cohabitando de manera simbiótica con los enterocitos. Los microorganismos comensales del intestino llevan a cabo funciones esenciales como la biotransformación de nutrientes y fármacos, la exclusión competitiva de patógenos y el mantenimiento de la homeostasis intestinal [84]. La relación simbiótica entre el huésped y su microbiota intestinal ha sido ampliamente estudiada y, varios de esos estudios en modelos animales gnotobióticos y en humanos, han demostrado la relevancia de la microbiota en la preservación de la integridad de la barrera intestinal y en la modulación de la respuesta inmune [84].

1.4.1. Eje microbiota intestinal-cerebro

El eje microbiota intestinal-cerebro es una red de comunicación bidireccional que conecta el SNC con el tracto gastrointestinal. Esta interacción se lleva a cabo a través de vías nerviosas, hormonales e inmunológicas y también involucra la microbiota intestinal. El eje microbiota intestinal-cerebro regula funciones digestivas y afecta al estado emocional, el comportamiento y la salud mental.

La relación entre el cerebro y el intestino es un concepto que ha evolucionado a lo largo de la historia. Ya en el siglo XVIII científicos como Robert Whytt observaron una conexión entre estos órganos a la que denominaron "simpatía nerviosa". A lo largo del siglo XIX esta idea se fortaleció y se llegó a considerar al estómago como un "segundo cerebro" debido a su influencia en el bienestar físico y emocional [85]. Sin embargo, no fue hasta finales de la década de 1960 cuando se acuñó el término "eje microbiota intestinal-cerebro", surgido a partir del descubrimiento de sustancias químicas comunes

al cerebro y al intestino, lo que sugería una comunicación bidireccional entre ambos órganos dando lugar a la hipótesis explicativa APUD (por sus siglas en inglés: amine precursor uptake and decarboxylation), que proponía un origen común en la cresta neural para las células productoras de estas sustancias, respaldando esa interrelación [86].

El hallazgo del microbioma intestinal ha enriquecido significativamente el modelo tradicional de comunicación bidireccional entre el cerebro y el intestino, dando lugar al concepto de "eje microbiota-intestino-cerebro" (GBA, por sus siglas en inglés, Gut-Brain Axis). Este enfoque enfatiza el papel crucial de la microbiota intestinal en los procesos de señalización bioquímica subyacentes [85].

Los estudios que apuntaban un papel determinante del microbioma intestinal en la modulación de la neuroquímica cerebral y el comportamiento emocional, se enfrentaron a un escepticismo inicial que ha evolucionado hacia un paradigmático cambio de perspectiva en la comprensión de numerosas patologías psiquiátricas y neurológicas (Figura 4). Así, los estudios preclínicos han utilizado una variedad de paradigmas experimentales para estudiar el papel de la microbiota intestinal en las interacciones intestino-cerebro (Figure 4, texto azul). Por otra parte, los resultados de estudios preclínicos del cerebro de rata se resumen en los cambios bioquímicos y comportamentales (Figura 4, texto en rojo a la derecha del cerebro de rata). Se pueden utilizar los mismos paradigmas experimentales en estudios humanos a excepción del estado de libre de gérmenes (GF, por sus siglas en inglés, Germ-Free). Por último, a diferencia de los roedores, las respuestas subjetivas y las neuroimágenes estructurales y funcionales son lecturas adecuadas en humanos (Figura 4 izquierda del cerebro humano). En la Figura 4 también podemos observar la considerable diferencia entre la proporción relativa de estructuras corticales y subcorticales entre el cerebro humano y el de roedores [87].

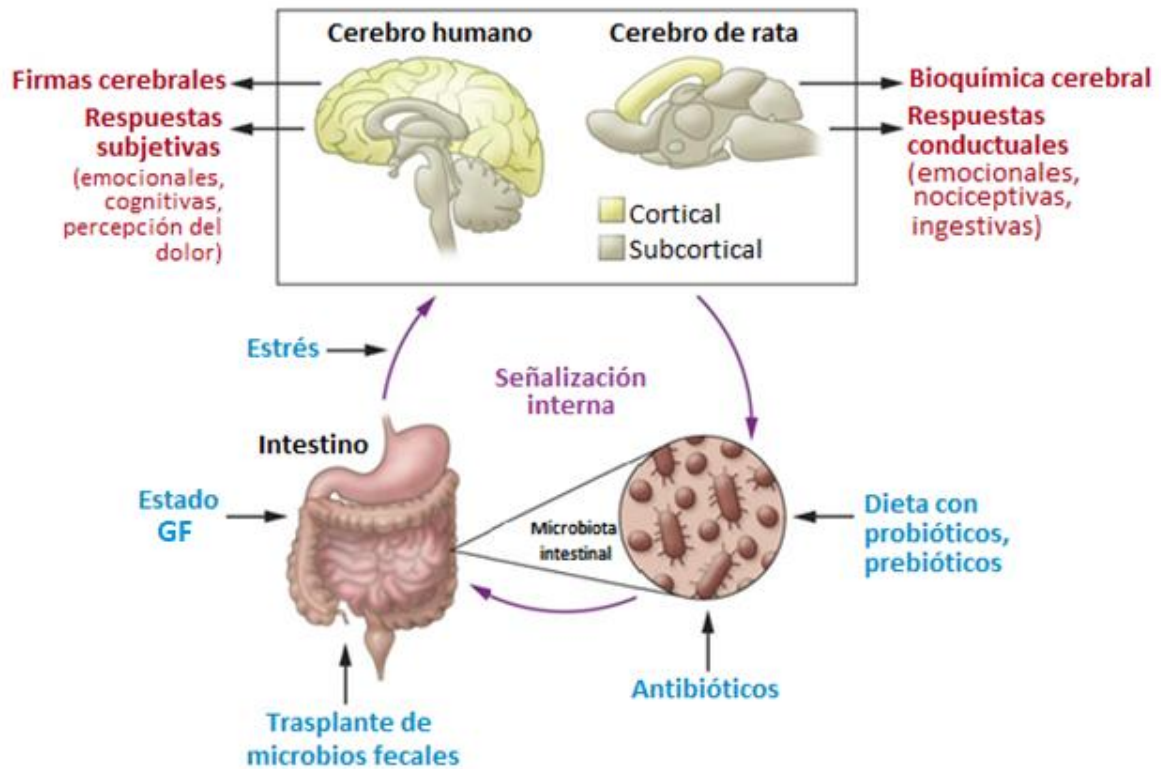


Figura 4. Paradigmas experimentales del eje microbiota intestinal-cerebro en humanos y roedores (adaptada de [87]).

Adicionalmente, se conoce que la microbiota intestinal modula múltiples vías de comunicación directas (sistema nervioso entérico y nervio vago) e indirectas (neurotransmisores, ácidos grasos de cadena corta, citocinas) del GBA. La Figura 5 ilustra las rutas de comunicación del GBA. Estas rutas incluyen la vía neural (nervio vago, sistema nervioso entérico, neurotransmisores y metabolitos neuroactivos como el butirato de ácido graso de cadena corta: SCFA), la vía inmune (citocinas) y las vías neuroendocrinas (secreción de hormonas intestinales como péptido YY, neuropéptido Y y péptido similar al glucagón-1; secreción de cortisol a través del eje hipotálamo-pituitario-adrenal: HPA). Los metabolitos neuroactivos producidos por la dieta y los microbios modulan el GBA para afectar la función de la barrera intestinal, la secreción de hormonas de las células enteroendocrinas (EEC), la producción de neurotransmisores por el epitelio intestinal y la microbiota y la señalización glial entérica, relevantes para las enfermedades neurodegenerativas (imagen adaptada de [88]).

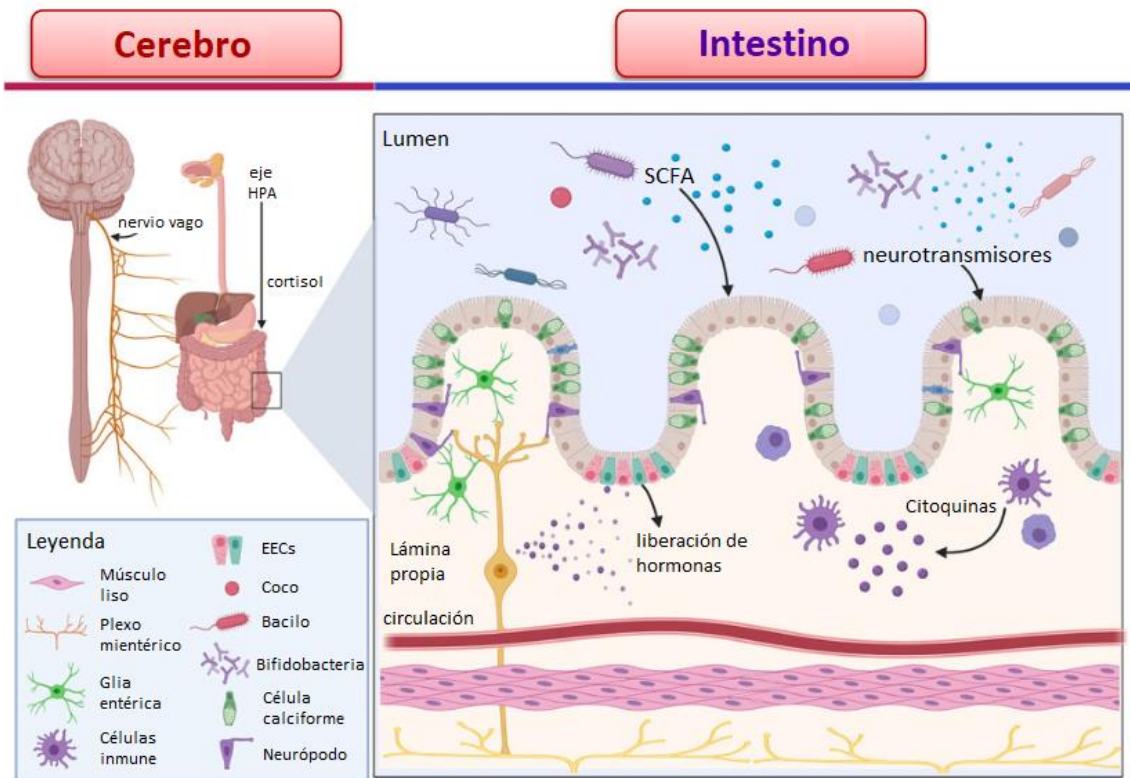


Figura 5. Vías de comunicación del eje microbiota-intestino-cerebro.

La conexión bilateral del eje microbiota intestinal-cerebro incluye el cerebro, la médula espinal, el sistema nervioso autónomo (simpático, parasimpático y entérico) y el eje HPA, por lo que este eje es responsable de monitorear la homeostasis fisiológica y conectar las áreas emocionales y cognitivas del cerebro con las funciones intestinales periféricas, como la activación inmunitaria, la permeabilidad intestinal, el reflejo entérico y la señalización enteroendocrina [89].

Los metabolitos producidos por la dieta y los microbios modulan el GBA para afectar la función de la barrera intestinal, la secreción de hormonas de las células enteroendocrinas (EEC), la producción de neurotransmisores por el epitelio intestinal y la microbiota y la señalización glial entérica, relevantes para las enfermedades neurodegenerativas mediante las siguientes vías de comunicación.

Comunicación directa e indirecta entre cerebro y microbiota:

- **Vía neural:**
 - Nervio vago

- Sistema nervioso entérico (ENS)
- Neurotransmisores
- Metabolitos neuroactivos (por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta, butirato)
- **Vía inmune:**
 - Citocinas
- **Vía neuroendocrina:**
 - Secreción de hormonas intestinales:
 - Péptido YY
 - Neuropeptido Y
 - Péptido similar al glucagón-1
 - Secreción de cortisol a través del eje HPA

La hipótesis de que la microbiota intestinal ha desarrollado mecanismos para manipular nuestro sistema de recompensa, induciéndonos a preferir alimentos que favorecen su supervivencia y evitando aquellos que resultan perjudiciales [90], es cada vez más evidente. De igual manera, se ha propuesto que las interacciones entre la microbiota y el cerebro constituyen un factor determinante en la evolución del cerebro social [91].

En los últimos años se ha producido un crecimiento exponencial en relación a publicaciones científicas referentes a la microbiota intestinal y a los mecanismos a través de los cuales cambios en su composición influirían directamente en la aparición de trastornos digestivos y extradigestivos. Estas observaciones han permitido investigar la directa interrelación entre la microbiota intestinal y el funcionamiento del eje microbiota intestinal-cerebro, constituyéndose en el tercer elemento de este complejo sistema. En este sentido, existen estudios que sugieren que algunas enfermedades neuropsiquiátricas parecen tener vinculación directa con estados de disbiosis intestinal, así como una mayor incidencia de trastornos digestivos [92, 93].

Por otra parte, se han publicado distintos ensayos que demuestran la influencia de la microbiota intestinal sobre el comportamiento cerebral, por ejemplo, en diferencias en la conducta de ratones convencionales y ratones libres de gérmenes que son sometidos a estrés [94].

Otros estudios demuestran que la implementación de cambios en la dieta, el uso de determinados antibióticos, el trasplante de microbiota fecal y la utilización de probióticos producen cambios en la química, el comportamiento y la actividad cerebral [95, 96].

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto que la suplementación con Se produce cambios en la microbiota intestinal aumentando las poblaciones de numerosas bacterias con efectos potencialmente beneficiosos para la salud (p. ej. lactobacillus genus) [97], también que modula los metabolitos producidos por la microbiota intestinal [98] y el metaboloma cerebral, así como el selenoproteoma [99] del plasma [97], testículos [100] y cerebro [99]. Asimismo, los estudios realizados sugieren que la exposición a “cócteles químicos” puede modular la microbiota intestinal [101]

El nervio vago, juega un papel fundamental en esta comunicación transmitiendo señales desde el intestino al cerebro y viceversa. Además, el sistema nervioso entérico, una compleja red neuronal presente en las paredes intestinales, regula las funciones locales del tracto gastrointestinal y se comunica con el SNC. Por otro lado, las hormonas producidas en el intestino, como la serotonina y el péptido YY, pueden influir en la función cerebral, regulando el apetito, el estado de ánimo y otras funciones cognitivas. Asimismo, el sistema inmunitario intestinal, al detectar patógenos o sustancias dañinas, libera citocinas que pueden atravesar la BHE y modular la respuesta inflamatoria en el cerebro.

La combinación de las líneas neuronales (vago) y hormonales (HPA) permiten que el cerebro influya en las actividades de las células efectoras funcionales intestinales, como las células inmunes, las células epiteliales, las neuronas entéricas, las células del músculo liso, las células intersticiales de Cajal y las células enterocromafines [102] y, estas células, están bajo la influencia de la microbiota intestinal. La microbiota intestinal tiene un impacto importante en el GBA interactuando no solo a nivel local con las células intestinales y el entérico, sino también influyendo directamente en los sistemas neuroendocrinos y metabólicos [103].

Los contaminantes neurotóxicos pueden dañar directamente las neuronas del nervio vago o interferir con la síntesis y liberación de neurotransmisores. Además, pueden alterar la permeabilidad de la BHE, permitiendo que sustancias tóxicas ingresen al cerebro y dañen las células cerebrales. Asimismo, los neurotóxicos pueden modular la respuesta inflamatoria inducida por las citocinas, contribuyendo a la neuroinflamación y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, ocurre con la EA, que parece estar asociada con este rol de inflamación mediado por microbiota. El cerebro es capaz de iniciar una respuesta inmune frente a diferentes detonantes, principalmente microorganismos patógenos que en determinadas circunstancias se mantienen de forma persistente generando un estado de inflamación crónica denominado “neuroinflamación”, que a su vez puede ser consecuencia de enfermedades neurodegenerativas como la EA [92, 104].

En resumen, la exposición a neurotóxicos puede interrumpir la crucial comunicación entre el intestino y el cerebro con consecuencias potencialmente devastadoras para la salud [105].

1.4.2. Comunicación microbiota intestinal-gónadas

La investigación interdisciplinaria en las últimas décadas ha revelado la profunda influencia de la microbiota intestinal en diversos aspectos de la salud humana. En este contexto, el eje microbiota-intestino-gónadas masculinas ha surgido como un nuevo paradigma, motivado en gran medida por la creciente prevalencia de trastornos reproductivos. A pesar de su reciente exploración, este eje promete ser un área fructífera para investigar las complejas interacciones entre la intestinal, el sistema endocrino y la función testicular.

La infertilidad masculina es un problema creciente en todo el mundo. Comprender la influencia de la microbiota intestinal en la función testicular se vuelve crucial para entender las causas subyacentes a esta bajada de fertilidad a nivel global y, también, podría aportar luz en otros factores como en la influencia sobre los cambios hormonales asociados con el envejecimiento masculino como la andropausia.

Previamente hemos puesto de manifiesto el papel de la microbiota intestinal regulando procesos inmunológicos, llegando a provocar procesos inflamatorios crónicos con un desbalance de citoquinas que afectan a la salud de todo el organismo, incluidos las funciones reproductoras.

Si bien el campo de la inmunología reproductiva continúa expandiéndose y la investigación sobre la influencia de la microbiota intestinal en la fertilidad masculina aún es emergente, existe una creciente evidencia que sustenta la relación entre ambos factores. De manera similar a su papel en la reproducción femenina, la microbiota intestinal modula la reproducción masculina a través de la regulación de las hormonas sexuales masculinas, la sensibilidad a la insulina, el sistema inmunitario y la microbiota testicular (Figura 6) [106].

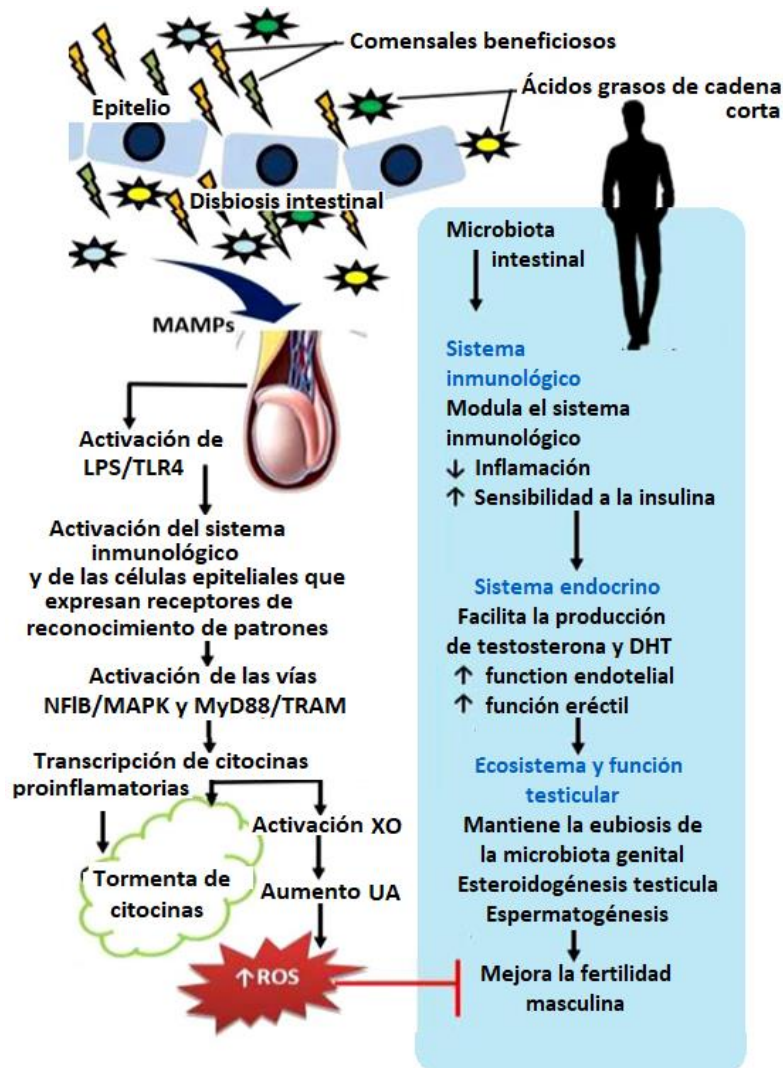


Figura 6. Efecto de la microbiota intestinal y la disbiosis en la función reproductiva masculina (adaptada de [106]).

La interrelación entre la testosterona y la microbiota intestinal constituye un sistema dinámico y complejo. La testosterona ejerce influencia sobre la composición y función de la microbiota intestinal al tiempo que, la microbiota intestinal modula la biosíntesis de testosterona. Estudios experimentales han evidenciado un retraso en el desarrollo de la barrera hemato-testicular en ratones libres de gérmenes, asociado a una disminución en la expresión de proteínas clave como E-cadherina, ocludina y ZO-2 en el testículo, lo que compromete la espermatogénesis y la fertilidad [107, 108]. La restauración de la microbiota intestinal mediante trasplante dio lugar a un incremento en los niveles circulantes de testosterona [109] subrayando el papel esencial de la microbiota intestinal en el desarrollo de la BHT, la espermatogénesis y la esteroidogénesis testicular.

La comunicación entre la microbiota intestinal y los testículos puede involucrar mecanismos adicionales a la inducción de un estado inflamatorio, tales como la permeabilidad intestinal y la activación inmunitaria. Algunos autores [110] han demostrado que la transferencia de microbiota fecal de ratones obesos a ratones control, indujo un incremento de *Bacteroides* y *Prevotella* desencadenando una respuesta inflamatoria local, endotoxemia y deterioro de la espermatogénesis. Estos hallazgos revelan una correlación negativa entre la viabilidad espermática y la abundancia de *Bacteroides* y *Prevotella* [110].

Por otro lado, el estudio de este eje de comunicación hormonal e inmunológico podría llevar al desarrollo de nuevas terapias para mejorar la fertilidad. Por ejemplo, conduciendo al uso de probióticos y prebióticos específicos para mejorar la salud reproductiva masculina, o desarrollando terapias personalizadas basadas en el perfil microbiano individual de cada paciente. En este sentido, se ha demostrado que la administración de *Lactobacillus rhamnosus* CECT8361 y *Bifidobacterium longum* CECT7347, provocó una disminución de la fragmentación del ADN espermático y un incremento de la motilidad espermática mediante la reducción de la generación de ROS [111].

La microbiota intestinal desempeña un papel modulador sobre los macrófagos testiculares. Los testículos, órganos caracterizados por un privilegio inmunológico, albergan macrófagos establecidos durante el desarrollo prenatal. La microbiota intestinal contribuye al mantenimiento de este microambiente inmunoprivilegiado mediante la estimulación de respuestas antiinflamatorias, como la activación del receptor similar al Toll 2 (TLR2), la producción de interleucina 10 (IL-10) y la modulación de los niveles de ácidos grasos de cadena corta y dihidrotestosterona [112].

En conclusión, existe un papel crucial de la microbiota intestinal en la regulación de la función reproductiva masculina. Asimismo, se reconoce la influencia de los contaminantes ambientales sobre la composición y función de la microbiota, así como su impacto directo en la salud reproductiva. En este contexto, la presente Tesis tiene entre sus objetivos profundizar en la compleja interacción entre la microbiota intestinal, los contaminantes ambientales y la fertilidad masculina, con el fin de aportar nuevos conocimientos que contribuyan al esclarecimiento de los mecanismos subyacentes y al desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas.

1.5. La enfermedad de Alzheimer (EA)

La EA supone la forma más habitual de demencia (60%-70%) afectando en la actualidad a más de 55 millones de personas en todo el mundo [113]. Dado el aumento de la esperanza de vida con los nuevos avances científicos y médicos, la prevalencia de la EA también incrementa considerando que el envejecimiento es su principal factor de riesgo. Entre otros factores a destacar están los asociados con la genética, el sexo femenino, la exposición a metales, las enfermedades cardiovasculares como la diabetes mellitus tipo II o el síndrome de Down, así como factores más conductuales (dieta, nivel educacional, actividad física) [114]. Esta enfermedad se describe como una proteopatía, es decir, una anomalía en el plegamiento de proteínas en el que el factor bioquímico tiene una notable relevancia en su aparición [115]. La atrofia neuronal de la EA comienza afectando principalmente a estructuras límbicas del lóbulo temporal medio implicadas

en la memoria y va extendiéndose hacia áreas corticales de asociación frontal, temporal y parietal.

La neurodegeneración de esta enfermedad se caracteriza por la pérdida sináptica que conlleva la atrofia neuronal progresiva por agregados o depósitos solubles. Estos depósitos dan lugar a la acumulación anormal de placas difusas y neuríticas y marañas neurofibrilares que obstaculizan la comunicación interneuronal.

Dentro de los biomarcadores más estudiados en la EA destacan el agregado conocido como oligómero de β -amiloide ($A\beta$) y la agregación de una hiperfosforilación descarriada de la proteína Tau en microtúbulos neuronales, que forman los Ovillos neurofibrilares (NFT). La Figura 7 describe la formación de agregados identificados como biomarcadores de la EA. El péptido amiloide β (PBA) se genera a través del procesamiento amiloidogénico (proteólisis regulada intramembranosa) de la proteína precursora del amiloide (APP). La γ -secretasa está formada por las presenilinas 1 y 2, la nicastrina, la APH-1 y PEN-2. La β -secretasa o BACE-1, proteasa aspártico-transmembrana, compite con la α -secretasa, encontrándose principalmente a nivel del Aparato de Golgi y los endosomas. La proteína τ en el axón favorece la estabilización de los microtúbulos neuronales que darán lugar a los NFT intracelulares durante la EA y, tras la muerte celular, permanecen en el espacio extracelular "ovillos fantasmas" [116, 117].

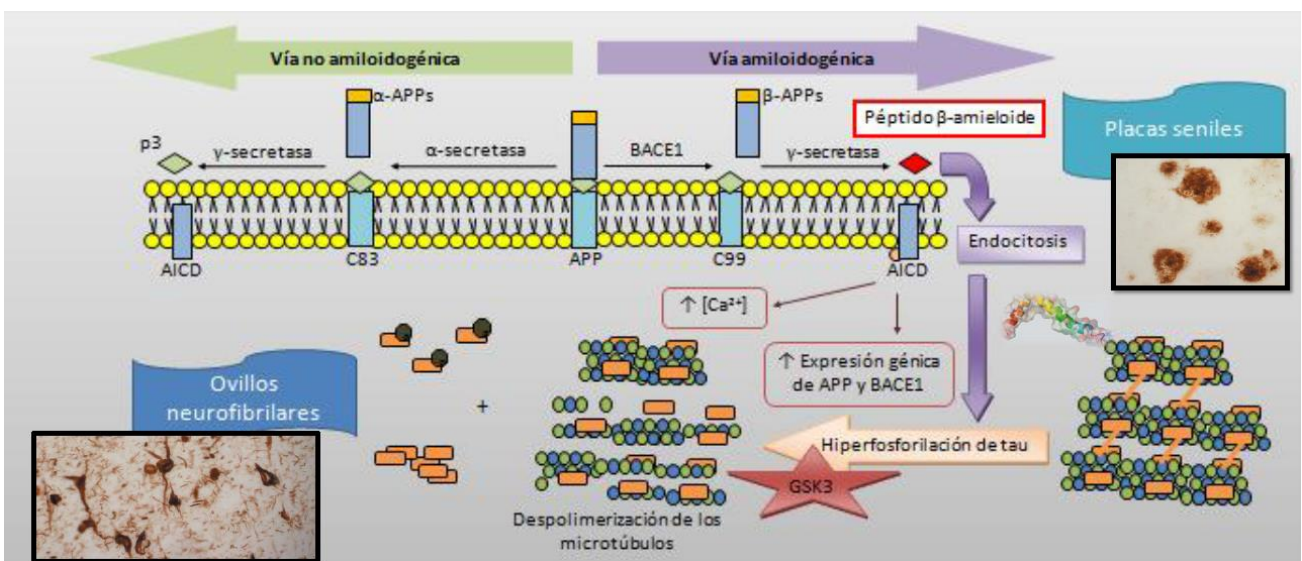


Figura 7. Formación de agregados identificados como biomarcadores de la Enfermedad de Alzheimer (EA).

La correcta actividad de la proteína Tau está determinada por el grado de fosforilación, siendo mediado por la acción equilibrada entre las quinasas y las fosfatasas que son responsables de la eliminación de sus grupos fosfato. Se conoce que en el caso de la EA está anormalmente hiperfosforilada [116].

No obstante, todavía debe estudiarse la implicación de estas dos proteínas A β y Tau en la EA, especialmente en sus conformaciones más neurotóxicas [118, 119]. Además, también juegan un importante papel en la clínica de la enfermedad la neuroinflamación o la vascularización alterada.

En la Figura 8 se muestran marcadores biológicos de alteraciones histopatológicas en la EA: placas seniles compuestas por acumulaciones del PBA, ovillos NFT formados por depósitos fibrilares de la proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau), neuroinflamación, disfunción sináptica y neurodegeneración [119]

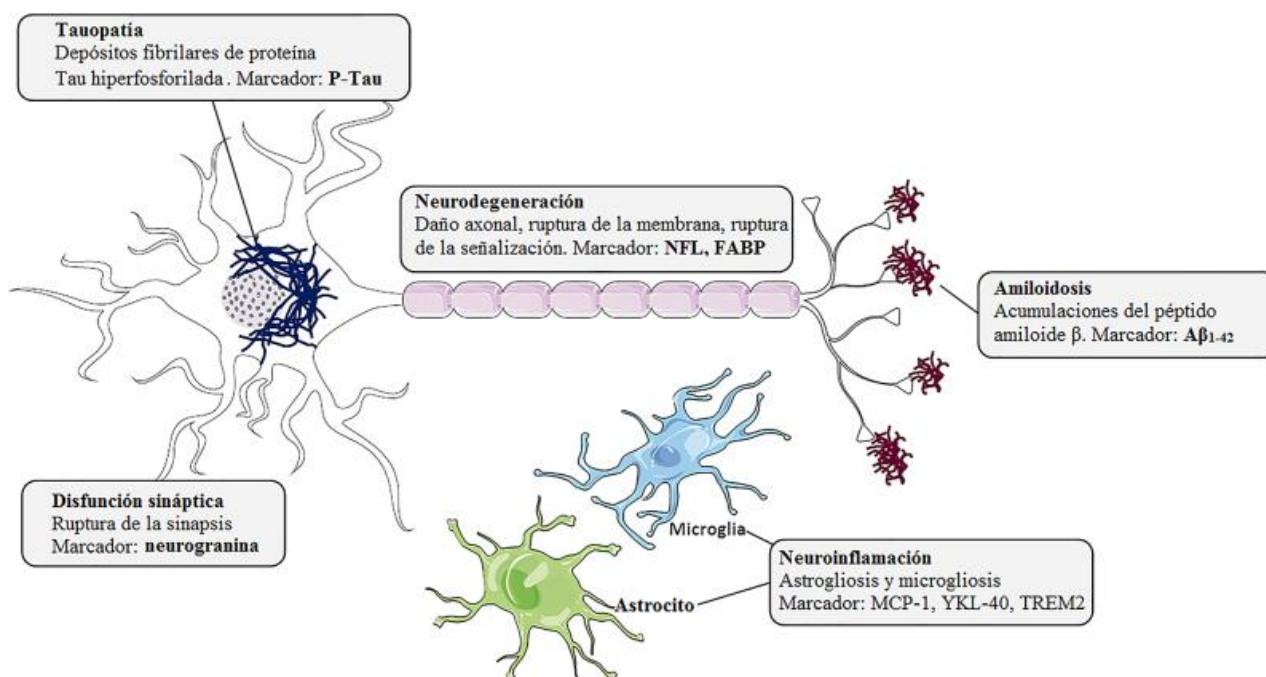


Figura 8. Marcadores biológicos de alteraciones histopatológicas en la Enfermedad de Alzheimer (EA) [119].

Algunos estudios sobre la neuroinflamación en la EA han determinado que desde la microglia se liberan al torrente sanguíneo citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, factor alfa de necrosis tumoral, o el factor de crecimiento beta. Estas citoquinas están correlacionadas con la aparición de PBA y con la disfunción sináptica responsable de los síntomas clínicos [86]. Sin embargo, otros autores han descrito que el mismo PBA puede promover e inducir la neuroinflamación, siendo causante de la enfermedad y no consecuencia de la misma [104, 120].

A lo largo de los años, se han propuesto diversas hipótesis para explicar el origen de la EA y su progresión. Resumimos a continuación las principales:

- *Hipótesis colinérgica*: Sugiere que la disminución del neurotransmisor clave acetilcolina (ACh) por alteraciones en su producción y degradación, contribuye a la aparición de los síntomas de la EA [121–125]. Aunque los inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) pueden mejorar temporalmente los síntomas, no detienen la progresión de la enfermedad.
- *Hipótesis de la cascada amiloide*: Es la hipótesis más aceptada y postula que la acumulación de la A β 42 en el cerebro es el evento inicial que desencadena la cascada de eventos patológicos que conducen a la EA [126–129]. Esta acumulación provoca la formación de A β y da lugar a una serie de alteraciones como la pérdida de sinapsis, disfunción mitocondrial y neuroinflamación.
- *Hipótesis de la p-tau*: La hiperfosforilación de la p-tau y la formación de NFT son eventos estrechamente relacionados con la cascada amiloide. La acumulación de tau interfiere con el transporte intracelular y contribuye a la muerte neuronal [130, 131].
- *Neuroinflamación*: La activación de las microglías y la liberación de moléculas inflamatorias juegan un papel crucial en la progresión de la EA. La A β 42 induce una respuesta inflamatoria que exagera el daño neuronal y la formación de NFT [132–134].

Estrés oxidativo: El desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas antioxidantes contribuye al daño neuronal y a la progresión de la EA [128, 135]. Es en el marco de estas últimas hipótesis donde se vislumbra un papel preponderante de los metales de transición. Dada su capacidad, redox, estos elementos podrían catalizar la formación y agregación de las fibras de A β 42 acelerando así el proceso neurodegenerativo. En particular, la "hipótesis del ion metálico" propone que la dishomeostasis de metales como Fe, Cu y Zn favorece la agregación de A β 42, desencadenando la cascada de eventos descritos en la hipótesis amiloide. Esta sinergia entre ambas hipótesis ofrece una visión más completa de los mecanismos moleculares subyacentes a la EA" [127, 136].

1.5.1. Criterios de diagnóstico de EA

Los criterios para el diagnóstico clínico de la EA han cambiado desde 1907, cuando se describió por primera vez como entidad con síntomas psiquiátricos con afección cognitiva [137]. Actualmente, los avances en neurociencias y los estudios sobre biomarcadores de EA han permitido el diagnóstico en estadio preclínico, así como la consideración de estadios más precoces de la enfermedad con menor deterioro cognitivo. De igual forma se han desviado los criterios neuropatológicos hacia la identificación del grado y distribución de las lesiones asociadas al proceso patológico subyacente, sin estar típicamente asociadas con el estado de impedimento neurológico en fase terminal [138, 139].

Los indicadores actuales de diagnóstico pueden dividirse en dos grupos. La primera categoría proporciona información sobre el tipo de patología presente. Incluye concentraciones en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de PBA 1–42, proteína Tau total y Tau fosforilada ($\rho\tau$) 181 y, la cantidad de depósito de A β mostrado por ciertos trazadores de tomografía por emisión de positrones (PET). La segunda categoría comprende la resonancia magnética estructural (MRI) y el metabolismo regional de la glucosa medido por PET con 18 F-fluoro-2-desoxi-glucosa (18 F-FDG). Ambos métodos muestran la topografía de los cambios [140–142].

No obstante, aún queda por investigar la bioquímica pormenorizada de estos biomarcadores y los mecanismos por los que, por ejemplo, niveles elevados de metales como Fe, Cu y Zn aumentan la neurotoxicidad del β A. Por otro lado, también hay que destacar que, aunque es posible que las A β y los depósitos neurofibrilares de tau no fueran causales en la patogénesis de la EA, son estos depósitos anormales de proteínas los que definen a la EA como una enfermedad neurodegenerativa única entre los diferentes trastornos de demencia.

1.5.2. Estadios de Braak en la EA

La progresión topográfica de las lesiones neurofibrilares de EA que conllevan a los crecientes deterioros y síntomas clínicos se describen en seis estadios de Braak (Figura 9), empezando con una larga *fase preclínica* asintomática y silenciosa (estadios I y II), seguida de una *fase prodrómica* (deterioro cognitivo leve, o MCI, del inglés mild cognitive impairment; estadios III y IV) y finalmente la *fase de demencia* con sintomatología severa (estadios V y VI).

Se describen a continuación las diferentes fases o estadios de Braak [114, 143]:

- *Estadio I:* Comienza el desarrollo de en la corteza perirrinal (región transentorrinal) y entorrinal del giro parahipocampal.
- *Estadio II:* Se produce inmunorreactividad adicional en la capa pre o capa II de la región entorrinal que se hunde gradualmente en una posición más profunda en la región transentorrinal. Las lesiones se extienden hacia la región CA1 del hipocampo.
- *Estadio III:* Acumulación de los ovillos en las regiones límbicas hacia el giro occipitotemporal lateralmente y el giro lingual posteriormente.
- *Estadio IV:* La afectación de la corteza de asociación sensorial de orden superior neocortical del lóbulo temporal se extiende ahora hasta el giro temporal medial. Sigue la extensión a la amígdala (A), tálamo y claustró.

- *Estadio V:* Los NFT se extienden por todas las áreas isocorticales, afectando más las áreas asociativas, pero también invaden en un grado leve las áreas de asociación sensorial premotora y de primer orden del neocórtex.
- *Estadio VI:* Extensión por todas las áreas neocorticales primarias y secundarias y en el lóbulo occipital, afectándolas gravemente, así como a las áreas motoras y visuales.

Esta neurodegeneración sigue un patrón de extensión creciente a nivel laminar en cada región (Figura 9), afectándose primero las capas superficiales [143].

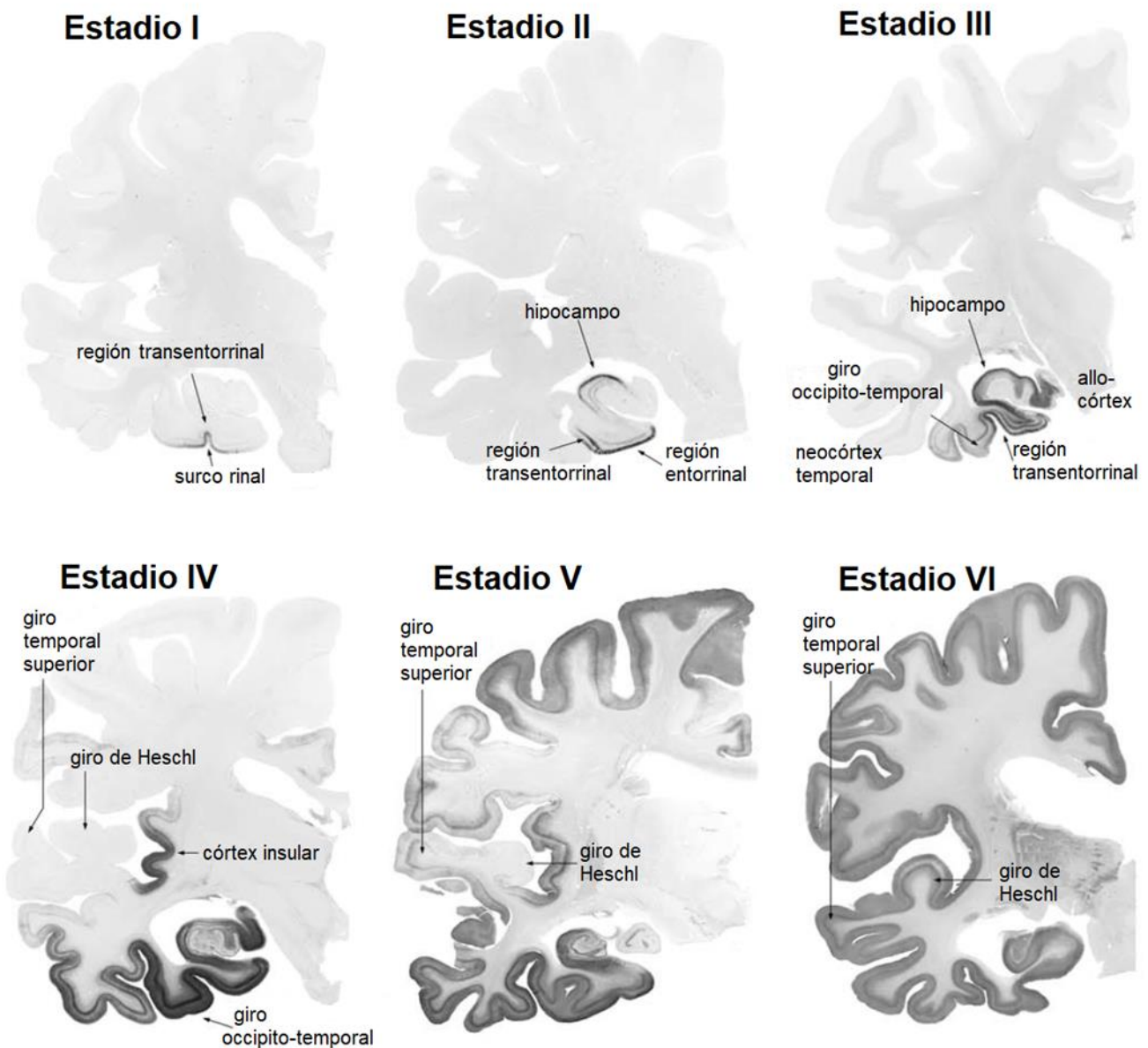


Figura 9. Progresión de los seis estadios de Braak en la Enfermedad de Alzheimer (EA) [143].

1.5.3. El papel de los elementos químicos en la EA

La acumulación excesiva de metales en el cerebro, especialmente en las regiones afectadas por la EA, se ha asociado con la formación de placas seniles y NFT [144]. Estudios in vitro e in vivo han demostrado que el hierro (Fe), el cobre (Cu) y el Zn actúan como catalizadores acelerando la agregación de PBA y favoreciendo la formación de fibrillas amiloides. La presencia de estos metales en concentraciones elevadas en el cerebro de pacientes con EA, especialmente Cu (5.7), Fe (2.8) y Zn (3.1), corrobora su papel en la patogénesis de la enfermedad [127, 135, 144–146].

Estos metales también pueden catalizar la fosforilación de tau acelerando el proceso neurodegenerativo [147]. Además, los metales pueden participar en la producción de ROS, lo que contribuye al daño oxidativo y la muerte neuronal.

La dishomeostasis de metales, es decir, el desequilibrio en sus concentraciones, puede tener efectos adversos sobre la función neuronal. Por ejemplo, la deficiencia de Se, esencial para la actividad de las selenoproteínas antioxidantes, se ha relacionado con el deterioro cognitivo y la EA [148, 149]. Por otro lado, el Se, un no metal con ciertas propiedades metaloides, constituye un componente esencial de las selenoproteínas. La deficiencia de Se puede dar lugar a cambios irreversibles en las células neuronales, lo que potencialmente conduce a un deterioro cognitivo y a la EA [148]. Se ha observado una correlación negativa entre el deterioro cognitivo, los niveles de selenio y la actividad de varias selenoproteínas en pacientes con EA [149].

Desde el reconocimiento de la desregulación de los iones metálicos con actividad redox como un factor patogénico y un objetivo en enfermedades neurodegenerativas como la EA, se ha investigado a la generación de agentes quelantes de metales con funcionalidades adicionales que pueden interactuar con otras dianas terapéuticas de la EA en un enfoque multidiana. En general, los efectos multifuncionales de estos híbridos quelantes de metales sugieren que algunos son compuestos prometedores como fármacos líderes para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer [150].

Por otro lado, la sobrecarga de metales tóxicos como el aluminio (Al), As, Cd, Pb y manganeso (Mn) puede aumentar el riesgo de neurodegeneración debido a sus efectos tóxicos sobre las células neuronales [151–154].

En esta Tesis Doctoral se describe la potencial relación entre el metaloma cerebral humano en diferentes regiones cerebrales de pacientes post-mortem con EA y los estadios Braak, destacando que los metales de transición son factores de riesgo importantes para esta enfermedad y su regulación es esencial para mantener la salud neuronal. La comprensión del papel de los metales en la patogénesis de la EA puede abrir nuevas vías para el desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas.

Para el estudio pormenorizado de los aspectos nucleares mencionados hasta ahora, son imprescindibles las metodologías ómicas y técnicas analíticas cualitativas y cuantitativas que se tratan en las siguientes secciones.

1.6. Análisis y técnicas con espectrometría de masas

Desde que Francis William Aston desarrolló en 1919 el primer espectrómetro de masas, recibiendo el Nobel de Química en 1922 por su descubrimiento de 212 de los 287 isótopos naturales no radiactivos mediante esta técnica [155], la espectrometría de masas (MS) ha evolucionado en la creación de una compleja gama de variantes e instrumentos que han sido impulsados por un número cada vez mayor de aplicaciones de este tipo de medio analítico en ciencia y tecnología.

La MS se confiere como una potente técnica analítica cualitativa y cuantitativa que permite identificar y cuantificar una amplia gama de analitos tanto orgánicos como inorgánicos, incluyendo biomoléculas de hasta 100 kDa (100,000 amu.) [156].

En síntesis, el espectrómetro de masas presenta tres elementos básicos (Figura 10): una fuente de iones, un analizador de los haces de iones según su relación masa-carga y, finalmente, un detector capaz de medir, amplificar y registrar las corrientes de los haces [157, 158].

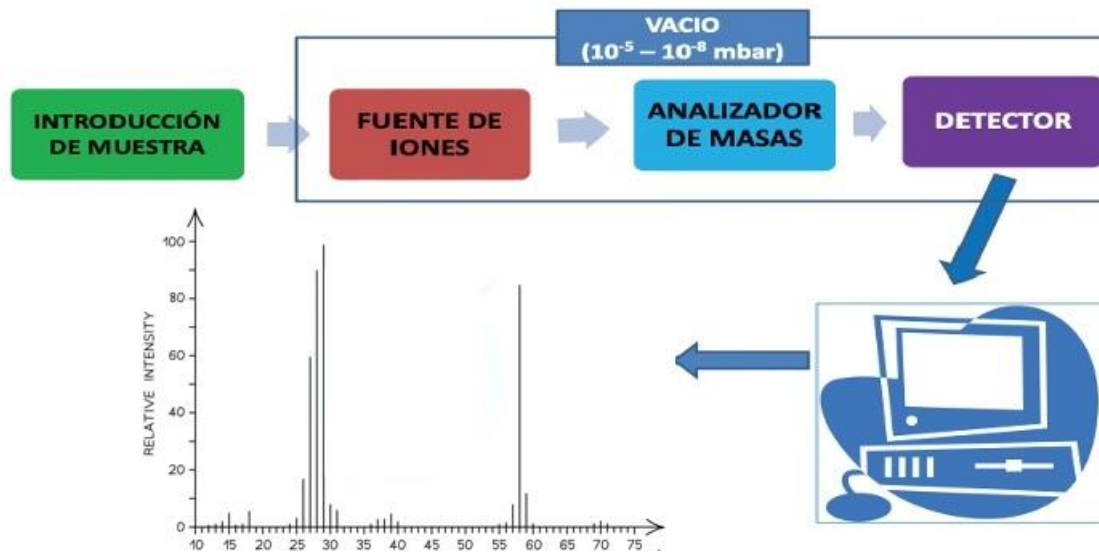


Figura 10: Etapas del análisis de la espectrometría de masas y espectrómetro de masas (adaptada de [159]).

En la Figura 11 observamos un esquema que representa el flujo de una muestra gaseosa que primero se ioniza mediante un haz de electrones. Los iones positivos son acelerados por un campo eléctrico haciendo que haces de iones de distinta relación carga-masa lleguen a puntos diferentes del detector y, en función de la intensidad de las señales que dejan, se determina la abundancia relativa de cada tipo [160].

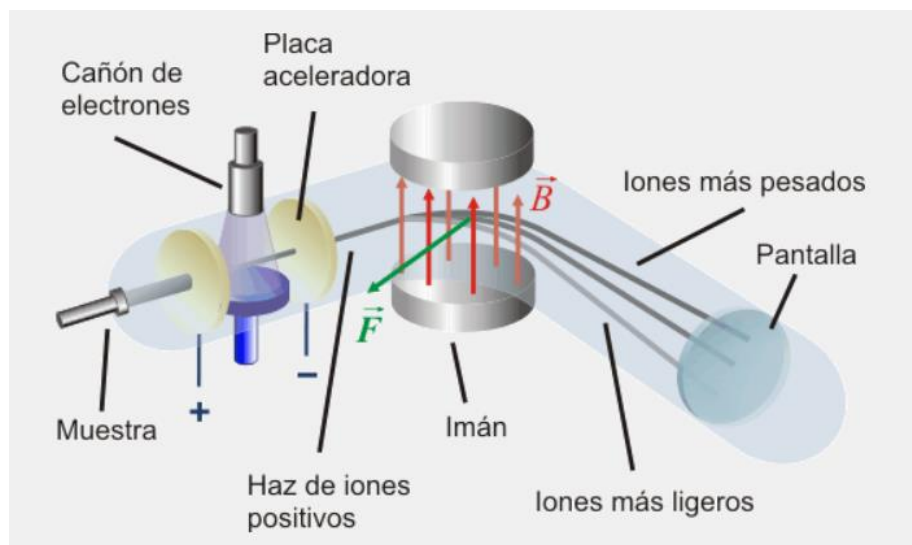


Figura 11. Esquema de funcionamiento de un espectrómetro de masas.

El resultado de aplicar una fuente de ionización sobre una molécula da lugar a la formación de iones (generados por exceso o pérdida de electrones) por lo que dichas moléculas estarán cargadas eléctricamente [161].

1.6.1. Tratamiento de la muestra y técnicas de separación de analitos para el análisis por MS.

Para el éxito de la MS es fundamental la preparación de la muestra, especialmente, cuando se trabaja con matrices complejas como las habituales en la química clínica. La preparación de la muestra suele implicar uno o más de los siguientes pasos [162]:

1. Precipitación de proteínas seguida de centrifugación o filtración: Tiene como objetivo principal eliminar las proteínas de una muestra biológica ya que estas pueden interferir en la detección y cuantificación de los metabolitos[163].
2. Extracción en fase sólida: Esta técnica se basa en la interacción entre los analitos y una fase estacionaria sólida contenida en una columna o cartucho. Esta fase estacionaria está compuesta por partículas sólidas con propiedades químicas específicas que permiten la retención selectiva de los compuestos de interés [156].
3. Extracción líquido-líquido: Consiste en la separación de compuestos entre dos fases líquidas inmiscibles, generalmente una acuosa y otra orgánica. Se procede mezclando las dos fases, para que los compuestos presentes en la muestra se distribuyen entre las dos fases de acuerdo con sus solubilidades relativas. Y finalmente se separan las dos fases generalmente por gravedad y se recuperan los analitos de la fase de interés [164].
4. Enriquecimiento por afinidad: La extracción por afinidad aprovecha la interacción específica entre un analito de interés y una molécula de reconocimiento llamado ligando. Para ello se inmoviliza el ligando, se le hace interactuar con el analito para retenerlo, seguido de un lavado para eliminar sustancias no unidas y finalmente se eluye el analito de interés utilizando un solvente o una condición que rompe la interacción ligando-analito [165].

5. Derivatización: Proceso de modificación química de los compuestos objetivo para facilitar el análisis mediante MS. Suele implicar la adición de algún grupo funcional bien definido. Los objetivos de la derivatización varían dependiendo de la aplicación pero normalmente incluyen: mayor volatilidad, mayor estabilidad térmica, propiedades cromatográficas modificadas, mayor eficiencia de ionización, propiedades de fragmentación favorables, o una combinación de estas [166–168].

Además, para la separación de analitos suelen emplearse procedimientos basados en cromatografía. La cromatografía supone un método de separación en el que los componentes que se han de separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria, F.E.) mientras que la otra (fase móvil, F.M.) se mueve en una dirección definida. Dentro de los diferentes tipos de cromatografía, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC) son las técnicas de separación más ampliamente usadas previas a la espectrometría de masas) [169].

La GC separa los componentes de una mezcla de gases y filtra el paso de estas moléculas en función de características físicas como la forma, el tamaño, el peso molecular y el punto de ebullición. La muestra a analizar se diluye y se vaporiza en el cromatógrafo, donde se separa según la volatilidad y características de los analitos. Después de la separación, los gases entran en el espectrómetro de masas para su análisis. Cabe destacar que una muestra para GC debe ser volátil, lo que significa que debe entrar en la fase gaseosa para que no se descomponga mientras está en el espectrómetro de masas [170].

Por otro lado, en la LC los analitos son separados en función de las interacciones con las fases móvil y estacionaria. Esto puede basarse en diferentes propiedades como la diferencia de polaridad de los analitos, la masa o la afinidad.

1.6.2. Fuentes de ionización en MS

1.6.2.1. Fuentes de ionización en espectrometría de masas.

Las fuentes de ionización más comunes en cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) son la fuente de ionización por electroespray (ESI) y la de ionización química a presión atmosférica (APCI). La ESI es una técnica suave de ionización que permite analizar moléculas grandes y polares como proteínas, péptidos y biomoléculas. A diferencia de la ionización por EI, que fragmenta las moléculas, la ESI produce iones moleculares casi intactos, lo que la convierte en una herramienta muy útil en proteómica, metabolómica y análisis de biomoléculas.

En el caso de la ESI, la muestra se encuentra disuelta en un solvente orgánico y es inyectada a través de un capilar. La diferencia de potencial se genera porque existe un electrodo en contacto con el capilar, mientras que el otro electrodo se sitúa en el detector del espectrómetro. Cuando la muestra sale del capilar se genera una nube de pequeñas gotas cargadas que da lugar a los iones en fase gaseosa. Con esta tecnología, aplicando una diferencia de potencial positiva o negativa se pueden generar cationes o aniones [171].

El proceso comienza cuando se introduce la muestra en disolución en un capilar al que se aplica un alto voltaje. En la punta del capilar se forma un menisco líquido cargado eléctricamente y, a medida que aumenta el voltaje el menisco se deforma y forma un cono, conocido como cono de Taylor. Al alcanzar un cierto valor de voltaje, el cono se rompe y se forma un fino spray de gotitas cargadas. Las gotitas cargadas se evaporan rápidamente, lo que conduce a un aumento de la carga superficial y a una disminución del tamaño de las gotitas. Finalmente, las gotitas se desolvatan por completo dejando atrás iones moleculares o multiméricos.

La APCI es otra técnica de ionización suave que mantiene la estructura de las moléculas casi intacta, pero el rango de moléculas es complementario al ESI siendo más eficiente para compuestos menos polares y volátiles. El proceso comienza con una nebulización en la que se crean pequeñas gotas del solvente con la fase móvil y el analito, que entran en un vaporizador. El vaporizador es un tubo cerámico aislado que al calentarse evapora

las gotas de aerosol de la fase móvil por radiación térmica. Un electrodo genera iones que reaccionan con las moléculas de disolvente formando iones reactivos que, a su vez, reaccionan con las del analito por transferencia de protones. Como contrapartida y dada la temperatura del vaporizador, los analitos deben ser térmicamente estables [172].

En cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la fuente EI es una de las técnicas más antiguas y ampliamente utilizadas. Su principio de funcionamiento se basa en la interacción de una molécula con un filamento de alta energía. En el proceso se calienta un filamento metálico hasta incandescencia, generalmente de wolframio, provocando la emisión de electrones por efecto termoiónico. Los electrones emitidos son acelerados hacia una región de la fuente de iones donde se encuentra la muestra. Cuando un electrón de alta energía choca con una molécula de la muestra, puede transferir suficiente energía para arrancar uno o más electrones de la molécula, formando así un ion molecular radical. La energía transferida en la colisión también puede romper enlaces químicos en la molécula generando fragmentos iónicos más pequeños que proporcionan información estructural valiosa sobre la molécula original. Finalmente, los iones generados son extraídos de la fuente de iones hacia el analizador de masas por medio de campos eléctricos (Figura 12 A). Proporciona espectros de masas con pautas de fragmentación reproducibles permitiendo su comparación con las librerías de espectros comerciales.

La fuente de ionización CI para GC-MS es una técnica de ionización que se basa en la transferencia de la energía de un haz de electrones hacia un gas de reacción y este gas de reacción interactuará con las moléculas de muestra, las colisiones entre ambos darán lugar a una transferencia de protones que dejarán nuestro compuesto cargado positivamente. Esta técnica es conveniente para ionizar compuestos polares no termolábiles dado que no produce una alta fragmentación, ni expone a los compuestos a una alta temperatura, sino que esa parte de la ionización la sufre el gas de reacción en lugar de los analitos. Es también una buena fuente de ionización para mezclas a razón que al generar pocos fragmentos las mezclas son más limpias. También tiene la capacidad de aportarnos información estructural aunque cabe destacar que, con el tiempo, diferentes versiones aparecieron permitiendo la ionización química negativa. La interpretación de los espectros de masas obtenidos es más compleja, no siendo posible

la comparación con librerías de espectros comerciales. La Figura 12 muestra el funcionamiento de estas diferentes fuentes de ionización.

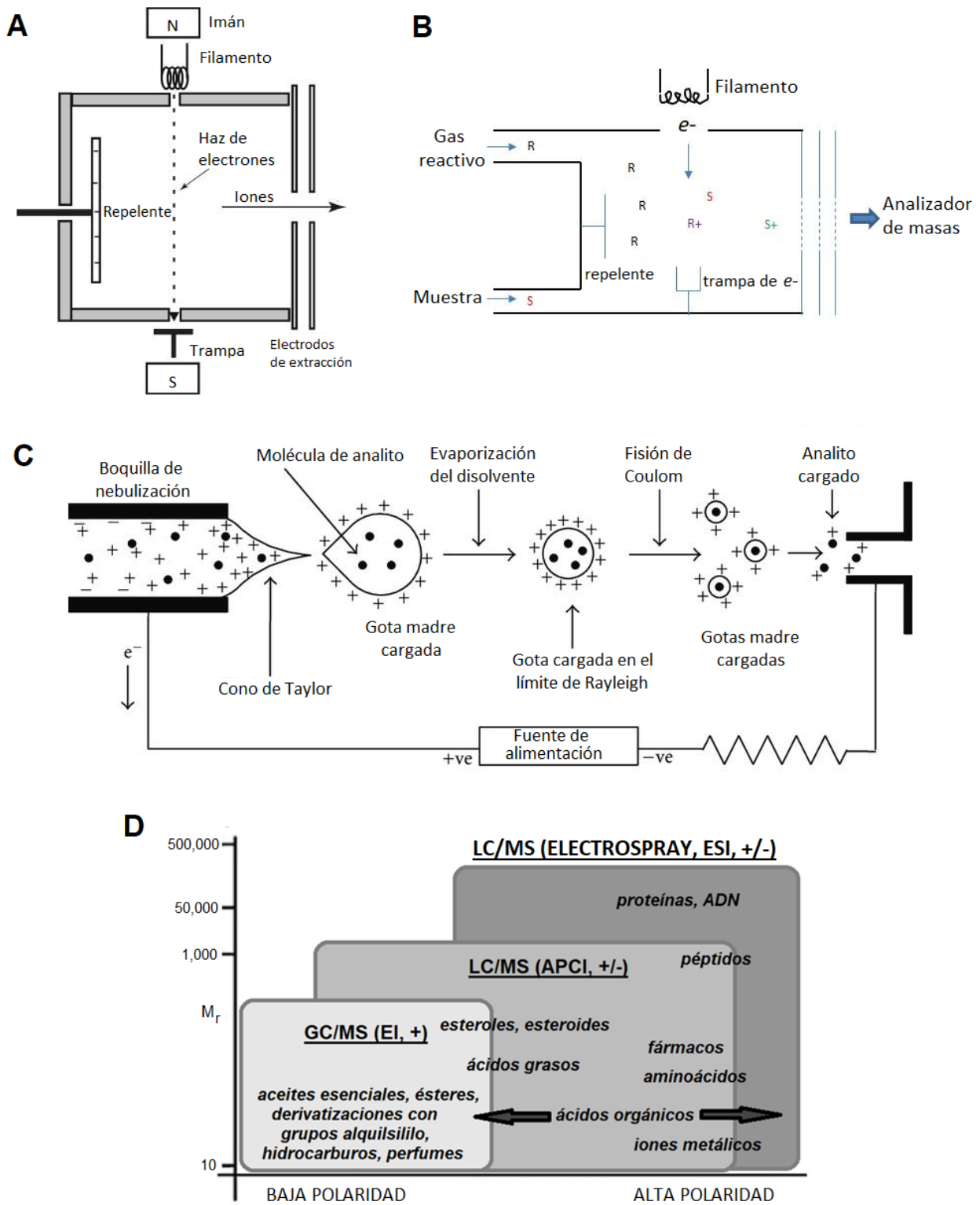


Figura 12. Diferentes fuentes de ionización: A) ionización electrónica (EI), B) ionización química (CI), C) ionización por electroespray (ESI) y D) Comparativa entre las diferentes fuentes.

1.6.2.2. Fuentes de atomización-ionización en espectrometría de masas inorgánicas: *el plasma de acoplamiento inductivo (ICP)*

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP por sus siglas en inglés, Inductively Coupled Plasma) es considerado una de las técnicas de ionización más energéticas capaz de atomizar completamente la mayor cantidad de moléculas en una muestra. Para ello, se utiliza un plasma de argón que produce principalmente iones monopositivos de los elementos químicos presentes en la muestra, siendo por lo tanto especialmente útil para análisis elementales [173].

Uno de los componentes más importantes del ICP es la antorcha. En la antorcha se genera el plasma, formando un gas ionizado y caliente que rompe e ioniza las moléculas. La antorcha consiste en 3 tubos concéntricos de cuarzo que se colocan en una bobina de inducción enfriada por agua (generalmente de cobre) conectada a un generador de radiofrecuencia. Por el tubo interior circula la muestra nebulizada, por el tubo intermedio circula un gas auxiliar que podrá usarse para controlar la formación de aductos y, por el tubo exterior circula un gas de argón de alta pureza. El plasma es conseguido gracias a el generador de radiofrecuencia que genera una corriente de radiofrecuencia alterna, normalmente entre 27 y 50 MHz, a través de la bobina de inducción de cobre refrigerada por agua. Tras una chispa proveniente de una bobina tesla, el gas se ioniza y se vuelve conductor, en ese momento los campos magnéticos oscilantes generan corriente eléctrica en el gas argón que tiene una resistencia interna a los cambios en al campo magnético y la "turbulencia" en el interior de la antorcha es lo que da lugar a la generación de temperaturas superiores a los 5000 K conduciendo a la excitación de los átomos introducidos en el plasma. La Figura 13 muestra un esquema del diseño básico de una antorcha de ICP y el proceso de ionización [174].

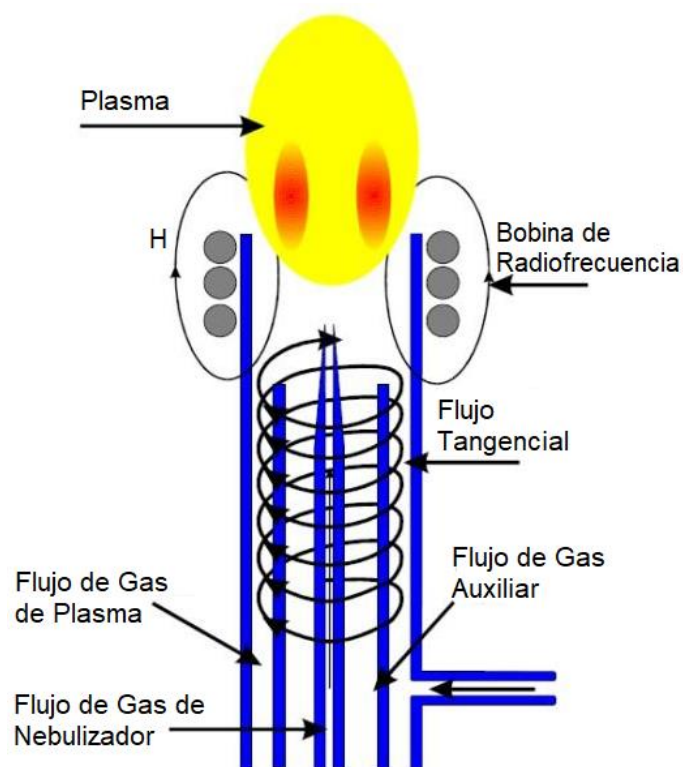


Figura 13: Ionización por plasma de acoplamiento inductivo [175].

1.6.3. Analizadores de masas en MS

Los espectrómetros de masas separan los compuestos en función de la relación masa/carga (m/z), donde m es la masa molecular del ion (en daltons) y z es el número de cargas presentes en la molécula que se mide [176]. Dicha separación de iones según su masa se obtiene mediante campos magnéticos estáticos, campos eléctricos que varían con el tiempo, o métodos que miden la velocidad de iones que tienen la misma energía cinética. Los campos eléctricos estáticos no pueden separar iones por su masa, pero sí los separan por su energía, proporcionando un importante elemento de diseño al funcionar como un filtro de energía. Entre los analizadores de masas más comunes encontramos el tiempo de vuelo (TOF), la trampa de iones y el cuadrupolo, sobre los que profundizamos a continuación [157].

El TOF (Figura 14) es un analizador de masas que únicamente depende de las velocidades que alcanzan los iones con diferentes masas que poseen la misma energía cinética. La

fuente de iones que suele acoplarse al TOF es generalmente de ESI y tiene uno o más electrodos modulados para extraer iones durante un tiempo breve en comparación con el tiempo que tardan en llegar al detector.

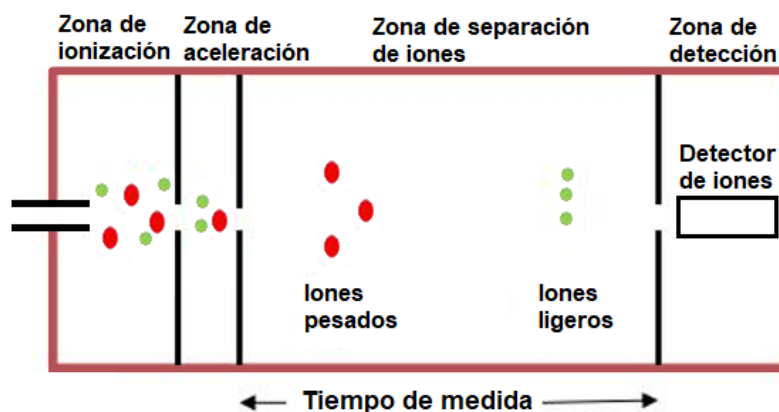


Figura 14: Esquema de un analizador de masas Tiempo de vuelo (TOF).

Para comprender el movimiento de los iones dentro del TOF hay que conocer que los iones de masa m y carga z se mueven en el vacío con una velocidad v en una dirección perpendicular a un campo magnético B y con una trayectoria circular de radio r siguiendo la fórmula: $r = mv/Bz$.

Si todos los iones de carga z entran en el campo magnético con una energía cinética zV , debido a su aceleración a través de una caída de voltaje V , la velocidad v estará asociada a cada masa donde el radio dependerá según la ecuación: $zV = \frac{1}{2} mv^2$.

De esta forma, las velocidades de los iones se relacionan según la fórmula: $v = \sqrt{2zV/m}$ y la distancia entre la fuente y el detector permiten calcular la masa directamente. En la práctica, la respuesta del detector se muestra en un oscilógrafo de rayos catódicos y se registra mediante un ordenador. Este método tiene las ventajas de ser rápido y poder mostrar el espectro de masas completo. Entre las desventajas más comunes se encuentra la mala resolución, la poca precisión de la señal y eficiencia debido al corto período durante el cual se extraen los iones de la fuente.

El analizador de masas de trampa de iones (IT) (Figura 15) permite el confinamiento de iones dentro de una pequeña cámara mediante el uso de campos eléctricos (Paul trap o ión trap, Orbitrap) o magnéticos (analizador de resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier, FT-ICR), con lo que se permite así almacenar, seleccionar y analizar los iones formados en la misma trampa o en fuentes de ionización externas. Los iones pueden mantenerse en el interior de la trampa durante largos tiempos posibilitar el estudio de descomposiciones metaestables o de fragmentos producidos por colisión con moléculas de gas. Los iones fragmentados de este modo pueden ser a su vez seleccionados y fragmentados de nuevo en la misma trampa por lo que el sistema puede obrar como un sistema de espectrometría de masas en tándem. Además, la trampa permite aislar iones individuales que, mediante la aplicación de un voltaje de radiofrecuencia a las tapas laterales, es fragmentado por disociación inducida por colisión con moléculas de Helio introducidas en la trampa.

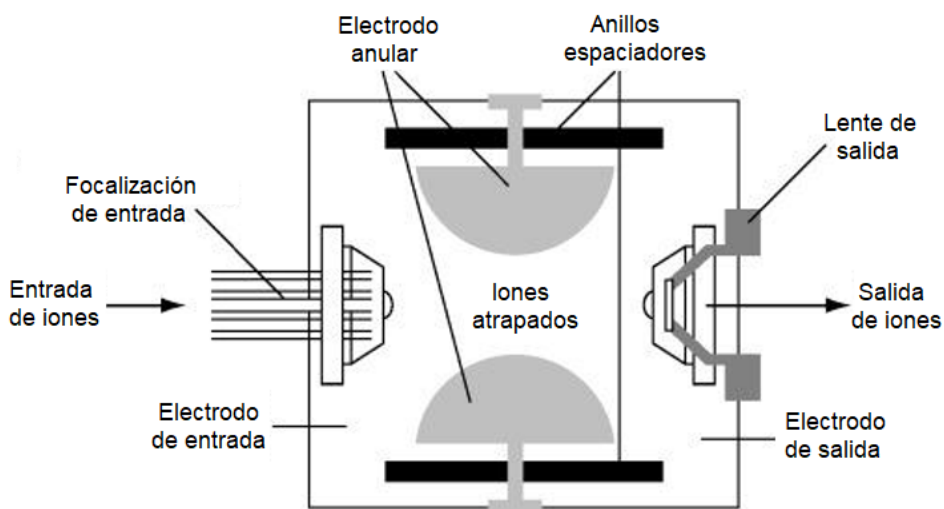


Figura 15: Esquema de analizador de masas de trampa de iones.

Por último, el analizador cuadrupolar consta de cuatro electrodos cilíndricos paralelos al flujo de los iones, como se muestra en la Figura 16.

Los potenciales estáticos generan una fuerza de enfoque a lo largo del eje x, y una de desenfoque en la dirección z. Si uno superpone un voltaje de radiofrecuencia sobre el voltaje estático, se pueden encontrar trayectorias de iones oscilatorias que permiten

que los iones de una masa dada pasen a través del cuadrupolo, mientras que otras masas se desenfocan y se pierden del haz. Este analizador presenta ventajas como su bajo coste, su alta velocidad de barrido y su manejo sencillo. Sin embargo, presenta desventajas como su bajo poder de resolución y su baja transmisión de grandes masas.

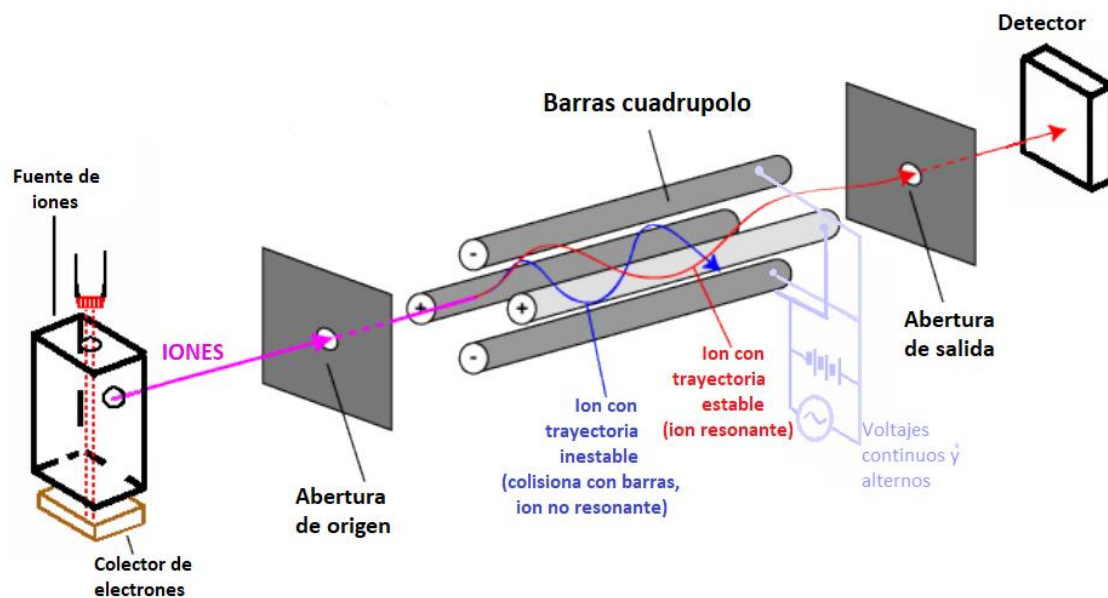


Figura 16. Esquema de un espectrómetro de masas cuadrupolo (adaptada de [177]).

Además, instrumentalmente pueden combinarse varios analizadores para obtener un analizador híbrido en una sola plataforma. La idea detrás de esta hibridación es aprovechar las fortalezas de cada técnica para superar sus limitaciones individuales y obtener resultados más precisos y detallados.

Uno de los analizadores híbridos más utilizados en la actualidad es el (QTOF), que Combina la alta resolución de masa del tiempo de vuelo (TOF) con la capacidad de selección de iones del cuadrupolo. En su funcionamiento los iones generados son introducidos en un cuadrupolo que actúa como un filtro de masa. Solo los iones con una relación masa/carga específica pueden pasar a través del cuadrupolo hacia el tiempo de vuelo, donde los iones seleccionados por el cuadrupolo entran en una región de campo libre donde son acelerados.

El tiempo que tardan los iones en recorrer esta distancia es proporcional a su relación masa/carga. Los iones llegan a un detector generando una señal que se convierte en un espectro de masas. Esto permite aislar en el cuadrupolo un ion precursor específico de interés de una mezcla compleja, asegurando que solo este ion se fragmente en la siguiente etapa y así obtener patrones de fragmentación específicos y muy útiles para la identificación de compuestos.

1.7. Metodologías Ómicas

Las ciencias ómicas representan un conjunto de disciplinas que estudian a gran escala los componentes moleculares de los sistemas biológicos. El sufijo "-oma", de origen griego, significa "conjunto, aglomeración o estructura biológica". Gracias a los avances tecnológicos es posible analizar de manera masiva y detallada estos conjuntos moleculares proporcionándonos una visión sin precedentes de la complejidad de los procesos biológicos.

Las ciencias ómicas se subdividen en cuatro grandes áreas principales según su objetivo de estudio (Figura 17): la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. La genómica se centra en el análisis del genoma completo revelando la potencialidad genética de un organismo. La transcriptómica estudia el transcriptoma, es decir, el conjunto de ARN mensajeros, proporcionando una visión de los procesos celulares que están a punto de ocurrir. La proteómica se enfoca en el proteoma que comprende el conjunto de proteínas, moléculas ejecutoras de las funciones celulares. Finalmente, la metabolómica analiza el metaboloma y por tanto el conjunto de metabolitos, es decir, moléculas de menos de 1.500 Da, reflejando el estado metabólico actual del organismo y los cambios que ya han ocurrido [178, 179].

Otra disciplina entre las ómicas es la metalómica, cuyo objeto de estudio son los metales en sistemas biológicos. A través de técnicas analíticas altamente sensibles y específicas esta ciencia busca identificar, cuantificar y caracterizar las interacciones entre los metales y las biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. La

metalómica no solo se limita a determinar la concentración de metales en un organismo, sino que también explora su distribución subcelular, su estado de oxidación y sus funciones biológicas [180, 181]. Este campo de estudio ha cobrado una importancia creciente debido al reconocimiento del papel esencial que desempeñan los metales en numerosos procesos biológicos, desde la catálisis enzimática hasta la señalización celular. Sin embargo, un desequilibrio en la homeostasis metálica puede conducir a diversas patologías, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cáncer y trastornos metabólicos.

Por otra parte, la metataxonómica es la herramienta principal para estudiar la composición y dinámica de las comunidades microbianas. Analiza datos de secuenciación de alto rendimiento como el ARNr 16S, para identificar microorganismos y virus en muestras complejas. Esta técnica es fundamental para comprender las interacciones entre los microorganismos y su entorno.

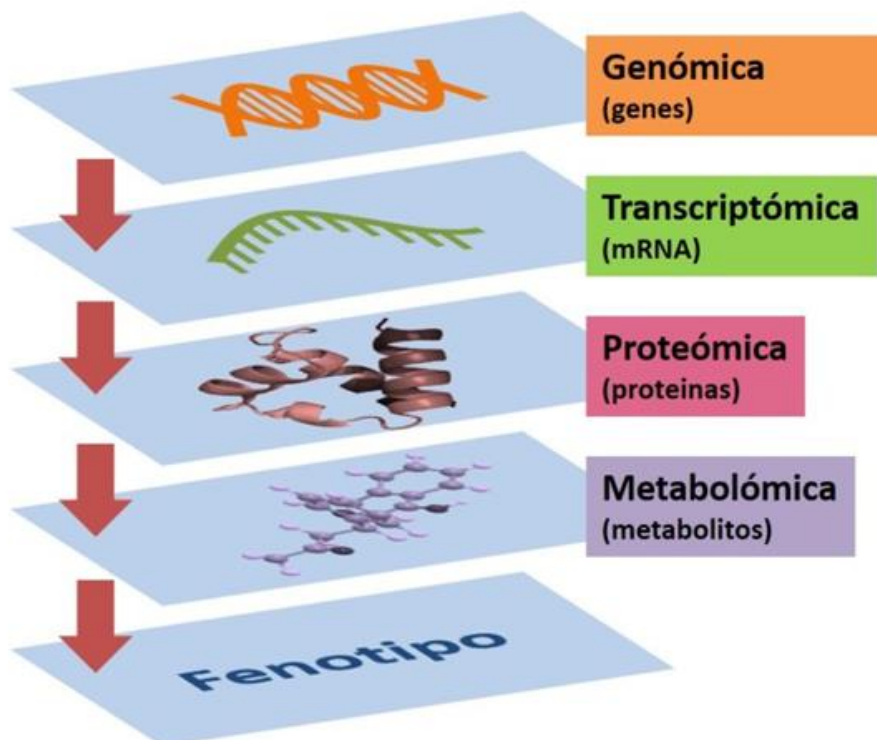


Figura 17. Estudios ómicos convencionales en biología (adaptada de [179]).

Esta secuencia, desde la información genética hasta los productos finales del metabolismo, se representa en una cascada en la que cada nivel proporciona una perspectiva diferente sobre los procesos biológicos [1]. La genómica estructural nos indica "lo que puede suceder", mientras que la transcriptómica sugiere "lo que parece que va a suceder", la proteómica revela "lo que hace que suceda" y la metabolómica nos muestra "lo que ha sucedido". Esta información integral es fundamental para la identificación de biomarcadores, la comprensión de enfermedades y el desarrollo de estrategias para mejorar la salud humana y el medio ambiente.

Las ciencias ómicas han revolucionado nuestra comprensión de la biología, permitiendo abordar preguntas fundamentales sobre la salud, la enfermedad y la vida en general. Al proporcionar una visión global de los sistemas biológicos, estas disciplinas abren nuevas y emocionantes posibilidades para la investigación y la innovación, como la medicina personalizada, revolucionando la producción de fármacos al encontrar nuevos objetivos terapéuticos, comprendiendo el efecto de los contaminantes sobre los organismos vivos.

Cada técnica ómica constituye un pilar fundamental en el entendimiento de los sistemas biológicos, complementándose mutuamente en la generación de conocimiento. En esta Tesis Doctoral, nos centraremos principalmente en la metabolómica, aunque es importante reconocer la interconexión entre todas estas ciencias ómicas y su contribución a una visión holística de los sistemas biológicos. La metabolómica, en particular, destaca por su estrecha relación con el fenotipo, reflejando de manera dinámica los procesos bioquímicos celulares a través del análisis de metabolitos. A diferencia de otras ómicas, el metaboloma es considerado el fenotipo molecular, facilitando la correlación con estados fisiológicos y patológicos [179].

1.7.1. La metabolómica

La metabolómica es la ciencia ómica que se dedica al estudio sistemático del metaboloma, es decir, el conjunto completo de metabolitos presentes en un sistema biológico. Mediante técnicas analíticas de alta resolución como la espectrometría de

masas, se puede analizar y obtener el perfil metabólico que refleja el estado fisiológico de un organismo y sus respuestas a estímulos internos y externos. La metabolómica permite identificar biomarcadores, elucidar vías metabólicas y comprender la compleja red de interacciones moleculares que subyacen a los procesos biológicos. [182, 183].

No obstante, la implementación de estudios metabolómicos requiere una meticulosa consideración de variables confusas para optimizar la obtención de información relevante. Asimismo, la asignación de identidad a los biomarcadores metabolómicos representa todavía un desafío [184].

El metaboloma constituye un sistema altamente dinámico influenciado por factores genéticos, ambientales y microbiológicos y, también variaciones sutiles interindividuales, pueden provocar alteraciones significativas en el perfil metabólico. Los factores ambientales como la dieta, el estrés y la exposición a xenobióticos, así como la variación genética, modulan el metaboloma. Además, la microbiota intestinal desempeña un papel crucial en la metabolización de compuestos endógenos y exógenos, impactando así en el perfil metabólico global [185–190].

Para estudiar el metaboloma es preciso seguir un flujo de trabajo conciso con un diseño experimental sólido dado que hay que asegurar una cobertura lo más amplia posible de metabolitos sin comprometer la fiabilidad y consistencia de los resultados.

Para ello generalmente se siguen una serie de etapas resumidas en la Figura 18, en el que primero se plantea una cuestión a abordar, se diseña el estudio para responder a dicha pregunta y se extraen los metabolitos de las muestras biológicas mediante un protocolo minucioso, siendo este uno de los pasos claves, se continúa con un análisis dirigido o no dirigido donde se optimiza para la adquisición de los iones por parte del detector, estos datos necesitan ser procesados dada la enorme cantidad de información generada por lo que se filtra estadísticamente aquella que es relevante, finalmente, los resultados son interpretados y validados para su posterior uso por parte de la comunidad científica [191].

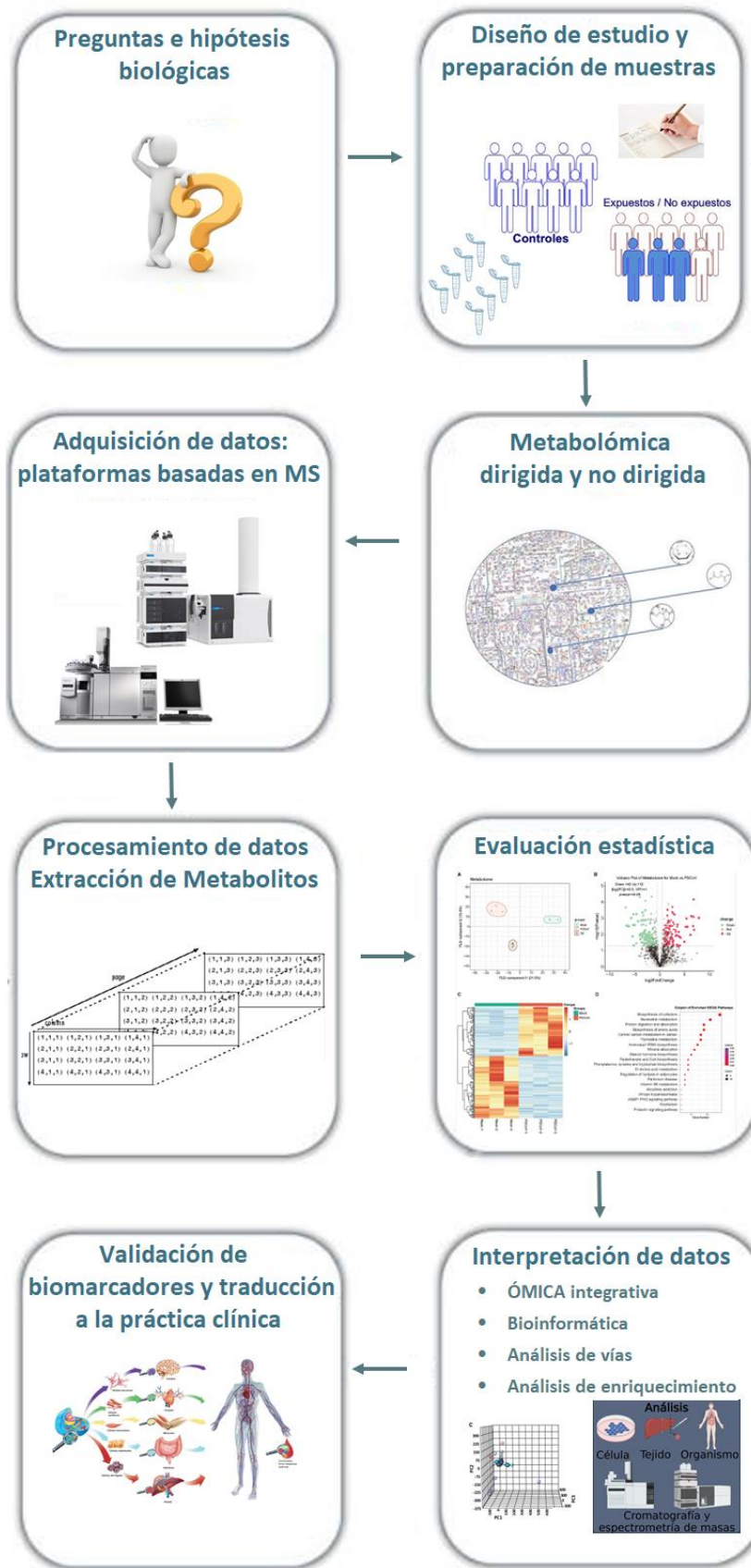


Figura 18: Etapas de un experimento metabolómico general.

1.7.2. La metalómica

La anteriormente indicada metalómica, puede abordarse con diferentes grados de aproximación, por ejemplo, a nivel general como un conjunto de concentraciones totales de elementos (esquema de concentración multielemental, también referido como ionona) [192], o en una ubicación específica (p. ej., un tejido o compartimento celular particular), o como un conjunto de complejos metálicos con una clase determinada de ligandos, como el metaloproteoma (el conjunto completo de metaloproteínas) o el metalometaboloma (el conjunto completo de metalometabolitos).

El metaloma puede considerarse como un concepto estático, es decir, el análisis entonces tendrá un punto final específico por analogía con el genoma, como la determinación del esquema multielemental de una célula, o la predicción *in silico* de un conjunto de metaloproteínas. También puede entenderse como un concepto dinámico, por analogía con el proteoma o el metaboloma, que responde de manera biológicamente relevante a los cambios ambientales con un número infinito de posibles variaciones. Así como no existe un proteoma discreto *per se*, ni siquiera para organismos unicelulares simples, tampoco existiría un metaloma discreto.

La metalómica es el estudio del metaloma, las interacciones y conexiones funcionales de los iones metálicos y sus especies con genes, proteínas, metabolitos y otras biomoléculas dentro de organismos y ecosistemas. La metalómica se ha convertido en un término de moda en los últimos años siendo también frecuente su uso inapropiado, por lo tanto, es importante especificar que un estudio de metalómica implica [193]:

- (a) Un enfoque en metales o metaloides (p. ej., As, Se, Sb) en un contexto biológico. Se desaconseja la extensión del término a no metales biológicamente importantes, como el S o el P.
- (b) Una correlación del esquema de concentración de elementos o la especiación de elementos con el genoma. Esta correlación puede ser estadística (un enriquecimiento de un elemento coincide con la presencia de un gen particular), estructural (la secuencia de una metaloproteína es trazable a un gen) o funcional

(la presencia de un bioligando es el resultado de un mecanismo codificado por un gen).

(c) Un enfoque sistemático, exhaustivo o global.

1.7.3. La metataxonómica

La metataxonómica, una disciplina emergente en la microbiología, se dedica al estudio de la composición taxonómica de comunidades microbianas complejas directamente desde muestras ambientales. El prefijo “meta-” hace referencia a genomas (metagenómica), regiones de ARN (metataxonómica), transcriptomas (metatranscriptómica), proteomas (metaproteómica) y metabolomas (metabolómica), los cuales son mezclas de genes o sus regiones (regiones 16S rRNA), transcritos, proteínas o metabolitos procedentes de diferentes organismos. Esta rama de la microbiología ha experimentado un auge sin precedentes gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento que permiten analizar miles de secuencias genéticas en paralelo [194].

Una de las técnicas más utilizadas en metataxonomía es la secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA [195]. Este gen presente en el ribosoma de todas las bacterias y arqueas, es altamente conservado en sus regiones centrales y variable en las regiones hipervariables. Esta característica lo convierte en un marcador molecular ideal para la identificación taxonómica a nivel de género y especie, aunque no es capaz de diferenciar entre cepas [195].

El proceso de secuenciación de amplicones 16S implica los siguientes pasos:

1. *Extracción de ADN:* Se extrae el ADN total de la muestra ambiental, el cual contiene el ADN de todos los microorganismos presentes.
2. *Amplificación por PCR:* Se utilizan pares de cebadores diseñados para amplificar las regiones hipervariables del gen 16S. La PCR permite obtener millones de copias de estas regiones, lo que facilita su posterior secuenciación.

3. *Secuenciación de alto rendimiento*: Los amplicones se secuencian utilizando plataformas de secuenciación de nueva generación, como Illumina o Ion Torrent. Esto genera una gran cantidad de secuencias cortas, denominadas lecturas.
4. *Análisis bioinformático*: Las secuencias obtenidas se analizan mediante herramientas bioinformáticas para:
 - *Asignación taxonómica*: Las secuencias se comparan con bases de datos de referencia (como la base de datos de la Ribosomal Database Project, RDP) para asignar cada secuencia a un taxón específico (dominio, filo, clase, orden, familia, género o especie).
 - *Análisis de diversidad*: Se calculan índices de diversidad alfa (riqueza y uniformidad) y beta (comparación entre comunidades) para evaluar la complejidad de las comunidades microbianas.

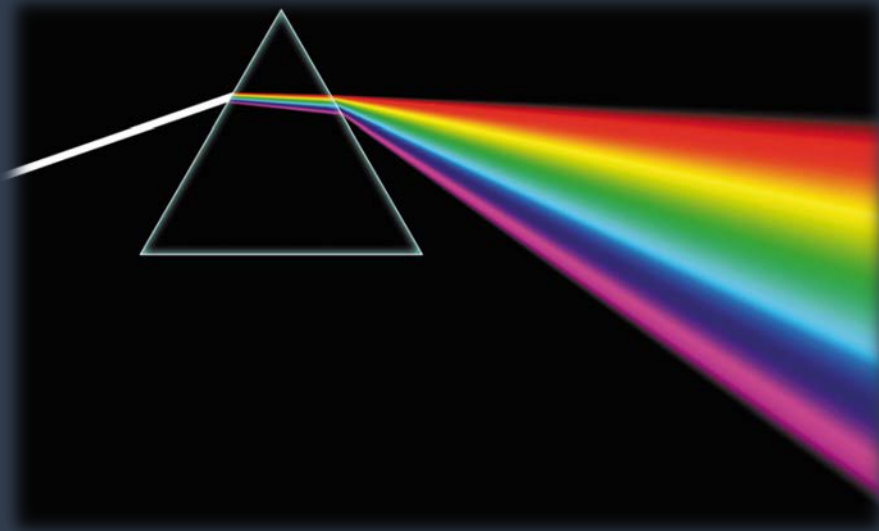
La metataxonomía ha revolucionado el estudio de las comunidades microbianas y tiene numerosas aplicaciones en diversos campos, aunque en la presente Tesis Doctoral se ha empleado para conocer las comunidades bacterianas que habitan en el tracto digestivo, donde es especialmente útil dada la dificultad de cultivo en condiciones de laboratorio de muchas bacterias.

A pesar de sus numerosas ventajas, la secuenciación de amplicones 16S presenta algunas de las siguientes limitaciones:

- *Sesgos de amplificación*: Los cebadores utilizados pueden amplificar preferentemente ciertas regiones del gen 16S, lo que puede llevar a una subestimación de la diversidad microbiana.
- *Asignación taxonómica imprecisa*: La asignación taxonómica puede ser complicada debido a la falta de resolución a nivel de especie en algunas regiones del árbol filogenético.
- *Información limitada*: La secuenciación del gen 16S proporciona información sobre la composición taxonómica de una comunidad, pero no sobre la función de los microorganismos.

Para superar estas limitaciones, se están desarrollando nuevas técnicas y herramientas bioinformáticas, como la metagenómica, que permite analizar todo el material genético presente en una muestra, proporcionando una visión más completa de la comunidad microbiana.

OBJETIVOS



2. OBJETIVOS

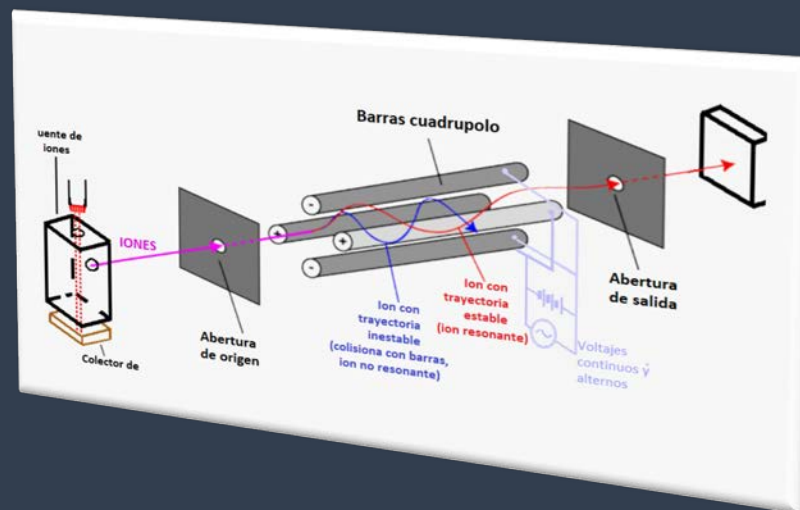
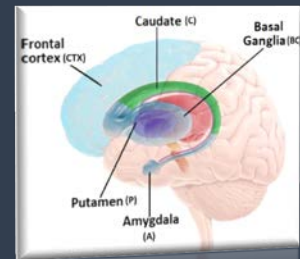
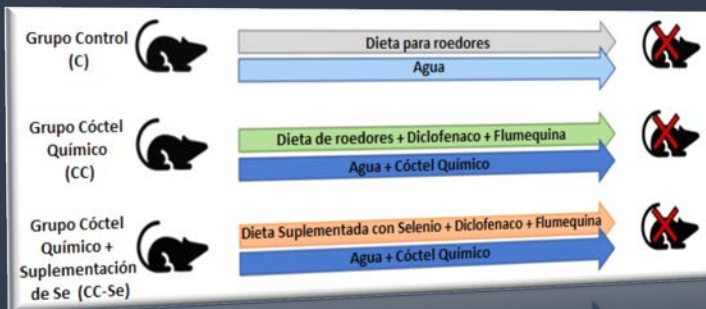
Objetivo General de investigación

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar la potencial neurotoxicidad y efecto de contaminantes en la reproducción, considerando sus posibles efectos sinérgicos o antagónicos, a través de la microbiota intestinal, utilizando para ello ratones modelo y cerebros humanos post-mortem con EA. Para el desarrollo de este objetivo principal, se establecieron los siguientes objetivos específicos desarrollados en los tres estudios experimentales empíricos que la conforman:

Objetivos específicos

1. Estudiar el impacto potencial de un “cóctel químico” compuesto por los elementos tóxicos As, Cd, y Hg, y los fármacos FLQ y DCF así como la influencia de la suplementación con Se en la microbiota intestinal de ratones modelo *Mus musculus*, su metaboloma cerebral y la potencial asociación microbiota-metaboloma. (Capítulo 1).
2. Describir el impacto potencial de dicho “cóctel químico” y el efecto antagónico de la suplementación con Se en el metaboloma testicular de ratones y en la posible asociación con la microbiota intestinal (Capítulo 2).
3. Analizar el metaloma de diferentes regiones del cerebro humano post-mortem con EA en diferentes estadios Braak (Capítulo 3).

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

En esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo dos estudios principales. Por un lado, el estudio del impacto potencial de los cócteles químicos en el metaboloma cerebral (Capítulo 1) y testicular de ratones (Capítulo 2) y su posible conexión con la microbiota intestinal, así como la influencia de la suplementación con Se en los mismos (Capítulos 1 y 2) y, por otro lado, el estudio del metaloma de diferentes áreas del cerebro humano post-mortem con EA en diferentes estadios Braak (Capítulo 3).

3.1.1. Capítulos 1 y 2: Impacto potencial de los cócteles químicos y efecto de la suplementación de Se en el metaboloma cerebral y testicular de ratones y su posible conexión con la microbiota intestinal.

Los experimentos con ratones modelo *Mus musculus* se llevaron a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Córdoba (SAEX-UCO), por personal cualificado y siguiendo las directrices de cuidado animal de la Comunidad Europea. Ambos protocolos de manipulación animal recibieron la aprobación ética de la investigación del Comité de Ética de la Universidad de Córdoba y la Junta de Andalucía (España), con los códigos de aprobación: Cód. Nº. 02–01–2019–001 (Estudio 1) y Cód. Nº. 17-10-2022/126 (Estudio 2).

Para estos estudios (capítulos 1 y 2) se realizó el siguiente diseño experimental (Figura 19): 36 Ratones BALB/c *Mus musculus* machos de 8 semanas de edad fueron divididos aleatoriamente en tres grupos (n= 12 cada grupo) en condiciones de laboratorio controladas y alojados por parejas: 1) C: Grupo de ratones de control alimentados con dieta para roedores; 2) CC: Grupo de ratones alimentados con una dieta para roedores expuestos al cóctel químico y 3) CC-Se: Grupo de ratones alimentados con una dieta suplementada en Se y expuestos al cóctel químico.

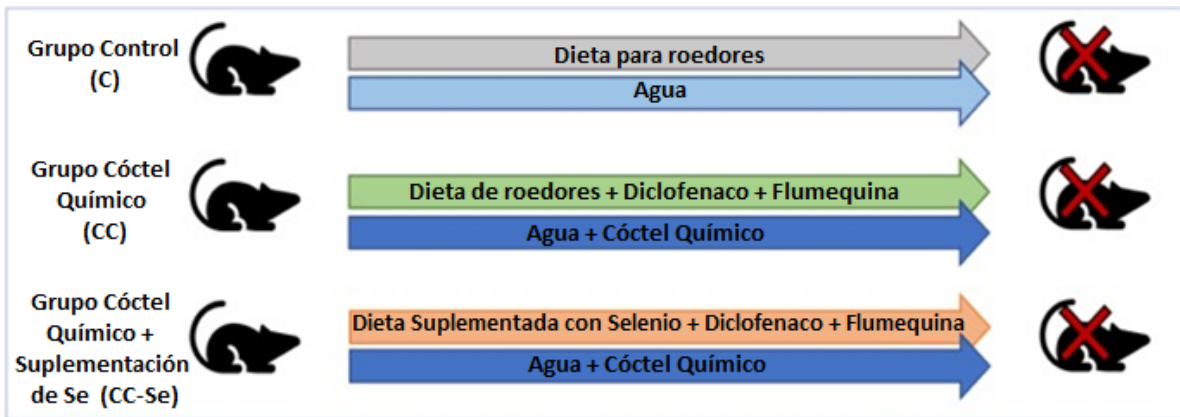


Figura 19. Diseño experimental para exposición animal.

Las concentraciones de DCF, FLQ, As, Cd y Hg se calcularon para ratones que recibieron dosis diarias de 20, 625, 3, 0,1 y 1 mg/kg, respectivamente, en consonancia con las concentraciones de relevancia ambiental [196–198]. El pienso de los ratones del grupo CC-Se contenía un además un suplemento de Se (selenito de sodio, 0,65 mg/kg) [199, 200].

3.1.2. **Capítulo 3:** Estudio del metaloma en diferentes áreas del cerebro humano post-mortem con EA en diferentes estadios Braak.

Para analizar el metaloma en varias regiones de cerebros humanos post-mortem con EA y ver la influencia de los metales en diferentes estadios Braak del I al VI (capítulo 3) se obtuvieron un total de 292 muestras (de diferentes regiones del cerebro) obtenidas de cinco biobancos españoles:

- BioBank (PT20/0161), cofinanciado por el Servicio de Salud del Principado de Asturias, el Instituto de Salud Carlos III y la Fundación Bancaria Cajastur e integrado en la Red Nacional de Biobancos y Biomodelos de España.
- Biobanco HUB-ICOIDIBELL (PT20/00171), integrado en la Plataforma de Biobancos y Biomodelos del ISCIII y la Xarxa Banc de Tumors de Catalunya (XBTC).
- Red de Biobancos de la Región de Murcia, BIOBANC-MUR, inscrita en el Registro Nacional de Biobancos con número de registro B.0000859 y avalada por el

“Instituto de Salud Carlos III (proyecto PT20/00109), por el “Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria Virgen de la Arrixaca, IMIB” y por la “Consejería de Salud de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia”.

- Biobanco de tejidos de la Unidad de Investigación Proyecto Alzheimer Fundación CIEN.
- Fundación Biobanco Hospital Universitario de Alorcón.

Las muestras y los datos de los pacientes incluidos en el estudio se procesaron siguiendo procedimientos operativos estándar con la aprobación correspondiente de los Comités Científico y Ético. La gravedad neuropatológica se determinó mediante la asignación del estadio de Braak.

La Figura 20 muestra las diferentes regiones cerebrales obtenidas en las muestras de cerebro humano post-mortem que incluyen corteza frontal (CTX), putamen (P), caudado (Cau), ganglios basales (BG) y amígdala (A).

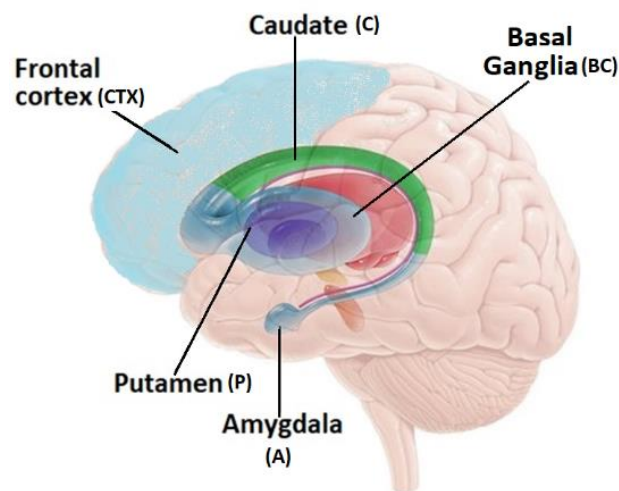


Figura 20. Regiones del cerebro humano obtenidas para el análisis elemental.

El diseño de este segundo estudio se basó en la división de las muestras por grupos con diferentes estadios de Braak. En este sentido, los grupos de estudio fueron los enumerados a continuación:

- 1) Grupo Control: Muestras de cerebro humano post-mortem de personas sanas sin diagnóstico de EA.
- 2) Grupo EA Braak I-II: Muestras de cerebro humano post-mortem con afectación de los NFT centrada principalmente en la región transentorinal del cerebro.
- 3) Grupo EA Braak III-IV: Muestras de cerebro humano post-mortem con afectación severa pero centrada en el área límbica.
- 4) Grupo EA Braak V-VI: Muestras de cerebro humano post-mortem con extensa afectación neocortical

La distribución del recuento de muestras por regiones analizadas con los diferentes estadios de Braak se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de las regiones cerebrales con los diferentes estadios de Braak de Enfermedad de Alzheimer (EA).

Recuento de muestras					
Región cerebral	Control	BRAAK I-II	BRAAK III-IV	BRAAK V-VI	Total
CTX	28	10	46	71	155
P	6	5	20	21	52
Cau	6	6	4	5	21
Amígdala	2	2	3	0	7
BG	13	4	9	31	57
Total	55	27	82	128	292

3.2. Procedimientos experimentales

3.2.1. Metabolómica cerebral, testicular y microbiota intestinal de ratones *Mus*

Musculus.

3.2.1.1. Preparación del tejido cerebral y testicular de ratones modelo para el análisis metabolómico.

Los tejidos cerebrales y testiculares se criohomogeneizaron en un mortero cerámico con nitrógeno líquido. Se pesaron 30 mg de tejido, se traspasaron a un criotubo de 2 mL y se homogenizaron empleando un homogeneizador TissueLyser LT (Qiagen, Alemania) mediante la adición de una mezcla fría (-20 °C) de MeOH (metanol)/H₂O (1:1, v/v).

Los metabolitos se extrajeron de una alícuota de 100 µL de muestra homogenizada mediante la mezcla de la misma con 400 µL de MeOH/MTBE (metil terc-butil éter) 80:20 (v/v). Seguidamente, la muestra se agitó en vórtex durante 1 h y se centrifugó a 4000 g durante 20 min a 20 °C. El sobrenadante resultante fue separado del pellet y fue conservado para su análisis por cromatografía de ultra-alta eficacia (UHPLC) y GC. En este sentido, se separaron dos alícuotas de 250µL para el análisis por UHPLC-MS y GC-MS respectivamente, y luego se llevaron a sequedad utilizando el sistema concentrador a vacío SpeedVac (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania). Previo al análisis GC-MS, se aplicó a los extractos un procedimiento de derivatización en dos pasos: (i) metoximación, para la protección de los grupos carbonilo, mediante la adición de 50 µL de clorhidrato de metoxiamina en piridina a 20 mg mL⁻¹ e incubando durante 15 min a 80°C. (ii) Sililación, mediante la adición de 50 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida e incubando bajo las mismas condiciones. Para el análisis UHPLC-MS, los extractos fueron reconstituidos en MeOH:MTBE (80:20, v/v) y fueron inyectados directamente en el UHPLC-MS.

Adicionalmente, se prepararon muestras de control de calidad (QC) mediante la mezcla de cantidades iguales de todos los extractos de cerebro, para evaluar la estabilidad de la reproducibilidad de los análisis.

3.2.1.2. Análisis metabolómico mediante cromatografía de gases y de líquidos.

3.2.1.2.1. Análisis metabolómico mediante GC-MS

El análisis GC lo realizamos en un cromatógrafo de gases modelo Trace GC ULTRA acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones modelo ITQ900 (Thermo Fisher Scientific), utilizando una columna capilar Factor Four VF-5MS de 30 m × 0,25 mm de diámetro interior, con un espesor de película de 0,25 µm (Agilent Technologies, Tokio, Japón).

La temperatura de la columna se estableció inicialmente en 100 °C durante 0,5 min y continuó realizando una rampa de aumento a 320 °C a 15 °C min⁻¹ manteniéndose finalmente a esta temperatura a durante 2,8 min. Utilizamos helio como gas portador empleando un caudal constante de 1 mL min⁻¹. La temperatura del inyector se fijó en 200 °C. La ionización de los metabolitos en el espectrómetro de masas se realizó mediante EI a 70 eV con un filamento caliente a 230 °C. Para evitar señales interferentes debidas al disolvente, apagamos el filamento durante los primeros 4 minutos del cromatograma. Finalmente, se inyectó 1 µL de extracto metabolómico en modo splitless y se analizó en modo de barrido completo en el rango *m/z* 35–650.

3.2.1.2.2. Análisis metabolómico mediante UHPLC-QTOF

Utilizamos un cromatógrafo de líquidos modelo Agilent 1290 Series equipado con un muestreador automático acoplado a un sistema iFunnel QTOF modelo 6550 con una fuente de iones de electrospray dual (Agilent Technologies, Tokio, Japón). Los análisis los realizamos, tanto en modo de ionización positivo, como negativo.

Para lograr una buena separación de metabolitos realizamos una cromatografía de fase reversa con un gradiente de fase móvil de (A) H₂O y (B) MeOH/(CH₃)₂CHOH (85:15, v/v). El análisis se llevó a cabo utilizando un gradiente de 82% a 100% de fase móvil B a un caudal de 0,4 mL min⁻¹. De esta forma, inyectamos 5 µL de extractos de cerebro en una columna cromatográfica Agilent InfiniteLab Poroshell 120 EC-C18 (150 × 2,1 mm, 2,7 µm, Agilent Technologies) termorregulada a 60°C. Las masas de referencia *m/z* 121,0509 y

922,0098, se introdujeron constantemente en el sistema para la corrección de masas en modo positivo mientras que las masas de referencia m/z 1033,9881 y 112,9856 se introdujeron para la corrección de masas en modo de ionización negativa. El rango de masas seleccionado para el análisis fue 100–1200 m/z en modo Full Scan. Además, ajustamos otros parámetros instrumentales como el voltaje capilar (3,5 KV), el caudal de gas de secado (14 L min⁻¹), la temperatura (200 °C), la presión del nebulizador de gas (35 psi), el gas envolvente (350 °C) y el caudal de nebulización (11 L min⁻¹).

Para los modos de ionización positiva y negativa, ajustamos el voltaje del fragmentador a 380 V. Para la realización de los experimentos de fragmentación MS/MS de los metabolitos de interés empleamos el modo Agilent Targeted MS/MS del software MassHunter Data Acquisition. Para este fin, establecimos la velocidad de barrido MS/MS en 1 espectro s⁻¹ con las mismas condiciones cromatográficas que para el modo Full Scan, utilizando nitrógeno como gas de colisión y ajustando los voltajes en el rango de 10–40 V para la fragmentación de compuestos. Los datos se adquirieron con una velocidad de barrido de 1,0 espectro/segundo en modo centroide.

3.2.1.3. Procesamiento de datos de metabolitos cerebrales y testiculares.

Los cromatogramas resultantes del análisis por GC-MS lo convertimos al formato CDF utilizando la herramienta Thermo File Converter (Thermo Fisher Scientific). Tras esta conversión realizamos la extracción, alineación de picos y normalización de los datos utilizando el software XCMS incluido en la plataforma R (<http://www.r-project.org>). En este sentido, los datos fueron procesados utilizando el algoritmo “matched filter method” que selecciona los datos en cromatogramas iónicos extraídos (XIC) en un tamaño de paso fijo, luego se filtró cada selección utilizando una función gaussiana de segunda derivada como forma de pico del modelo.

Para la identificación de metabolitos determinados por GC-MS, utilizamos la versión 8 de la librería de espectros de masas NIST, seleccionando solo aquellos con una probabilidad > 80%. Además, se seleccionaron iones objetivo y al menos dos *qualifiers* (iones identificadores) de cada espectro de masas considerando solo aquellos metabolitos con una variación menor al 20% en la relación de área calificador/ion objetivo por

metabolito. Así mismo, se calcularon los índices de retención de Kovat (KRI) para los metabolitos previo análisis de una mezcla de alcanos de C7-C40 (Sigma Aldrich, Alemania) empleando las mismas condiciones de análisis de las muestras.

Para el análisis metabolómico UHLC-QTOF-MS, usamos el software MassHunter versión B.08.00. Para este fin, aplicamos al conjunto de datos el algoritmo de extracción de variables: “Compound Discovery” y “Find by Molecular Features”. Con este flujo de trabajo se consiguió extraer, seleccionar los diferentes iones y el estado de carga para seleccionar las entidades químicas o “*features*”, dichos features fueron alineados por tiempo de retención y masas creando una lista única de entidades químicas para todas las muestras, luego se usó esta lista recursivamente como filtro de entrada junto con nuevos filtros como “*score*”, integración y filtros de altura del pico. La identificación de los metabolitos se llevó a cabo empleando las bases de datos METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) y HMDB (<http://hmdb.ca>), considerando solo aquellos metabolitos con una coincidencia de la masa experimental con la masa teórica mayor al 90%.

3.2.1.4. Perfil de la microbiota intestinal.

Para el análisis de la microbiota intestinal de los ratones modelo tomamos muestras del contenido intestinal de los ratones inmediatamente después de sacrificarlos. Posteriormente, estas muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido.

Seguidamente empleamos el kit de extracción de ADN Master-Pure, siguiendo las instrucciones del fabricante (Epicentre, Madison, WI, EE. UU.) para obtener de 100 mg de ADN total de los contenidos intestinales. El ADN se purificó con el kit de purificación de ADN (Macherey-Nagel, Duren, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se determinó la concentración mediante el fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technology, Carlsbad, CA, EE. UU.).

El perfil de microbiota se realizó siguiendo los protocolos de Illumina mediante la secuenciación de la región variable V3-V4 del gen 16S rRNA. Brevemente, utilizamos el

kit de índice NextEra (Illumina, San Diego, CA, Estados Unidos) para un paso de multiplexación y el chip Bioanalyzer DNA 1000 para verificar los amplicones (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Las librerías de ADN fueron secuenciadas en una plataforma MiSeq-Illumina (servicio de secuenciación FISABIO, Valencia, España), en el que cada fragmento de ADN fue secuenciado en ambos extremos, generando pares de lecturas de 300 pares de bases cada una. (kit de reactivo MiSeq v3). Incluimos controles negativos en los pasos de extracción de ADN y generación de amplicones, y también se secuenciaron. Se eliminaron los adaptadores residuales de las secuencias crudas mediante el uso del software Trimmomatic, se siguió la canalización DADA2 incluyendo los pasos de filtrado de calidad y eliminación de quimeras en el entorno R [201]. Las variantes de secuencia de amplicón (ASV) se asignaron taxonómicamente utilizando la base de datos Silva v132, incluyendo la clasificación a nivel de especie. Las muestras con menos de 1000 lecturas las eliminamos del análisis estadístico final.

El perfil de microbiota se correlacionó con los metabolitos determinados en la metabolómica cerebral con el fin de identificar asociaciones específicas entre los metabolitos cerebrales y la microbiota intestinal moldeados por los grupos de suplementación animal.

3.2.2. Metaloma en tejido cerebral humano con patología de EA en diferentes estadios de Braak.

El metaloma de las muestras de tejido cerebral de pacientes humanos post-mortem fue determinada mediante el análisis de los elementos Se, Cr, manganeso (Mn), Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb, talio (Tl), molibdeno (Mo), magnesio (Mg), Al, vanadio (V), As y antimonio (Sb) utilizando el modelo 8800 Agilent Technologies ICP-MS equipado con triple cuadrupolo (QQQ). A continuación, detallamos, tanto el procedimiento de tratamiento de muestras, como los parámetros utilizados en el método de análisis multielemental.

3.2.2.1. Preparación de la muestra

Las doscientas cuarenta y nueve muestras post mortem de cerebro humano con EA (Tabla 2) se criohomogeneizaron utilizando nitrógeno líquido y un mortero cerámico hasta su completa pulverización. A continuación, pesamos 100 µg de la muestra de cerebro criohomogeneizada de las diferentes regiones. Seguidamente procedimos a la mineralización de las muestras mediante la adición de 600 µl de una mezcla HNO₃: H₂O₂ (4:1, v/v) (ambos reactivos de calidad Trace Metal, Leicestershire, Reino Unido) a cada muestra colocada en un recipiente de PTFE.

Posteriormente, se realizó la mineralización ácida asistida por microondas en un horno microondas modelo MARS 6 (CEM Matthews, NC, EE. UU.) utilizando el método de digestión descrito en la Tabla 2. Brevemente, empleamos una rampa de 15 minutos a 160 °C, seguida de una retención de 40 minutos a 160 °C, con un ajuste de potencia de 400 W. Una vez completada la mineralización, las muestras se diluyeron con agua ultrapura (sistema de gradiente Milli-Q, Millipore, Watford, Reino Unido) y se filtraron utilizando filtros de nailon de 0,45 µm antes de inyectarlas en ICP-QQQ-MS.

Tabla 2. Parámetros de la mineralización ácida asistida por microondas.

Asistida por Microondas	Parámetros de mineralización ácida
Agentes de digestión	Ácido nítrico puro al 55,4% y peróxido de hidrógeno al 20%
Modo de control	Rampa de temperatura
Potencia	400 W
Tiempo de rampa	15 min
Mantener la temperatura durante	40 min
Temperatura	160 Cº

3.2.2.2. Determinación del metaloma por ICP-QQQ-MS

Los parámetros analíticos para la determinación del metaloma por ICP-QQQ-MS se detallan a continuación:

En primer lugar, se realizó la sintonía del equipo ICP-QQQ-MS con una disolución de sintonía de Li, Co, Y y Tl a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Agilent Technologies). Se utilizaron un cono de muestreo y un cono skimmer de Ni, con una profundidad de muestreo de 10 mm. La potencia directa se ajustó en 1550 W y los caudales de gas se fijaron en 15 L min^{-1} (gas de plasma) y $1,08 \text{ L min}^{-1}$ (gas portador). Utilizamos un flujo de $4,5 \text{ mL min}^{-1}$ de helio para la mayoría de los metales como gas de colisión para eliminar interferencias. Para Se y As, utilizamos un flujo de 2 mL min^{-1} de H_2 con 40 % de O_2 en modo MS/MS. Se añadió a las muestras una solución mixta que contenía 100 ng g^{-1} de rodio (Rh), bismuto (Bi) y escandio (Sc) como estándar interno.

Además, se emplearon como gases de colisión/reacción, helio y oxígeno de alta pureza (>99,999 %) y gas hidrógeno puro (>95 %).

En el equipo monitorizamos los isótopos ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{45}Sc , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{80}Se , ^{95}Mo , ^{103}Rh , ^{111}Cd , ^{121}Sb , ^{205}Tl , ^{208}Pb y ^{209}Bi , con un tiempo de permanencia de 0,3 s por isótopo.

3.3. Análisis estadístico de los resultados

El tratamiento estadístico de los resultados determinados en los diferentes estudios de esta Tesis Doctoral se basó principalmente en análisis multivariante de componentes principales (PCA) y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) con el fin de comparar los perfiles metabolómicos cerebrales obtenidos, y análisis univariante (ANOVA, Tukey Test, Kruskal Wallis Test) para determinar diferencias significativas entre los grupos de estudio. Estas pruebas estadísticas fueron realizadas a

través de diferentes programas informáticos y la herramienta web MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), STATISTICA 8.0 (StatSoft) y SSPS (IBM SPSS Statistics para Windows, versión 27.0).

El nivel de significancia estadística se estableció en $p < 0,05$ para todas las pruebas. Además, se han realizado análisis de correlaciones de Spearman entre metabolitos cerebrales y microbiota a nivel de género y mapas de calor utilizando el paquete de software R Hmisc (versión 4.0.2).

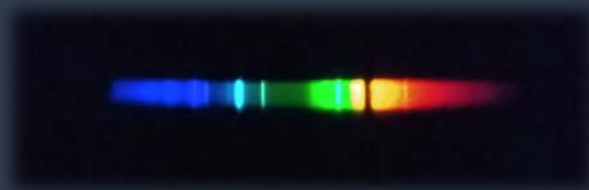
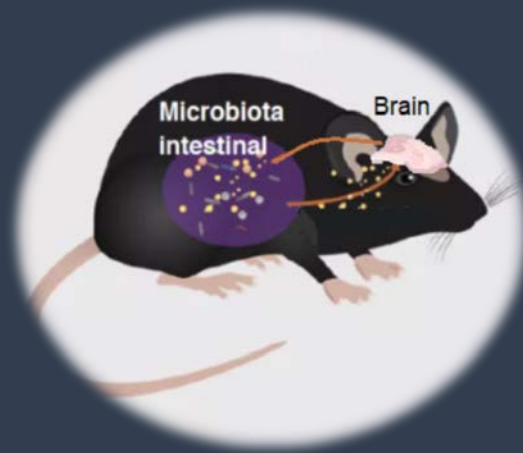
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha investigado la potencial neurotoxicidad, efectos en la reproducción e impacto en la microbiota intestinal de los contaminantes y sus mezclas, así como el efecto de la suplementación del Se utilizando ratones modelo (Capítulos 1 y 2). Asimismo, se ha estudiado la posible asociación entre la microbiota intestinal y el metaboloma cerebral y testicular. Por otro lado, se ha analizado el metaloma de diferentes regiones del cerebro humano post-mortem con EA en función de sus estadios Braak (Capítulo 3).

En el Capítulo 1 se resumen los resultados del estudio metabolómico cerebral de ratones y su microbiota intestinal tras la exposición a un “cóctel químico” con As, Cd, Hg y productos farmacéuticos (FLQ y DCF), así como el efecto de la suplementación con Se, analizando el impacto de estos a través del GBA. En este sentido, observamos asociaciones entre los metabolitos cerebrales y la microbiota intestinal, las cuales cambiaron tras la suplementación con Se. En el Capítulo 2 se detallan los resultados relacionados con el impacto del mismo “cóctel químico” en el metaboloma testicular de ratones, así como las asociaciones con la microbiota intestinal, igualmente comparando la suplementación con Se sobre uno de los grupos de ratones frente a los no suplementados, estudiando su posible antagonismo hacia esos contaminantes.

En el Capítulo 3 se detallan los resultados del estudio sobre la influencia de elementos tóxicos y esenciales en cerebros humanos con EA, dado que esta enfermedad produce el depósito de elementos tóxicos que ocasionan la degeneración de redes neuronales en determinadas zonas cerebrales provocando así el mal funcionamiento conocido. En este capítulo se describe el metaloma de diferentes regiones de tejido cerebral, CTX, Cau, P, BG y A humano post-mortem y las alteraciones de elementos junto con su dependencia de diferentes estadios Braak.

CAPÍTULO 1



4.1. Capítulo 1:

Metabolómica cerebral de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” y a la suplementación con selenio a través del eje intestino-cerebro

Artículo 1

C. Parra-Martínez, M. Selma-Royo, B. Callejón-Leblic, M.C. Collado, N. Abril, T. García-Barrera. Mice brain metabolomics after the exposure to a “chemical cocktail” and selenium supplementation through the gut-brain axis. *Journal of Hazardous Materials*, 438 (2022), 129443.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129443>

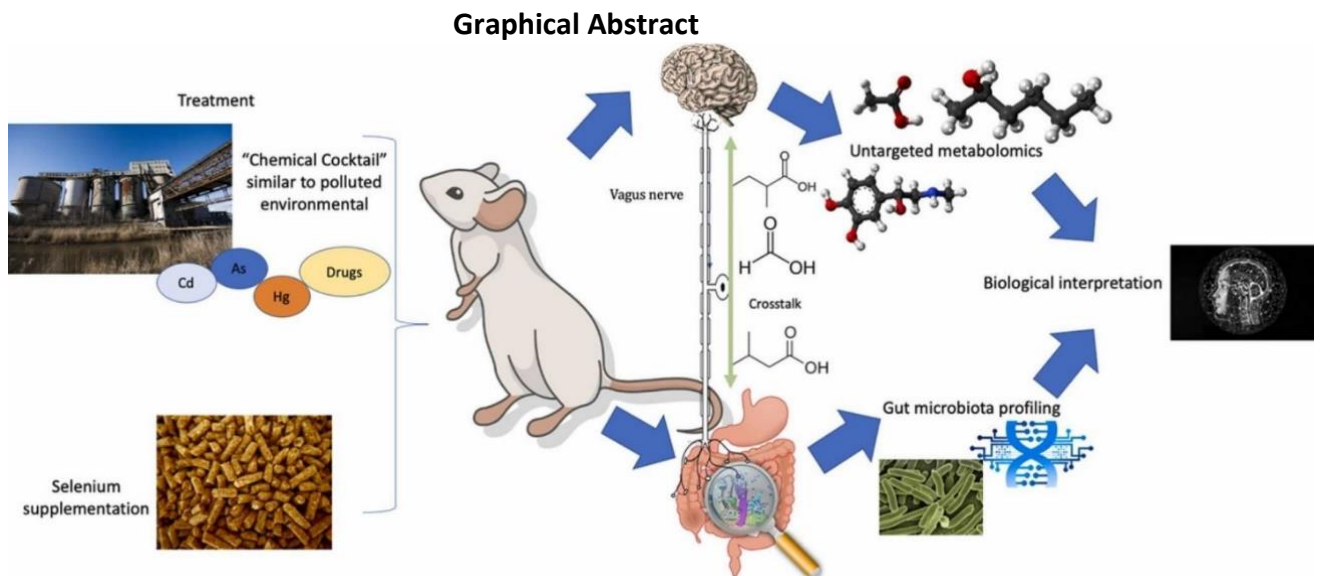


Figura 21. Resumen gráfico del estudio sobre metabolómica cerebral de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se) a través del eje microbiota intestinal-cerebro.

El cerebro es un órgano especialmente propenso a sufrir daños por contaminantes ambientales a pesar de la BHE, que impide el cruce no selectivo de compuestos de la sangre circulante hacia el líquido extracelular del SNC, donde habitan las neuronas [202].

El Hg es uno de los neurotóxicos más conocidos [203], especialmente de especies químicas orgánicas [204], pero el As también puede inducir efectos neurotóxicos como encefalopatía, neuropatías periféricas, alteraciones neuroconductuales siendo asociado con la neurodegeneración [205, 206]. Asimismo, se ha relacionado el Cd con enfermedades neurodegenerativas, incluidas las EA, Parkinson y la esclerosis lateral múltiple y amiotrófica [207].

En este Capítulo se describen los resultados del impacto de un “cóctel químico” que incluye As, Cd, Hg y los productos farmacéuticos FLQ y DCF y la influencia de la suplementación con Se en el metaboloma cerebral de ratones y sus asociaciones con la microbiota intestinal.

Para ello, se realizó lo descrito en la sección 3.1.1 sobre diseño experimental del estudio 1 y en la Figura 19, en el que se consideraron los grupos de estudio: C, CC, y CC-Se.

La exposición al cóctel de contaminantes resultó en una letalidad de alrededor del 25% en los animales que consumieron alimento normal durante el tratamiento (CC vs. C), que se redujo al 15% en los ratones que consumieron una dieta suplementada con Se.

Un análisis de Kaplan-Meier (software XLStat, v. 2020.2.2.6533, Addinsoft) de las curvas de supervivencia general (SG) indicó que los ratones del grupo CC tuvieron una SG significativamente peor ($p = 0,016$) que sus contrapartes de C. Por el contrario, la SG de los ratones del grupo CC+Se no difirió de la del C ($p = 0,136$). Las funciones de distribución de supervivencia y los resultados del análisis de Kaplan-Meier se muestran en la Figura 22.

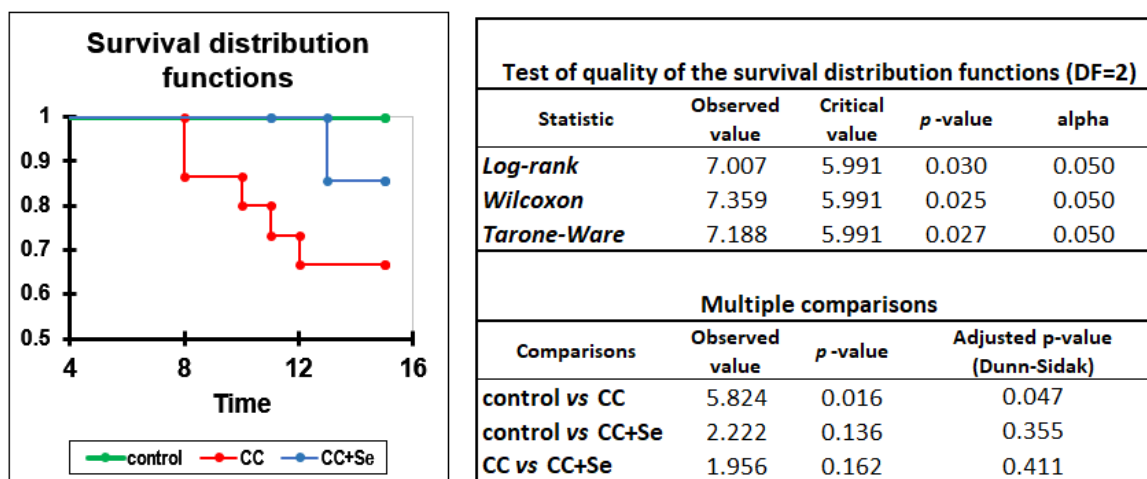


Figura 22. Comparación de las curvas de supervivencia global de los ratones control (C), ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se) mediante el análisis de Kaplan-Meier (software XLStat, v. 2020.2.2.6533, Addinsoft)

Las muestras de tejido cerebral fueron obtenidas y tratadas según los procedimientos experimentales descritos en el apartado de *Preparación del tejido cerebral y testicular de ratones modelo para el análisis metabolómico* (3.2.1.1) y, el metaboloma cerebral se analizó utilizando una plataforma metabolómica basada en la combinación de UHPLC-QTOF-MS y GC-MS.

Tras los análisis, realizamos el tratamiento estadístico de los resultados. La Figura 23 muestra los gráficos de PCA, donde puede observarse una buena estabilidad de las señales debido a que se muestra el agrupamiento de los QCs. Asimismo, el PLS-DA mostró buenas clasificaciones entre grupos teniendo en cuenta todos los modos de análisis (Figura 24 A, B y C). Además, se realizaron comparaciones 2D-PLS-DA por pares para determinar los metabolitos que permitieron discriminar grupos (Figura 25).

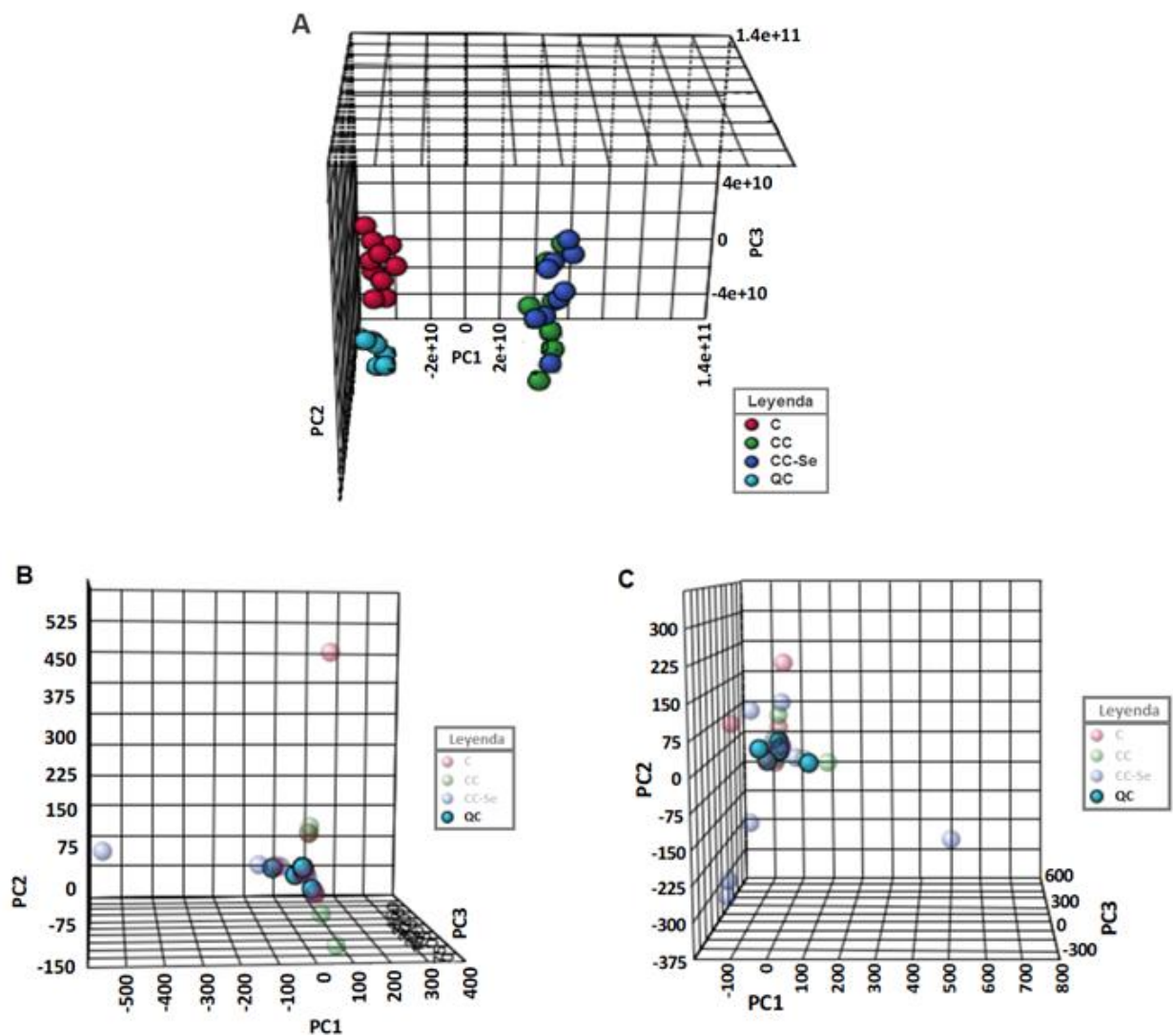


Figura 23: Análisis en 3D de componentes principales de metabolitos cerebrales determinados por A) Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), B) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y C) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS).

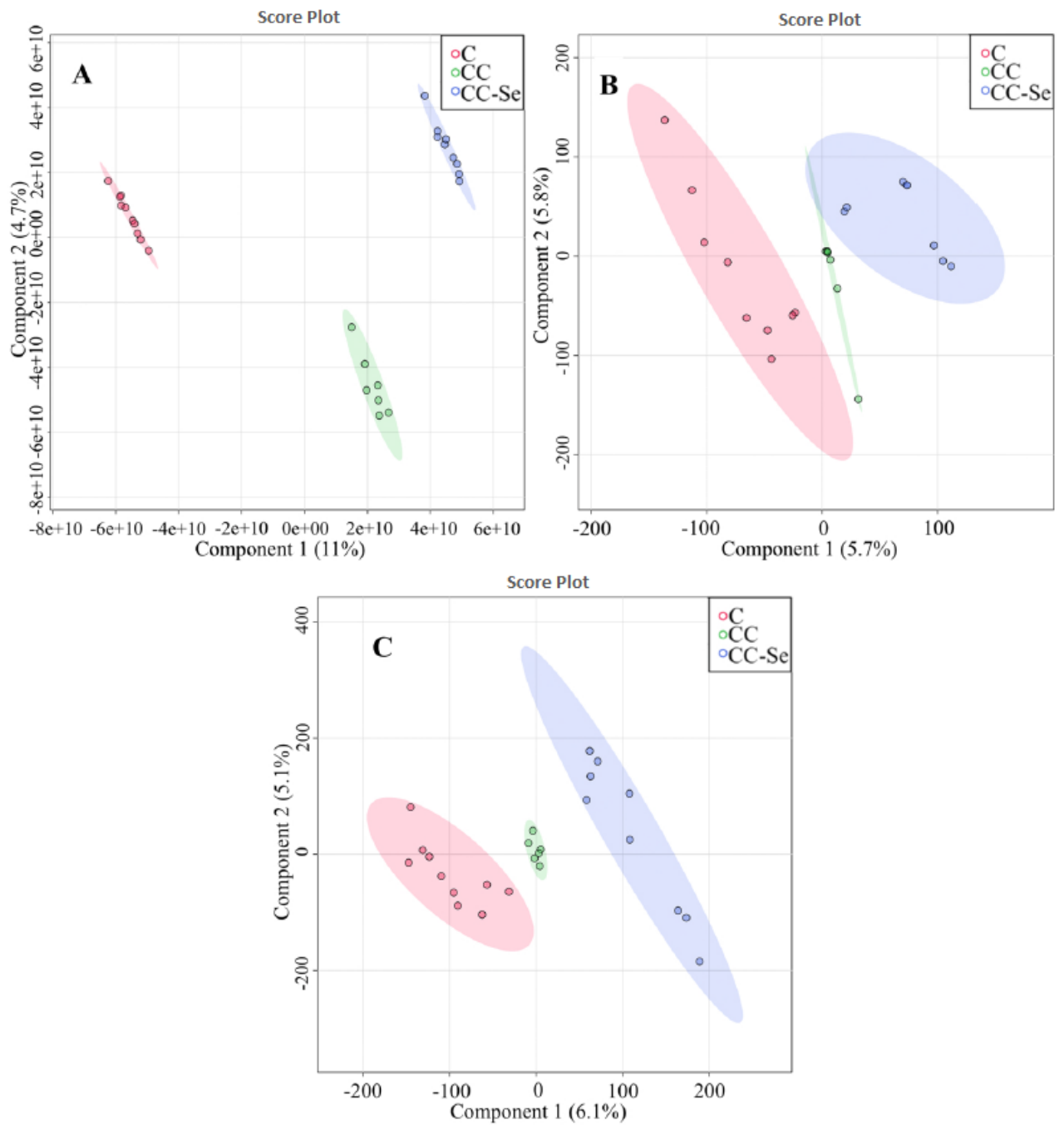


Figura 24. Gráficas del PLS-DA entre grupos de metabolitos cerebrales de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se). 2D-PLS-DA de muestras de cerebro correspondientes al análisis A) GC-MS, B) UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS y C) UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS.

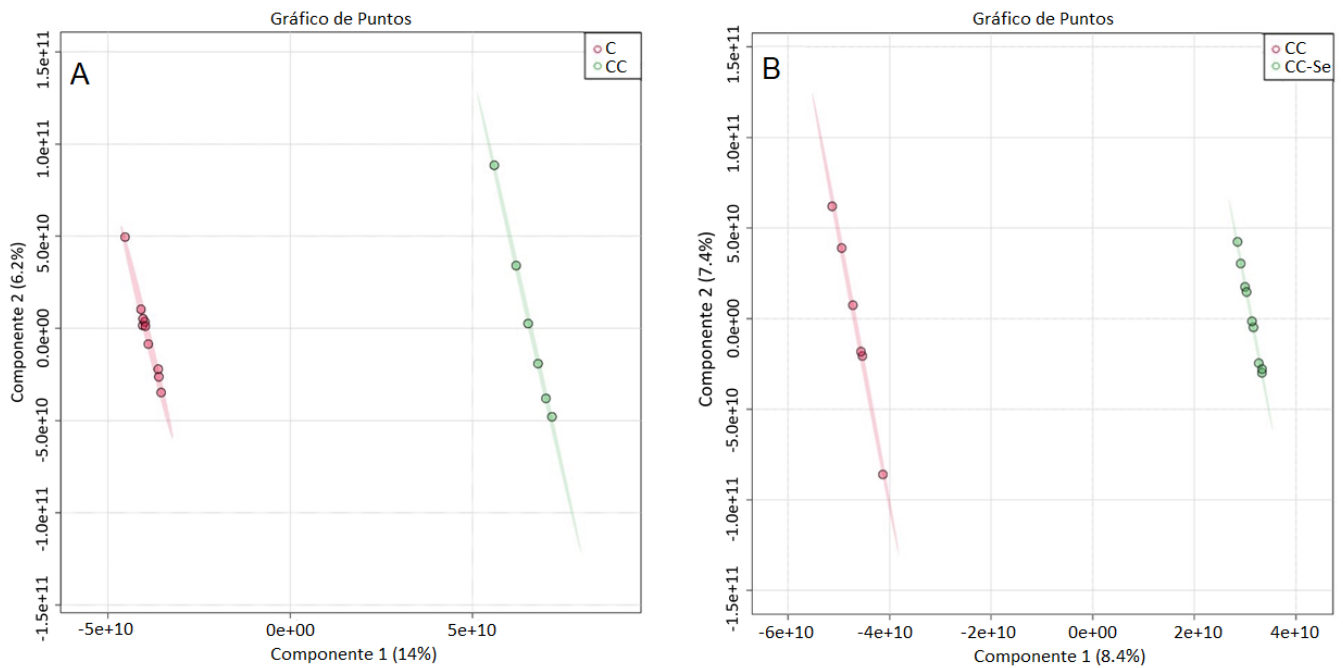


Figura 25. Gráficas 2D-PLS-DA de comparaciones de grupos por partes en A) ratones expuestos a "cóctel químico" comparados con el control y B) ratones suplementados con Selenio expuestos a "cóctel químico" (CC-Se) comparados con ratones expuestos a "cóctel químico" (CC).

Se identificaron un total de 49 metabolitos cerebrales combinando GC-MS (13 metabolitos) y UPLC-QTOF-MS (36 metabolitos), recogidos en la Tabla 3 (Anexo 1). Calculamos los KRI para la identificación de metabolitos determinados por GC-MS. La Figura 26, recoge la abundancia de los metabolitos anotados en los grupos C, CC y CC-Se en un diagrama de mapa de calor y la Tabla 3 (Anexo 1) muestra la lista completa de metabolitos con los valores p y los *fold changes* (FC) entre otra información.

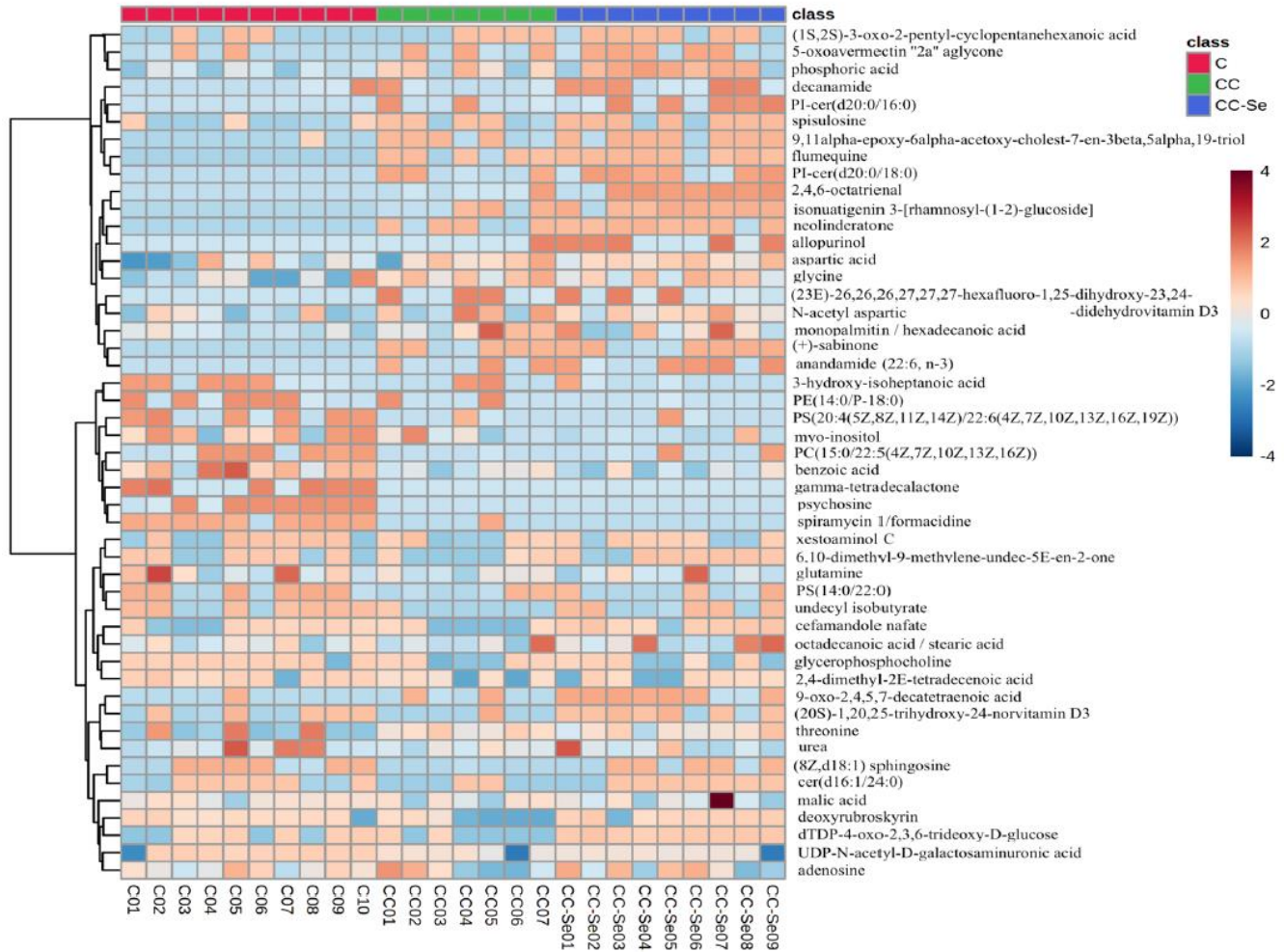


Figura 26. Mapa de calor de las abundancias de los metabolitos cerebrales alterados en los diferentes grupos de ratones control, ratones tras la exposición a un "cóctel químico" (CC) y ratones tras la exposición a un "cóctel químico" suplementados con selenio (CC-Se). Los metabolitos se representan en filas y los ratones de diferentes grupos en columnas. Los colores rojo y azul muestran niveles aumentados y disminuidos de metabolitos cerebrales, respectivamente.

Entre los metabolitos cerebrales que disminuyen por la exposición al CC, varios de ellos aumentaron sus niveles después de la suplementación con Se (CC-Se) llegando incluso a niveles cercanos al control, o sin diferencias significativas en comparación con el grupo C (FC CC-Se vs CC mayor que aquellos para la comparación CC vs C). Así pues, en esta comparación (CC-Se vs CC): observamos alteraciones significativas ($p < 0.05$) de los metabolitos monopalmitina (*monoglicérido*, FC: 2,18), cer (d16:1/24:0) (*ceramida*, *N-acilesfingosina*, FC: 2,70), desoxirrubroskirina (*antraceno*, *antraquinona*, FC: 1,94) e isobutirato de undecilo (*ácido graso*, *éster graso*, FC: 3,90).

Por otro lado, observamos que otros metabolitos cerebrales aumentaron por la exposición a CC y disminuyeron por la suplementación con Se (CC-Se vs CC) incluyendo ácido N-acetil aspártico (*aminoácido excitatorio*, FC: 0,51) y ácido fosfórico (*anhídrido de ácido*, *anhídrido de ácido acrílico*, FC: 1,47).

También encontramos alteración de metabolitos cerebrales por la suplementación con Se que no se alteraron significativamente tras la exposición a CC con respecto a C. Estos metabolitos fueron: espisulosina (*esfingolípidos*, *compuesto organonitrógeno*, *amina*, FC: 2,15), xestoaminol C (*compuesto organonitrógeno*, *amina*, FC: 1,06), 5-oxoavermectina "2a" aglicona (*macrólido y análogos*, *milbemicinas*, FC: 2,88), decanamida (*ácido graso*, *amida grasa*, FC: 4,77), (ácido 3-oxo2-pentilciclopentanoheptanoico (*ácido graso*, *octadecanoide*, FC: 2,36), ácido 9-oxo-2,4,5,7-decatetranoico (*ácido graso de cadena media*, FC: 8,47), Fosfatidilserina (PS)(14:0/22:0) (*glicerofosfolípido*, *glicerofosfolina*, *PS*, FC: 0,51), PE(14:0/P-18:0) (*glicerofosfolípido*, *glicerofosfoetanolamina*, FC: 0,02), PS(20:4/22:6) (*glicerofosfolípido*, *glicerofosfolina*, *PS*, FC: 0,19) y ácido málico (*derivado del ácido hidroxílico*, FC: 0,63).

Finalmente, observamos metabolitos cerebrales alterados por el CC que la suplementación con Se no puede antagonizar o incluso parece tener una acción sinérgica: glicerofosfolina (GPCh) (*glicerofosfolípido*, *glicerofosfolina*, FC: 0,65), 9,11alfa-epoxi-6alfa-acetoxi-colest-7-en-3beta,5alfa,19-triol (*esterol*, *derivado del colesterol*, FC: 7,96), (8Z,d18:1) esfingosina (*esfingolípidos*, *base esfingoide*, FC: 0,02), espiramicina 1 (*compuesto organooxygenado*, *derivado de carbohidrato*, FC: 0,16), PC(15:0/22:5) (*fosfolina*, *glicerofosfolina*, FC: 0,02), ácido UDP-N-acetil-D -

galactosaminurónico (*azúcar de nucleótido de pirimidina*, FC: 0,94), ácido 3-hidroxi-isoheptanoico (*ácidos grasos y conjugados*, FC: 0,65), adenosina (*nucleósido de purina*, 0,18), ácido aspártico (*aminoácido*, FC: 16,18), ácido benzoico (*derivados del benceno*, FC: 71,44), glutamina (*derivado del ácido carboxílico, aminoácido*, FC: 0,74), glicina (*derivado del ácido carboxílico, aminoácido*, FC: 0,91), mioinositol (*compuesto organooxygenado, alcoholes y polioles*, FC: 0,30), ácido N-acetil-aspártico (*aminoácido excitador*, FC: 3,21), ácido esteárico (*ácidos grasos, ácidos grasos y conjugados*, FC: 0,06), treonina (*ácido carboxílico y derivados, aminoácido*, FC: 43,73) y urea (*ácidos carbónicos orgánicos y derivados, ureas*, FC: 14,48).

Cabe mencionar que no se pudo calcular el FC de varios metabolitos por estar ausentes en el grupo C, como es el caso de la FLQ, un fármaco incluido en el cóctel químico que no estaba presente en los ratones del grupo C y, por tanto, no hay FC para su comparación con los otros dos grupos, CC vs C o CC-Se vs C (Tabla 3, en Anexo 1). Los metabolitos ausentes en C fueron: FLQ (*quinolonas y derivados*, FC: 1,27), PI-cer (d20:0/16:0) (*fosfoesfingolípido, ceramida fosfoinositol*, FC: 1,96), PI-cer (d20:0/18:0) (FC: 1,62), neolinderatona (*policétidos, flavanonas* FC: 1,55), sabinona (*lípidos prenil, monoterpénidos*), 2,4,6-octatrienal (*ácidos grasos, aldehído*), 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihidroxi-23,24-didehidrovitamina D3 (*derivados de la vitamina D*), alopurinol (*pirazolopiridiminas*, FC: 4), isonuatigenina 3-[ramnosil-(1-2)-glucósido] (*esteroides, glicósidos esteroideos*) y anandamida (22:6,n-3) (*etanolaminas, N-aciletanolamina*).

Nuestros resultados demostraron que la exposición al CC afecta fuertemente al metaboloma cerebral mediante la regulación positiva o negativa de metabolitos que pertenecen a clases de compuestos muy relacionados con la función cerebral, como aminoácidos excitatorios, ceramidas, ácidos grasos y monoglicéridos, entre otros, y que la suplementación con Se moduló las alteraciones.

El ácido N-acetil aspártico se alteró por la exposición al CC, pero la suplementación con Se moduló los niveles al C. El aminoácido excitatorio ácido N-acetil aspártico, representa alrededor de una milésima parte del peso húmedo del cerebro humano y parece estar restringido únicamente a las neuronas, estando involucrado en funciones importantes

como la producción de mielina, la regulación de la síntesis de proteínas neuronales o el metabolismo de varios neurotransmisores como el aspartato o el N-acetil-aspartil-glutamato [208].

El ácido fosfórico también se alteró por la exposición a CC y se moduló por la suplementación con Se, pero curiosamente en otros estudios, este metabolito se alteró tras suplementación con Se en ratones no expuestos [99].

La suplementación con Se también moduló los cambios de la cer cerebral cer(d16:1/24:0) por el CC. Las ceramidas son precursoras de todos los esfingolípidos complejos, cuyos niveles intracelulares deben ajustarse con precisión ya que los cambios en el perfil esfingolípido-ceramida juegan un papel en el desarrollo de trastornos neurológicos, relacionados con la edad y neuroinflamatorios [209]. Otros metabolitos regulados a la baja por CC y modulados por la suplementación con Se pertenecieron a las clases de compuestos de monoglicéridos y acilos grasos, que también son importantes para el cerebro [99]. Por otro lado, hubo otros metabolitos como spisulosine, xestoaminol C, 5-oxoavermectin "2a" aglycone, decanamide, 3-oxo2-pentyl-cyclopentanehexanoic acid, 9-oxo-2,4,5,7-decatetranoic acid, PS(14:0/22:0), PE(14:0/P-18:0), PS(20:4/22:6) and malic acid, fueron modulados por la suplementación de Se en ratones expuestos que no se vieron afectados por el CC en ratones alimentados con dieta de roedores.

Asimismo, la suplementación de Se aumentó la concentración en el cerebro de los esfingolípidos espisulosina, que inhiben la proliferación de numerosas líneas celulares cancerosas [210] y, xestoaminol C, que afectan a la resistencia de los vasos renales y mesentéricos de rata a través del receptor acoplado a proteína G [211]. Esta suplementación también afectó a los niveles cerebrales de neurotransmisores, acilos grasos, ácidos grasos de cadena media, el ácido málico y varios glicerofosfolípidos, incluidos PS y PE, cuya composición es muy importante para la funcionalidad, fluidez y permeabilidad de las membranas neuronales. Se conoce que las alteraciones en la composición de glicerofosfolípidos de la membrana neuronal ocurren en trastornos neurológicos [212].

Curiosamente, la exposición al CC redujo considerablemente los niveles cerebrales de PC(15:0/22:5) y (d18:1)esfingosina que se ha asociado con un estado alterado en las células cerebrales [213, 214] y (d18:1)esfingosina. Por otra parte, la exposición a CC aumentó los niveles de ácido aspártico, considerado uno de los principales aminoácidos excitatorios en el SNC [27] y que fue encontrado alterado en condiciones adversas como exposición a As o a Polibromodifenil éteres [215, 216], de ácido benzoico, conocido por estar regulado positivamente después de la exposición al As [217] y se excreta principalmente por los riñones, de treonina encontrada elevada en algunos estudios como respuesta a la neurotoxicidad, así como en un modelo de EA [218, 219] y de urea que se encontraba aumentada en suero sanguíneo después del tratamiento con Abx [220].

Adicionalmente, también se evaluaron las rutas metabólicas alteradas en el grupo CC y CC-Se utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0 (*metaboanalyst.ca*). Este análisis mostró 6 rutas significativamente alteradas en el metaboloma del cerebro del ratón tras la exposición a CC (Figura 27 A) incluyendo la biosíntesis de arginina y aminoacil-ARNt, y los metabolismos de glicina, serina y treonina, alanina, aspartato y glutamato, glioxilato y dicarboxilato y purina. Por lo demás, las vías alteradas de forma más significativa tras la exposición al CC en ratones suplementados con Se (Figura 27 B) fueron la biosíntesis de arginina y aminoacil-ARNt y el metabolismo de glicina, serina y treonina.

Estos resultados mostraron que la suplementación con Se mejoró varias vías metabólicas afectadas por la exposición al CC. Asimismo, la suplementación con Se mejoró el impacto del CC en el metabolismo de las purinas, el metabolismo de los glicosilatos y dicarboxilatos, el metabolismo de los glicerofosfolípidos, el metabolismo de la alanina, el aspartato y el glutamato. Por otra parte, la suplementación con Se actúa principalmente en la biosíntesis de ácidos grasos insaturados, el metabolismo de la glicina, la serina y la treonina, la biosíntesis de la valina, la leucina y la isoleucina y el metabolismo del ascorbato y el aldarato.

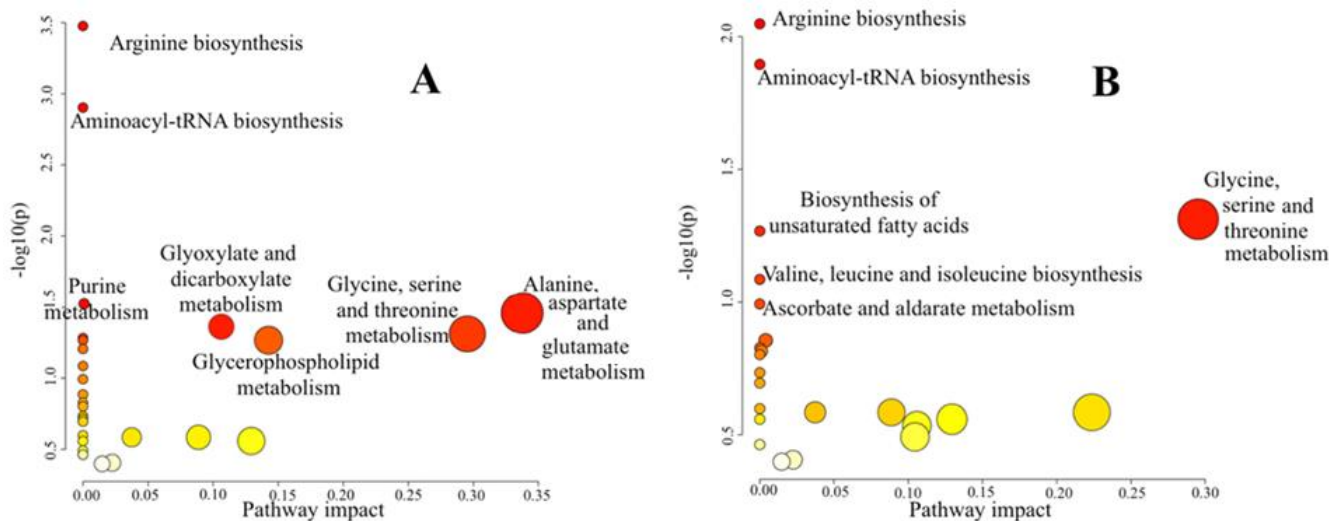


Figura 27. Gráficos de análisis de vías que muestran las rutas metabólicas más deterioradas en los grupos ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se). A) Gráficos de análisis de vías que muestran las rutas metabólicas más deterioradas en los grupos CC y B) CC-Se. Los valores *p* calculados a partir del análisis de enriquecimiento se indican mediante un gradiente de color: desde blanco (valor *p* más alto) hasta rojo (valor *p* más bajo), mientras que el valor de impacto de la vía calculado a partir del análisis de topología de la vía se indica mediante el tamaño del punto.

En este estudio también realizamos el análisis de correlación del metaboloma cerebral de los grupos de estudio con la abundancia de la microbiota intestinal. En este sentido, observamos que metaboloma cerebral está asociado con la microbiota intestinal y se modula con la exposición al “cóctel químico” y la suplementación con Se.

En trabajos anteriores, describimos cambios en la composición y diversidad de la microbiota intestinal en ratones como resultado de la suplementación con Se en modelos de ratones convencionales y con microbiota empobrecida [97], así como tras la exposición a CC y/o suplementación con Se [101]. Además, demostramos que la suplementación con Se es capaz de aumentar la abundancia relativa de varios taxones relevantes para la salud, especialmente en el modelo de ratones con microbiota empobrecida [97].

En nuestro estudio, determinamos un total de 66 géneros diferentes y su abundancia relativa (Tabla 4) en los grupos de ratones C, CC y CC-Se.

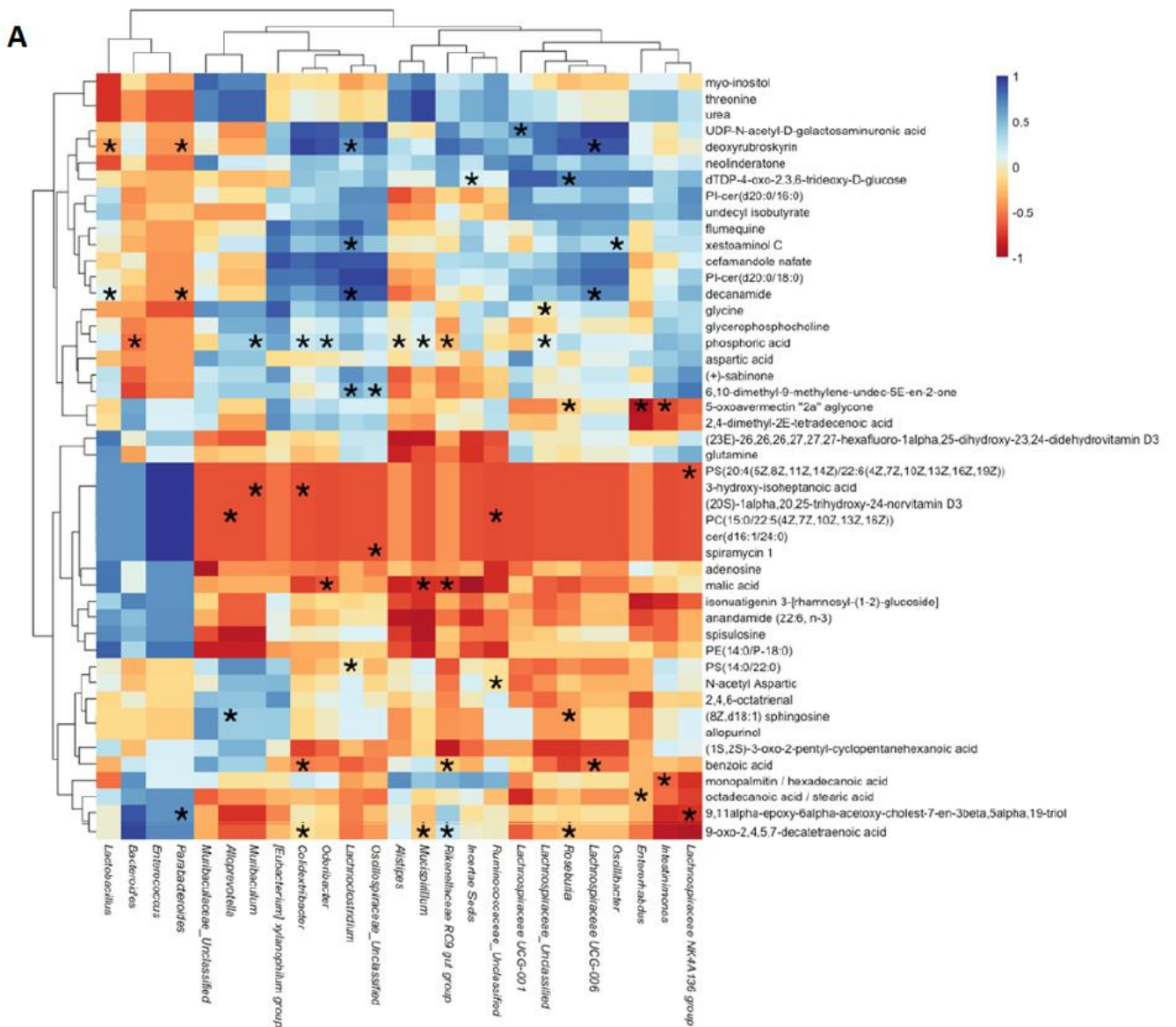
Tabla 4. Abundancia de taxones a nivel de género en los grupos de ratones control (C), ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

Taxa	C	CC	CC-Se
<i>Lachnospiraceae NK4A136 group</i>	35.310	17.438	14.510
<i>Bacteroides</i>	1.310	5.175	4.870
<i>Lactobacillus</i>	1.940	9.288	13.430
<i>Alloprevotella</i>	1.480	4.850	3.810
<i>[Eubacterium] xylanophilum group</i>	3.570	0.825	0.710
<i>Lachnospiraceae_Unclassified</i>	17.550	11.188	13.440
<i>Muribaculaceae_Unclassified</i>	6.760	25.038	18.080
<i>Roseburia</i>	3.440	1.450	1.780
<i>Lachnospiraceae A2</i>	0.730	0.175	0.080
<i>Tannerellaceae_Unclassified</i>	0.040	0.188	0.180
<i>Oscillibacter</i>	1.180	1.338	2.630
<i>Lachnospiraceae UCG-006</i>	2.950	0.950	1.140
<i>Lachnoclostridium</i>	6.690	1.388	2.650
<i>[Clostridium] innocuum group</i>	0.000	0.000	0.070
<i>Enterococcus</i>	0.000	2.988	3.770
<i>Mucispirillum</i>	0.390	0.963	2.160
<i>Muribaculum</i>	0.170	1.375	2.180
<i>Odoribacter</i>	1.630	1.500	1.710
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	0.970	0.438	0.020
<i>Escherichia-Shigella</i>	0.020	0.000	0.040
<i>Lachnospiraceae UCG-001</i>	2.310	3.213	0.890
<i>Parabacteroides</i>	0.020	1.850	0.380
<i>Alistipes</i>	1.250	0.175	0.070
<i>Anaerotruncus</i>	0.510	0.038	0.040
<i>Colidextribacter</i>	0.800	0.763	0.890
<i>Intestinimonas</i>	0.430	0.475	1.150
<i>Erysipelatoclostridium</i>	0.000	0.025	0.010
<i>Bilophila</i>	0.250	0.288	0.330
<i>Oscillospiraceae_Unclassified</i>	0.540	1.688	3.050
<i>Streptococcus</i>	0.290	0.000	0.110
<i>Lachnospiraceae GCA-900066575</i>	0.360	0.275	0.250
<i>Anaeroplasma</i>	0.000	0.750	0.320
<i>Lachnospiraceae FCS020 group</i>	0.120	0.163	0.720

<i>Enterorhabdus</i>	1.500	0.075	0.140
<i>Erysipelotrichaceae Unclassified</i>	0.370	0.063	0.090
<i>[Eubacterium] coprostanoligenes group Unclassified</i>	0.080	0.025	0.020
<i>Peptococcaceae Unclassified</i>	0.210	0.213	0.230
<i>[Eubacterium] siraeum group</i>	0.420	0.075	0.060
<i>Clostridia UCG-014 Unclassified</i>	0.430	0.063	0.040
<i>Ruminococcaceae Unclassified</i>	0.600	0.438	0.610
<i>Butyricococcus</i>	0.480	0.150	0.100
<i>Ruminococcus</i>	0.500	0.250	0.040
<i>Coriobacteriaceae UCG-002</i>	0.000	0.138	0.620
<i>Oscillospiraceae UCG-003</i>	0.330	0.263	0.090
<i>Anaerovoracaceae Family XIII UCG-001</i>	0.190	0.025	0.040
<i>Acetatifactor</i>	0.140	0.325	0.350
<i>Incertae Sedis</i>	0.390	0.413	0.800
<i>Merdibacter</i>	0.010	0.013	0.020
<i>Prevotellaceae UCG-001</i>	0.270	0.025	0.000
<i>Clostridia vadinBB60 group Unclassified</i>	0.020	0.450	0.550
<i>Lachnospiraceae ASF356</i>	0.000	0.163	0.280
<i>[Eubacterium] brachy group</i>	0.130	0.000	0.010
<i>Marvinbryantia</i>	0.020	0.075	0.080
<i>Oscillospira</i>	0.110	0.075	0.010
<i>Parvibacter</i>	0.190	0.013	0.010
<i>Oscillospirales UCG-10 Unclassified</i>	0.070	0.063	0.010
<i>Tyzzarella</i>	0.010	0.050	0.130
<i>Citrobacter</i>	0.010	0.000	0.000
<i>Oscillospiraceae UCG-005</i>	0.080	0.000	0.000
<i>Oscillospiraceae NK4A214 group</i>	0.010	0.000	0.000
<i>Peptococcus</i>	0.020	0.000	0.000
<i>Dorea</i>	0.010	0.000	0.000
<i>Butyricococcaceae UCG-009</i>	0.020	0.025	0.000
<i>Christensenellaceae Unclassified</i>	0.000	0.000	0.010
<i>Harryflintia</i>	0.000	0.000	0.020
<i>Ruminococcaceae UBA1819</i>	0.080	0.000	0.000

Encontramos asociaciones específicas (Figura 28) entre la abundancia relativa de los géneros bacterianos y los metabolitos cerebrales en los diferentes grupos experimentales.

Nuestros resultados sugieren que el metaboloma cerebral está relacionado con la composición de la microbiota intestinal y que esas asociaciones se ven alteradas por la exposición al CC y modificadas por la suplementación con Se.



suplementación con Se (*por ejemplo, grupo Lachnospiraceae NK4A136, Lactobacillus, Mucispirillum*, varios miembros de las familias *Oscillospiraceae, Peptococcaceae, Muribaculaceae, Tannerellaceae*)

(ii) Observamos géneros en el que disminuyeron las asociaciones con el metaboloma cerebral tras la exposición al CC, pero aumentaron después de la suplementación con Se (*por ejemplo, Roseburia*)

(iii) Observamos géneros sin ninguna asociación con el metaboloma cerebral después de la exposición al CC, pero que aumentaron ampliamente después de la suplementación con Se (*por ejemplo, Escherichia-Shigella, Lachnospiraceae UCG-001, Intestinimonas, Enterorhabdus, Acetatifactor*).

Encontramos así asociaciones específicas entre *el grupo NK4A136 de la familia Lachnospiraceae* y dos metabolitos cerebrales en el grupo C, 9,11-epoxy-6-acetoxy-cholest-7-en-3,5,19-triol y Ps(20:4/22:6), mientras que en el grupo CC aumentaron hasta 7 correlaciones negativas con metabolitos cerebrales incluyendo PS(20:4/22:6), cer(d16:1/24:0), PC(15:0/22:5) (fosfatidilcolina), ácido 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoico y ácido 3-hidroxi-isoheptanoico (ácidos grasos y conjugados) y (20 S)- 1,20,25-trihidroxi-24-norvitamina D3 (vitamina liposoluble).

Después de la suplementación con Se de ratones CC, *el grupo NK4A136 de la familia Lachnospiraceae* se asoció con mioinositol (compuesto organooxigenado), ácido aspártico (neurotransmisor) y monopalmitina (monoglicérido). El género *Lactobacillus* también incrementó las asociaciones con metabolitos cerebrales en el grupo CC siendo las correlaciones más significativas (principalmente positivas) con casi los mismos metabolitos cerebrales que *el grupo Lachnospiraceae NK4A136*, tales como PS(20:4/22:6), cer(d16:1/24:0), PC(15:0/22:5), 1,20,25-trihidroxi-24-norvitamina D3 y otros nuevos metabolitos incluyendo ácido 3-hidroxi-isoheptanoico (ácidos grasos y derivados), ácido málico (ácido dicarboxílico), prolina (aminoácido) y urea (ácidos carbónicos orgánicos y derivados). Después de la suplementación con Se, este género resultó asociado positivamente con monopalmitina y negativamente con PI-cer(d20:0/18:0) (fosfatidilinositol ceramida) y ácido 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoico (ácidos grasos y conjugados).

Entre estos géneros, el grupo *Lachnospiraceae* NK4A136 ha sido previamente considerado como un potencial productor de butirato y, por lo tanto, un objetivo terapéutico prometedor en la demencia porque es menor en estos pacientes en comparación con los controles [221].

Otro género ampliamente asociado con metabolitos cerebrales es el género *Lactobacillus*, un taxón potencialmente relevante para la salud, que también aumentó después de la suplementación con Se según nuestros resultados anteriores [97].

El género *Mucispirillum* también se asoció negativamente después de la exposición a CC, con 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihidroxi-23,24-didehidrovitamina D3 cerebral (derivado de la vitamina D3) así como con anandamida (22:6, n-3) (endocanabinoide) y treonina (aminoácido), mientras que después de la suplementación con Se este género solo se asoció con monopalmitina. Este género se ha relacionado con la actividad de los espermatozoides y la testosterona, así como con la glutatión peroxidasa y la selenoalbúmina en el tejido testicular [100].

Las asociaciones de *Roseburia* con metabolitos cerebrales disminuyeron a solo una correlación negativa con ácido benzoico en el cerebro después de la exposición a CC y a tres asociaciones después de la suplementación de Se con ácido 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoico, monopalmitina y mioinositol. Este género se ha relacionado previamente con síntomas depresivos en pacientes con el índice de masa corporal (IMC) en pacientes con anorexia nerviosa [222] y con trastorno depresivo mayor [223].

Los géneros *Escherichia-Shigella*, *Lachnospiraceae* UCG-001 e *Intestinimonas* no presentaron asociaciones con el metaboloma cerebral tras la exposición a CC, pero sí con los metabolitos cerebrales tras la suplementación con Se. Así, el primer género se asoció, tras la suplementación con Se, con ácido fosfórico y ácido 3-hidroxi-isoheptanoico, mientras que el segundo con cuatro metabolitos entre ellos Fosfatidiletanolamina (PE) (14:0 P-18:0), PS (20:4/22:6), ácido N-acetil aspártico y nafato de cefamandol y, el último, con ácido aspártico y ácido benzoico.

Se conoce que el género *Escherichia-Shigella* se ha asociado con las hormonas sexuales del sistema endocrino reproductivo, así como con la selenoproteína P testicular [100].

Finalmente, destacar que encontramos metabolitos cerebrales específicos correlacionados con múltiples grupos bacterianos, especialmente tras la suplementación con CC y/o Se. Estos metabolitos se han relacionado previamente con importantes funciones cerebrales y neurotoxicidad. Entre ellos, la PS (20:4/22:6) y la PS(14:00/22:0) se asociaron con varios géneros tras la exposición al CC y después de la suplementación con Se. En general, los PS son necesarios para las membranas de las células nerviosas y la mielina [224]. Específicamente, la PS(20:4/22:6), que consiste en una cadena de ácido araquidónico y una cadena de ácido docosaheptaenoico, es a PS de mayor concentración encontrada en la mielina del tejido cerebral [225].

Por otra parte, la GPCh correlacionó con varios géneros en los grupos C y CC-Se, y la PC (15:0/22:5) en los grupos CC y C. Es sabido que durante la neurodegeneración, los fosfolípidos de membrana se descomponen y aumentan los metabolitos de colina (Ch). Estos son los metabolitos solubles en agua de PC e incluyen GPCh, PCh y Ch [226].

Las *ceramidas* cer(16:1/24:0) y la cer(20:0/18:0) se asociaron con varios géneros en los grupos CC y CC-Se, así como sus ceramidas de PI correspondientes (PI-cer(20:0/18:0) y PI-cer(16.1:24:0), que pertenece a la clase de *fosfoesfingolípidos*. El *esfingolípido* psicósina también se asoció con varios géneros en C. Las ceramidas son precursoras de esfingolípidos así como poderosas moléculas de señalización que median procesos cruciales en la fisiopatología celular [209]. La alteración del perfil de esfingolípidos-ceramidas ha dado lugar al desarrollo de enfermedades neurológicas relacionadas con la edad y neuroinflamatorias [209]. Los derivados de la vitamina D3 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihidroxi-23,24-didehidrovitamina D3 y 1,20,25-trihidroxi-24-norvitamina D3 se asociaron principalmente de forma negativa con varios géneros en los grupos CC y CC-Se. El efecto de 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1,25-dihidroxi-23,24-didehidrovitamina D3 sobre la expresión de genes sensibles a la vitamina D en ratones deficientes en vitamina D se ha informado previamente [227].

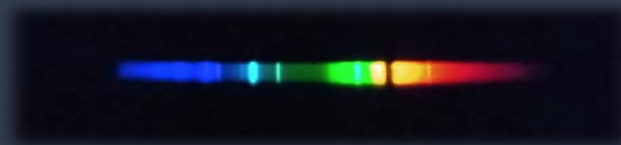
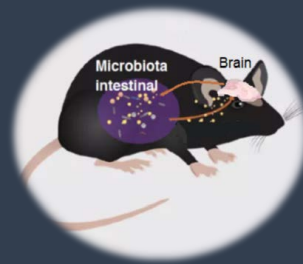
De hecho, la vitamina D tiene propiedades neuroprotectoras, modula el sistema inmunológico y ayuda a la homeostasis del calcio (Ca). También tiene un papel en la regulación de una amplia cantidad de genes que son cruciales para el funcionamiento

del cerebro. Aunque la vitamina D está clasificada como una vitamina, actúa también como un neuroesteroide y tiene un papel clave en el cerebro [228].

Como conclusión al capítulo, mencionar que la plataforma metabolómica no dirigida basada en la combinación de GC-MS y UHPLC-QTOF-MS para determinar el metaboloma cerebral de ratones expuestos a un CC, reveló importantes alteraciones que fueron moduladas por la suplementación con Se. En este sentido observamos alteración en compuestos clave para la función cerebral como aminoácidos excitatorios, ceramidas, ácidos grasos y monoglicéridos, entre otros. Además, se determinaron nuevas asociaciones entre los metabolitos cerebrales y los microbios intestinales que sugieren un mecanismo entrelazado, pero también desaparecieron o cambiaron después de la suplementación con Se.

Nuestros resultados demuestran que existe una posible interacción clave entre la ingesta de Se, la microbiota y los metabolitos cerebrales con efectos sobre la salud del huésped en múltiples niveles, incluido el eje intestino-cerebro y la salud reproductiva. Sin embargo, es necesario determinar el vínculo preciso y se necesitan más estudios dirigidos a los mecanismos específicos.

ARTÍCULO 1





Mice brain metabolomics after the exposure to a “chemical cocktail” and selenium supplementation through the gut-brain axis

C. Parra-Martínez^a, M. Selma-Royo^b, B. Callejón-Leblic^a, M.C. Collado^{b,1}, N. Abril^{c,1}, T. García-Barrera^{a,1,*}

^a Research Center of Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA). Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007 Huelva, Spain

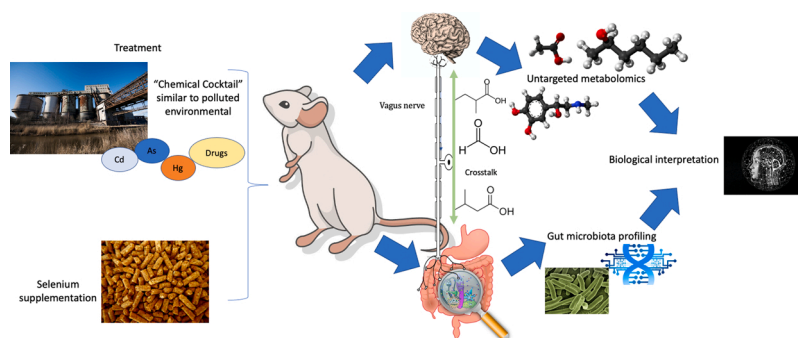
^b Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC), Department of Biotechnology, Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, E-14071 Córdoba, Spain

HIGHLIGHTS

- “Chemical cocktails” altered mainly mice brain lipids and aminoacids pathways.
- Se intake, gut microbiota and brain metabolites interact affecting host health.
- Several gut microbes are associated with specific brain metabolites.
- Selenium antagonized several brain metabolites impaired by the “chemical cocktail”.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Jörg Rinklebe

Keywords:

Brain metabolomics
Selenium
Chemical cocktails

ABSTRACT

Several environmental pollutants have been shown to damage brain and affect gut microbiota. Limited evidence is available about the impact of “chemical cocktails” (CC) of xenobiotics on brain metabolome and their possible influence in the gut-brain crosstalk. To this end, BALB/c mice were exposed to heavy metals (As, Hg, Cd) and pharmaceuticals (diclofenac and flumequine) under regular rodent diet or supplemented with selenium (Se). Selenium, an antioxidant well-known for its antagonism against the neurotoxicity of several pollutants,

Abbreviations: C, control mice group fed rodent diet; CC, mice fed regular diet exposed to the chemical cocktail; CC-Se, mice fed Se supplemented diet exposed to the chemical cocktail; CC-Abx, antibiotic treated-mice fed regular diet exposed to the chemical cocktail; CC-Abx-Se, Antibiotic treated-mice fed Se supplemented diet exposed to the chemical cocktail; KRI, Kovat’s retention indexes; FC, Fold change; PE, phosphatidylethanolamine; PC, phosphatidylcholine; PS, phosphatidylserine; cer, ceramide; PI, phosphatidylinositol; GPCh, glycerophosphocholine; PCh, phosphocholine; Ch, choline; BMI, body mass index; AN, anorexia nervosa; QC, quality control samples; PCA, Principal Components Analysis; CID, collision-induced dissociation; EI, electronic impact; MSTFA, N-methyl-N-(trimethylsilyl)tri-fluoroacetamide; MTBE, Methyl tertiary-butyl ether; DCF, diclofenac; FLQ, flumequine; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry; UHPLC-QTOF, ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight; PCAs, polycyclic aromatic compounds; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; CNS, central nervous system; AD, Alzheimer’s disease; BBB, blood brain barrier; As, arsenic; HG, Mercury; Cd, Cadmium; Se, Selenium.

* Corresponding author.

E-mail address: tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera).

¹ Senior authors

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129443>

Received 29 April 2022; Received in revised form 8 June 2022; Accepted 20 June 2022

Available online 25 June 2022

0304-3894/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Metallomics
Gut microbiota

modulated several brain metabolic impairments caused by CC (e.g., brain levels of the excitatory amino acid N-acetyl aspartic acid) by influencing mainly the metabolisms of purine, glycosylate and dicarboxylate, glutamate, glycerophospholipid, alanine and aspartate. Numerous associations were obtained between brain metabolites and gut microbes and they changed after Se-supplementation (e.g., *Lactobacillus* was positively associated with a brain ceramide, phosphoserine, phosphocholine, vitamin D3 derivative, fatty acids, malic acid, amino acids, and urea after the exposure, but not after Se-supplementation). Our results showed numerous evidences about the impact of CC on brain metabolome, the potential role of Se as an antagonist and their impact on the gut-brain axis. Further research is needed to understand the complex mechanism of action implied on CC-brain-microbiota interactions.

1. Introduction

Brain is an organ especially prone to be damaged by environmental pollutants in spite of the blood brain barrier (BBB), which prevents non-selective crossover of compounds in the circulating blood into the extracellular fluid of the central nervous system (CNS), where neurons dwell (Iqbal et al., 2020). Mercury (Hg) is one of the most widely known neurotoxic (Glaser et al., 2010), especially organic chemical species (Clarkson and Magos, 2006), but arsenic (As) can also induce neurotoxic effects such as encephalopathy, peripheral neuropathies, neurobehavioral alterations, and it has also been associated with neurodegeneration (Garza-Lombó et al., 2019; Grau-Perez et al., 2018). Also cadmium (Cd) has been linked to neurodegenerative diseases including Alzheimer's (AD) and Parkinson's diseases, multiple and amyotrophic lateral sclerosis (Branca et al., 2018). However, living beings are exposed to a multifaceted environment where pollutants can interact though antagonistic or synergistic mechanisms (García-Barrera et al., 2012; García-Sevillano et al., 2013a). Likewise, selenium (Se) is a recognized antagonist against Hg (García-Sevillano et al., 2015), As (Zwolak, 2020; García-Sevillano et al., 2013b) and Cd (Rodríguez-Moro et al., 2020), but also they can interact between each other (e.g., Cd and As (García-Sevillano et al., 2014a) or As, Cd and Hg (García-Sevillano et al., 2014b)). Moreover, Se-supplementation has been shown to reduce the A β plaque deposition in the mouse brain (model APP/PS1) (Lovell et al., 2009) as well as the oxidative stress in the CNS, ameliorating the effects of AD (Iqbal et al., 2018). Recently, it has been pointed out that the nonsteroidal anti-inflammatory (NSAID) drug diclofenac (DCF) reduces the risk of AD (Stuve et al., 2020). Se-supplementation also has an impact on gut microbiota diversity, richness and composition (Arias-Borrego et al., 2019; Hrdina et al., 2009; Kim and Combs, 1997; Kasaikina et al., 2011; Zhai et al., 2018). Likewise, previous works with non-exposed Se-supplemented mice reported the connection of gut microbes with plasma selenoproteome and trace metal homeostasis (Callejón-Leblic et al., 2021), gut metabolites (Callejón-Leblic et al., 2022), testicular metabolome and selenoproteome (Ramírez-Acosta et al., 2022a) as well as brain metabolome and selenoproteome (Ramírez-Acosta et al., submitted for publication). Moreover, there is growing evidence about the crosstalk between gut microbiota through the so-called gut-brain axis (Burokas et al., 2015). However, the role of "chemical cocktails" on shaping brain metabolome and the possible connection with gut microbiota has not been precisely linked.

Herein, we studied the impact of a "chemical cocktail" including As, Cd, Hg and pharmaceuticals (PACs, flumequine and DCF) as well as Se-supplementation on mice brain metabolome and the associations with gut microbiota.

2. Experimental section

2.1. Animals, experimental design and dosage information

Animal handling was carried out at the Animal Experimentation Service of the University of Cordoba (SAEX-UCO), by qualified staff and following the European Community animal care guidelines. This work has received approval for research ethics from Ethical Committee of the

University of Córdoba and Regional Government of Andalusia (Spain) and a proof/certificate of approval is available upon request (Code Num. 02-01-2019-001). The study design has already been described. Briefly, 8 weeks-male *Mus musculus* BALB/c mice were then randomly divided into three groups (n = 12): C, CC, and CC-Se and housed in pairs under controlled laboratory conditions for a total of 3 weeks, with free access to food and water as described previously (Callejón-Leblic et al., 2022). Mice in the control (C) group were fed a regular diet thorough the study. All mice, except the controls, received a mixture of flumequine-FLQ and DCF in the chow and Hg, Cd and As in the drinking water. The concentrations of DCF, FLQ, As, Cd and Hg were calculated for mice receiving daily doses of 20, 625, 3, 0.1, and 1 mg/kg, respectively, consistent with concentrations of environmental relevance (Fekadu et al., 2019; González-Gaya et al., 2022; Huygens et al., 2022). The chow of mice in the group CC-Se contained a Se supplement (sodium selenite, 0.65 mg/kg) (Zarrinpar et al., 2018; D'Amato et al., 2020). Fig. S1 summarizes the animal exposure experimental design.

2.2. Brain tissue preparation for metabolomic analysis

Sample preparation was carried out by a previously described method (Ramírez-Acosta et al., submitted for publication). Briefly, brain tissues were cryohomogenized into a ceramic mortar with liquid nitrogen. An amount of 30.0000 mg were weight, placed and homogenized into a 2 mL cryotube of a TissueLyser LT homogenizer (Qiagen, Germany) by adding a cold mixture (-20 °C) of methanol/water (1:1, v/v). Metabolites were extracted from a 100 μ L aliquot of the homogenate that was vortex mixed during 1 h with 400 μ L of 80:20 (v/v) methanol/methyl *tert*-butyl ether (MTBE). Then, extracts were centrifuged at 4000 g for 20 min at 20°C and the supernatants were separated. Two equal aliquots were separated for UHPLC-MS and GC-MS analysis and then, dried using SpeedVac concentrator system (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Prior to GC-MS analysis, the dried extracts were submitted to derivatization in two steps, namely: (i) methoxylation, for the protection of carbonyl groups, by adding 50 μ L of methoxyamine hydrochloride in pyridine at 20 mg mL⁻¹ and incubating for 15 min at 80°C. (ii) Silylation, by adding 50 μ L of N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and incubating under the same conditions. For UHLC-MS analysis, the dried extracts were reconstituted in methanol:MTBE (80:20, v/v) and directly injected into the loop. To assess the stability of the analyses and reproducibility, quality control (QC) samples were prepared by pooling equal quantities of all brain extracts.

2.3. GC-MS metabolomic analysis

Gas chromatographic analysis was performed on a Trace GC ULTRA model gas chromatograph coupled to an ion trap mass spectrometer model ITQ900 (Thermo Fisher Scientific), using a Factor Four capillary column VF-5MS 30 m \times 0.25 mm ID, with 0.25 μ m of film thickness (Agilent technologies, Tokyo, Japan). The temperature of the column was initially set at 100 °C for 0.5 min and then ramped to 320 °C at 15 °C min⁻¹ maintained for 2.8 min. Helium was used as a carrier gas supplied into the system at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. Injector

temperature was set to 200 °C. Ionization of metabolites into the mass spectrometer was accomplished by electronic impact (EI) at 70 eV with a temperature filament of 230 °C. To avoid the noisy signal of a big band from the solvent and other non-separated peaks, the filament was turned off for the first 4 min of the chromatogram. Finally, 1 µL of previously prepared metabolomic extract was injected in splitless mode and monitored in full scan mode in the m/z range 35–650.

2.4. UHPL-QTOF metabolomic analysis

A liquid chromatograph model Agilent 1290 Series equipped with a well-plate autosampler was used coupled to a QTOF model 6550 iFunnel system with a dual electrospray ion source handled in both positive and negative ionization modes (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). In order to achieve a good separation of metabolites an inverse phase chromatography was performed with a mobile phase gradient of (A) water and (B) methanol/2-propanol (85:15, v/v). The analysis was carried out with a gradient from 82% to 100% of mobile phase B at a flow-rate of 0.4 mL min⁻¹. Thus, 5 µL of extracted brain samples were injected into an Agilent InfiniteLab Poroshell 120 EC-C18 chromatographic column (150 × 2.1 mm, 2.7 µm, Agilent Technologies) thermostated at 60°C. The reference masses m/z 121.0509 and 922.0098, were constantly introduced into the system for mass correction in positive mode while the reference masses m/z 1033.9881 and 112.9856 were introduced for mass correction in negative ionization mode.

Full scan mode was recorded in the range of 100–1200 m/z . Other parameters were set as follows: capillary voltage (3.5 KV), drying gas flow rate (14 L min⁻¹), temperature (200 °C), gas nebulizer pressure (35 psi), sheath gas (350 °C) and flow-rate (11 L min⁻¹). For positive and negative ionization modes, the fragmentor voltage was adjusted at 380 V. We used the Agilent Targeted MS/MS mode from MassHunter Data Acquisition software, to analyze a list containing the most significant metabolites. To this end, MS/MS scan rate was set at 1 spectrum s⁻¹ with the same chromatographic conditions above described, using nitrogen as collision gas and voltages in the range of 10–40 V for the fragmentation of compounds. Data were acquired with a scan rate of 1.0 spectrum/second at centroid mode.

2.5. Annotation of brain metabolites

Data processing and statistical analysis was carried out as previously described (See [supporting information, Table S1](#)). For GC-MS metabolomic analysis, the version 8 NIST Mass Spectral Library was used to annotate metabolites, selecting only those with a probability > 80%. Target ions and at least two qualifiers (identifier ions) were selected from each mass spectrum. Those metabolites with a variation less than 20% in the area qualifier/target ion ratio per metabolite were selected. Kovats retention indexes (KRI) were calculated for the metabolites using a mixture of alkanes from C7-C40 (Sigma Aldrich, Germany). For UHPLC-QTOF-MS metabolomic analysis, the software MassHunter version B.08.00 was used. To this end, the workflow “Compound Discovery” and the compound mining “Find by Molecular Features” were applied to the dataset. METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) and HMDB (<http://hmdb.ca>) databases were used considering only those metabolites with a score higher than 90%. In addition, MS-MS experiments were performed with the same experimental conditions as applied for the primary analysis. Collision-induced dissociation (CID) fragmentation was used.

2.6. Gut microbiota profiling

Gut contents were sampled immediately after the killing of the mice and frozen in liquid N₂. Aliquots of 80–100 mg were used for DNA isolation (Arias-Borrego et al., 2022). The gut microbiota profile obtained by 16 S rRNA amplicon sequencing previously described (Arias-Borrego et al., 2022) was used to combine with brain metabolomics in order to identify specific associations between brain

metabolites and gut microbes shaped by the animal supplementation groups. Briefly, gut microbiota profiling was performed by the sequencing of the V3-V4 variable region of the 16 S rRNA gene following Illumina protocols. Amplicons were sequenced on a MiSeq-Illumina platform (FISABIO sequencing service, Valencia, Spain) using a 2 × 300 bp paired-end run (MiSeq Reagent kit v3). Negative control was included. Raw reads were processed and managed with the DADA2 pipeline and taxonomy was assigned with Silva v132 database. Tables with taxonomy at different levels (phylum, family and genus) were used for the integration with the available data in this study.

3. Results

3.1. Survival

Exposure to the contaminant cocktail resulted in a lethality of about 25% in animals consuming normal feed during treatment (CC vs C), which was reduced to 15% in mice that consumed a Se-supplemented diet. A Kaplan-Meier analysis (XLStat software, v. 2020.2.2.6533, Addinsoft) of the overall survival (OS) curves indicated that mice at the CC group had a significantly ($p = 0.016$) worse OS than their control counterparts. In contrast, the OS of mice in the CC+Se group did not differ from control ($p = 0.136$). The survival distribution functions and the results of the Kaplan-Meier analysis are shown in the [Fig. S2](#).

3.2. Brain Mice Metabolome After Selenium Supplementation and Microbiota Depletion

Brain metabolomes were determined using the multiplatform based on UHPLC-QTOF-MS and GC-MS analysis, combining positive and negative ionization modes. The metabolomic analysis was evaluated using 6 quality control samples (QC). Principal Components Analysis (PCA) plots showed good stability and reliability of the results by clustering the QCs samples ([Fig. S3](#)). Principal Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) showed good classifications between groups using the analytical metabolomics multiplatform ([Fig. 1A, B and C](#)). Moreover, pairwise comparisons were carried out to determine the metabolites that allowed discriminating groups. The 2D-PLS-DAs built from pairwise group comparison ([Fig. S4](#)) are shown in the [Supporting Information](#).

A total of 49 brain metabolites ([Table S2](#)) were annotated combining GC-MS (13 metabolites) and ^{+/−}ESI-MS (36 metabolites). KRIs were calculated for the identification of metabolites determined by GC-MS and they are summarized in [Table S3](#). [Fig. 1D](#) collects the abundance of the metabolites annotated in C, CC and CC-Se groups in a heatmap diagram and [Table S2](#) shows the complete list of metabolites with the p -values and fold changes (FC) among other information.

As can be seen in [Fig. 1D](#) and [Table S2](#), there is a band of metabolites that decreased in mouse brain after the exposure to the CC (CC vs C $FC < 1$). Among the **brain metabolites down-regulated by the CC exposure, several ones increased the levels after Se-supplementation** to levels close to the C group or even not significantly different (FC CC-Se vs CC greater than those for CC vs C comparison). This last group of metabolites included (compound class and FC CC-Se vs CC in brackets): monopalmitin (*monoglyceride*, 2.18-fold), cer(d16:1/24:0) (*ceramide*, *N*-*acylsphingosine*, 2.70-fold), deoxyrubsoskyrin (*anthracene*, *anthraquinone*, 1.94-fold) and undecyl isobutyrate (*fatty acyl*, *fatty ester*, 3.90-fold). There are other **brain metabolites up-regulated by the CC exposure that was down-regulated by Se-supplementation** (FC CC-Se vs CC lower than those for CC vs C comparison) including (compound class and FC CC-Se vs CC in brackets): *N*-acetyl aspartic acid (*excitatory amino acid*, 0.51-fold) and phosphoric acid (*acid anhydride*, *acrylic acid anhydride*, 1.47-fold). There were other **brain metabolites altered by Se-supplementation, but that were not significantly impaired after the CC exposure when this last group is compared with the C group** (compound class and FC CC-Se vs C in brackets): spissuloline (*sphingolipids*, *organonitrogen compound*, *amine*, 2.15-fold),

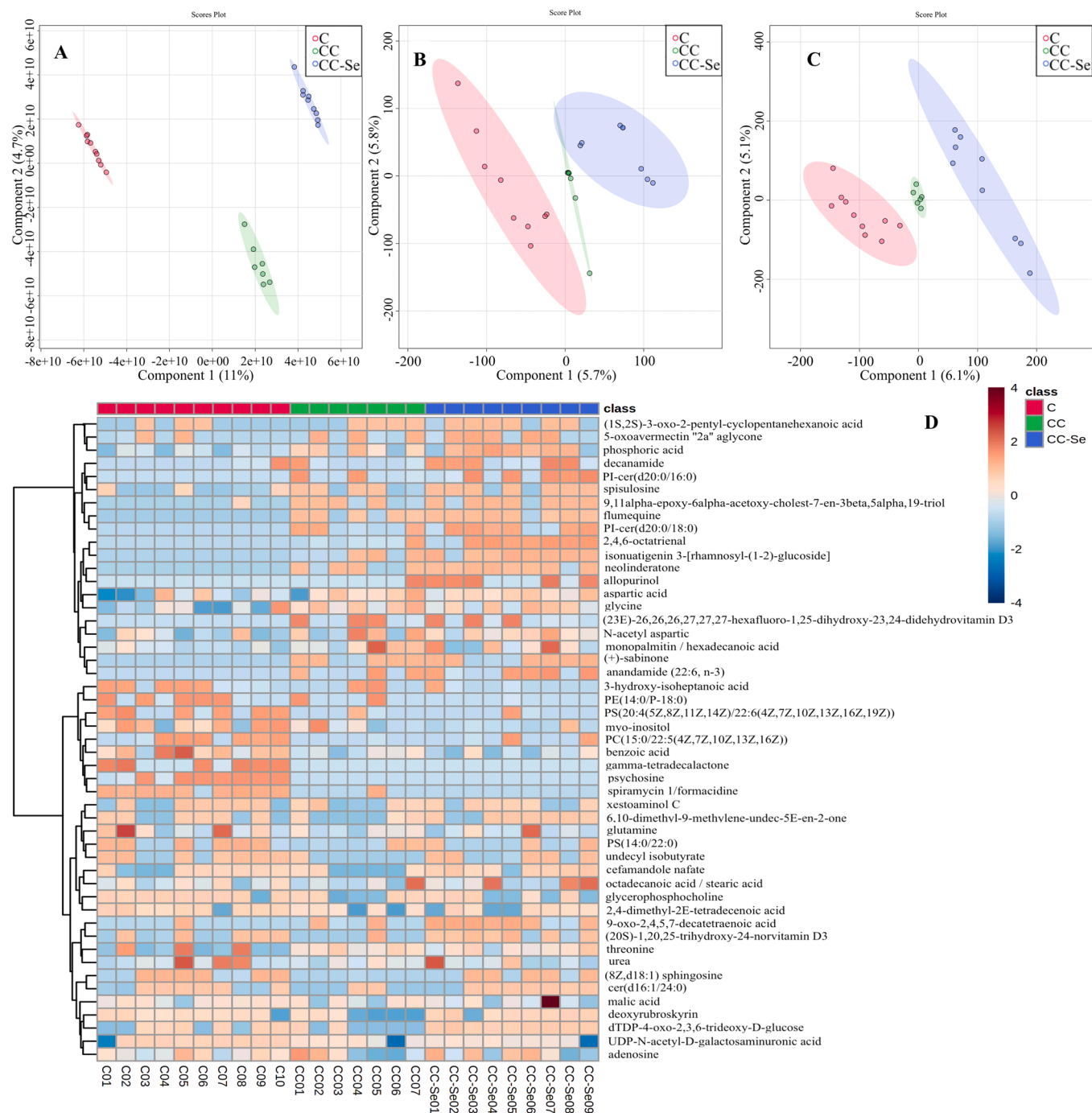


Fig. 1. A) 3D-PLS-DA of brain samples corresponding to GC-MS analysis, B) UHPLC-ESI⁺-QTOF-MS and C) UHPLC-ESI-QTOF-MS. C: red dots, CC: green dots, CC-Se: blue dots. D) Cluster heatmap of brain metabolites from C, CC and CC-Se mice. Metabolites are represented in rows and mice of different groups in columns. Red and blue colors show increased and decreased levels of brain metabolites, respectively.

xestoaminol C (*organonitrogen compound, amine*, 1.06-fold), 5-oxoavermectin "2a" aglycone (*macrolide and analogues, milbemycins*, 2.88-fold), decanamide (*fatty acyl, fatty amide*, 4.77-fold), (3-oxo2-pentyl-cyclopentanehexanoic acid (*fatty acyl, octadecanoid*, 2.36-fold), 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid (*medium chain fatty acid*, 8.47-fold), PS(14:0/22:0) (*glycerophospholipid, glycerophosphocholine, phosphatidylserine*, 0.51-fold), PE(14:0/P-18:0) (*glycerophospholipid, glycerophosphoethanolamine*, 0.02-fold), PS(20:4/22:6) (*glycerophospholipid, glycerophosphocholine, phosphatidylserine*, 0.19-fold) and malic acid (*hydroxyl acid derivative*, 0.63-fold). There were other brain metabolites impaired by the CC that Se-supplementation cannot antagonize or even it has a

synergistic action (compound class and FC CC vs C in brackets): glycerophosphocholine (*glycerophospholipid, glycerophosphocholine*, 0.65-fold), 9,11alpha-epoxy-6alpha-acetoxy-cholest-7-en-3beta,5alpha,19-triol (*sterol, cholesterol derivative*, 7.96-fold), (8Z,d18:1)sphingosine (*sphingolipid, sphingoid base*, 0.02-fold), spiramycin 1 (*organooxygen compound, carbohydrate derivative*, 0.16-fold), PC(15:0/22:5) (*phosphocholine, glycerophosphocholine*, 0.02-fold), UDP-N-acetyl-D-galactosaminuronic acid (*pyrimidine nucleotide sugar*, 0.94-fold), 3-hydroxy-isoheptanoic acid (*fatty acids and conjugates*, 0.65-fold), adenosine (*purine nucleoside*, 0.18-fold), aspartic acid (*amino acid*, 16.18-fold), benzoic acid (*benzene derivatives*, 71.44-fold), glutamine (*carboxylic acid*

derivative, amino acid, 0.74-fold), glycine (carboxylic acid derivative, amino acid, 0.91-fold), myo-inositol (organooxygen compound, alcohols and polyols, 0.30-fold), N-acetyl-aspartic acid (excitatory amino acid, 3.21-fold), stearic acid (fatty acyls, fatty acids and conjugates, 0.06-fold), threonine (carboxylic acid and derivatives, amino acid, 43.73-fold) and urea (organic carbonic acids and derivatives, ureas, 14.48-fold).

Finally, the FC of several metabolites cannot be calculated because they were absent in the control group. This is the case of flumequine, a pharmaceutical included in the chemical cocktail, which was not present in mice of the C group, and for this reason there are not FC for CC vs C or CC-Se vs C (Table S2). Metabolites absent in the control group are (compound class and FC CC-Se vs C in brackets, when significant differences were found): flumequine (quinolones and derivatives, 1.27-fold), PI-cer(d20:0/16:0) (phosphosphingolipid, ceramide phosphoinositol, 1.96-fold), PI-cer(d20:0/18:0) (1.62-fold), neolinderatone (poliketides, flavanones 1.55-fold), sabinone (prenol lipids, monoterpenoids), 2,4,6-octatrienal (fatty acids, aldehyde), 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxy-23,24-didehydrovitamin D3 (vitamin D derivatives), allopurinol (pyrazolopyridimines, 4-fold), isonuatigenin 3-[rhamnosyl-(1–2)-glucoside] (steroids, steroidal glycosides) and anandamide (22:6,n-3) (ethanolamines, N-acylethanolamine).

Moreover, the most impaired metabolic routes in the group CC and the changes after Se-supplementation were evaluated using the MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca) tool. The pathway analysis showed a total of 6 significantly altered routes in mouse brain metabolome after the exposure to CC (Fig. 2 A) including arginine and aminoacyl-tRNA biosynthesis, and the metabolisms of glycine, serine and threonine, alanine, aspartate and glutamate, glyoxylate and dicarboxylate metabolism, and glycerophospholipid metabolism.

exposure of the CC in Se-supplemented mice (Fig. 2B) are arginine and aminoacyl-tRNA biosynthesis and the metabolism of glycine, serine and threonine. Table S4 collects p-values, the numbers of hits and the impact of the affected metabolic routes by the impaired metabolites found CC and CC-Se groups.

3.3. Brain metabolome is associated with gut microbiota and affected by the “chemical cocktail” and selenium supplementation

In previous works, we described changes in the gut microbiota composition and diversity in mice as a result of Se-supplementation in conventional and microbiota depleted mice models (Callejón-Leblic et al., 2021), as well as after the CC exposure and/or Se-supplementation (Arias-Borrego et al., 2022). Moreover, we found that Se-supplementation increased the relative abundance of a number of health-relevant taxa, especially in the microbiota depleted mice model (Callejón-Leblic et al., 2021). A total of 66 different genera and their relative abundance (Table S5) were determined in C, CC, CC-Se mice groups. In this work, specific associations (Table S6, Fig. 2 C and D) between the relative abundance of the identified bacterial genera and brain metabolites in the different experimental groups were analyzed. Our results suggest that brain metabolome are related with gut microbiota composition and that those associations are perturbed by the exposure to the CC and changed by Se-supplementation.

We found distinct microbial shift according to the supplementation groups: (i) the first one, extensively increased the associations with brain metabolites after the exposure to the CC, but they decreased and changed them after Se-supplementation (e.g., Lachnospiraceae NK4A136 group, Lactobacillus, Mucispirillum, several members of the families

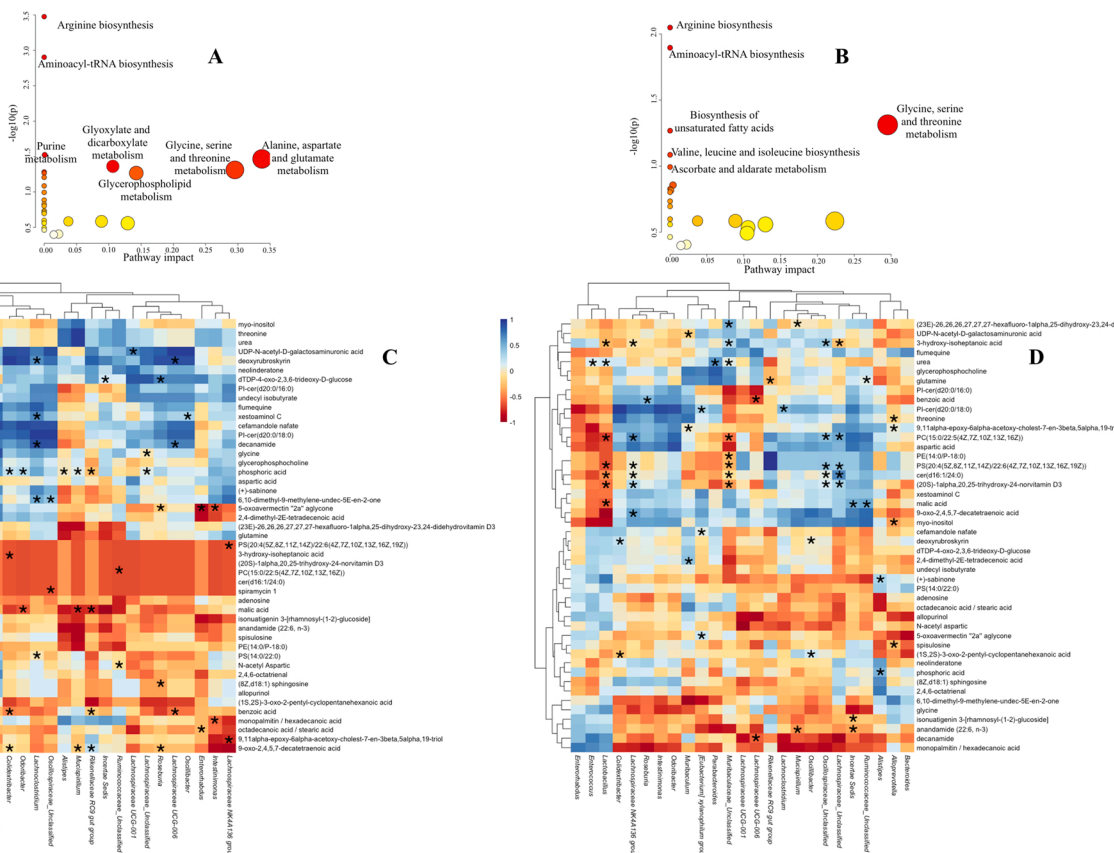


Fig. 2. A) Pathway analysis plots showing the most impaired metabolic routes in CC and B) CC-Se groups. The p-values calculated from the enrichment analysis are indicated by a color gradient: from white (highest p-value) to red (lowest p-value), while the pathway impact value calculated from pathway topology analysis is indicated by dot size. C) Spearman correlation heatmaps showing the associations between brain metabolites and gut microbiota in CC and D) CC-Se groups. Blue and red colors indicate positive and negative correlations, respectively.

Oscillospiraceae, *Peptococcaceae*, *Muribaculaceae*, *Tannerellaceae*); (ii) the second group includes genera that decreased the associations with brain metabolome after CC exposure, but they increased after Se-supplementation (e.g., *Roseburia*) and (iii) genera without any association with brain metabolome after CC exposure, but that they widely increased after Se-supplementation (e.g., *Escherichia-Shigella*, *Lachnospiraceae UCG-001*, *Intestinimonas*, *Enterorhabdus*, *Acetatifactor*).

Therefore, we found specific associations between *Lachnospiraceae NK4A136* group and only two brain metabolites in the C group (Table S6), while in the CC group they increased up to 7 negative correlations with brain metabolites including PS(20:4/22:6) (phosphatidylserine), cer(d16:1/24:0) (ceramide), PC(15:0/22:5) (phosphatidylcholine), 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid and 3-hydroxy-isoheptanoic acid (fatty acids and conjugates) and (20 S)-1,20,25-trihydroxy-24-norvitamin D3 (fat-soluble vitamin). After Se-supplementation of CC mice, this genus was associated with myo-inositol (organooxygen compound), aspartic acid (neurotransmitter) and monopalmitin (monoglyceride). *Lactobacillus* genus also increased the associations with brain metabolites in CC group being the most significant correlations (mainly positives) with almost the same brain metabolites that *Lachnospiraceae NK4A136* group, such as PS(20:4/22:6), cer(d16:1/24:0), PC(15:0/22:5), 1,20,25-trihydroxy-24-norvitamin D3 and other new metabolites including 3-hydroxy-isoheptanoic acid (fatty acids and derivatives), malic acid (dicarboxylic acid), proline (amino acid) and urea (organic carbonic acids and derivatives). After Se-supplementation, this genus was positively associated with monopalmitin and negatively with PI-cer(d20:0/18:0) (phosphatidylinositol ceramide) and 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid (fatty acids and conjugates). *Mucispirillum* genus was also negative associated after CC exposure, with brain 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxy-23,24-didehydrovitamin D3 (vitamin D3 derivative) as well as with anandamide (22:6, n-3) (endocannabinoid) and threonine (amino acid), while after Se-supplementation this genus was only associated with monopalmitin.

The associations of *Roseburia* with brain metabolites decreased to only one negative correlation with benzoic acid in brain after CC exposure and to three associations after Se-supplementation with 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid, monopalmitin and myo-inositol.

The genera *Escherichia-Shigella*, *Lachnospiraceae UCG-001* and *Intestinimonas* genera did not present any association with brain metabolome after CC exposure, but they were associated with brain metabolites after Se-supplementation. Thus, the first genus was associated, after Se-supplementation with phosphoric acid and 3-hydroxy-isoheptanoic acid, while the second one with four metabolites including PE(14:0 P-18:0), PS(20:4/22:6), N-acetyl aspartic acid and cefamandole nafate, and the last with aspartic acid and benzoic acid.

4. Discussion

Although the impact of metals (Xu et al., 2015; Wang et al., 2021), selenium (Ramírez-Acosta et al., submitted for publication; Rodríguez-Moro et al., 2019) and organic xenobiotics (Rodríguez-Moro et al., 2019) in brain metabolome has been previously reported, limited evidence is available about the joint effect of pollutants in brain metabolome as well as the possible influence of Se-supplementation and the crosstalk with gut microbiota.

4.1. Brain metabolome is shaped by the exposure to the “chemical cocktail” and selenium supplementation

Our results demonstrated that the exposure to the CC strongly affects the brain metabolome by the up- or down-regulation of metabolites that belongs to compound classes very related with brain function, such as excitatory amino acids, ceramides, fatty acyls and monoglycerides, among others and that Se-supplementation modulated the impairments. Likewise, N-acetyl aspartic acid was up-regulated by the CC exposure,

but Se-supplementation modulated the levels to that in the control group, since there were not significant differences between these two groups. The excitatory amino acid N-acetyl aspartic acid, accounts for around one thousandth of the wet weight of human brain and appears to be restricted solely to neurons being involved in important functions such as myelin production, regulation of neuronal protein synthesis or the metabolism of several neurotransmitters such as aspartate or N-acetyl-aspartyl-glutamate (Birken and Oldendorf, 1989). Phosphoric acid was also up-regulated by the exposure and modulated by Se-supplementation, but interestingly, this metabolite was up-regulated after Se-supplementation in non-exposed mice (Ramírez-Acosta et al., submitted for publication).

Se-supplementation also modulated the down-regulation of the brain ceramide cer(d16:1/24:0). Ceramides are precursors of all complex sphingolipids, which intracellular levels must be fine-tuned since changes in the sphingolipid-ceramide profile play a role in the development of neurological, age-related, and neuroinflammatory disorders (Mencarelli and Martínez-Martínez, 2013). Other metabolites down-regulated by CC and modulated by Se-supplementation belongs to the compound classes of monoglycerides and fatty acyls, that are also important for brain (Ramírez-Acosta et al., submitted for publication). There were other group of metabolites modulated by Se-supplementation in exposed mice that were not affected by the CC in mice fed rodent diet. Likewise, Se-supplementation up-regulated in brain the sphingolipids spiruloline, which inhibits the proliferation of numerous cancer cell lines (Pruett et al., 2008) and xestoaminol C, which affect the resistance of rat renal and mesenteric vessels through G protein-coupled receptor (Bischoff et al., 2000). Se also increased the brain levels of a neurotransmitter and other metabolites classified as fatty acyls and medium chain fatty acids, and down-regulated malic acid and several glycerophospholipids including PS and PE, whose composition is very important for the neural membranes functionality, fluidity and permeability, and that the alterations in neural membrane glycerophospholipid composition have been reported to occur in neurological disorders (Farooqui et al., 2000). Other brain metabolites were down-regulated by the exposure to the CC and Se-supplementation did not modulate the levels, including glycerophosphocholine and a PC, that usually are elevated in brain during neurodegeneration due to the breakdown of membrane phospholipids (Walter et al., 2004). Interestingly, the CC exposure strongly decreased the brain levels of PC (15:0/22:5) (0.02-fold), that was previously associated with disturbed condition in brain cells (Li Yin et al., 2019; Chai et al., 2021) and (8Z, d18:1)sphingosine (0.02-fold). Otherwise, the CC exposure strongly up-regulated the levels of aspartic acid (16.18-fold), considered one of the main excitatory amino acids in CNS (Wang et al., 2021) that was found upregulated in adverse conditions (Ji et al., 2017; Dai et al., 2016), benzoic acid (71.44-fold), known to be up-regulated after As exposure (Sun et al., 2021) and mainly excreted by kidneys, threonine (43.73-fold), previously reported to be elevated as response to neurotoxicity as well as in an Alzheimer's disease model (Fu et al., 2017; Hu et al., 2012), and urea (14.48-fold), previously described to be increased in serum after Abx treatment (Xu et al., 2021).

The pathway analysis plots clearly show that Se-supplementation ameliorated several metabolic pathways impaired by the CC exposure. Likewise, Se-supplementation ameliorated the impact of the CC on the purine metabolism, glycosylate and dicarboxylate metabolism, glycerophospholipid metabolism, alanine, aspartate and glutamate metabolism. Otherwise, Se-supplementation acts mainly on biosynthesis of unsaturated fatty acids, glycine, serine and threonine metabolism, valine, leucine and isoleucine biosynthesis and ascorbate and aldarate metabolism.

4.2. Specific gut microbes associated with multiple brain metabolites

In this work, numerous associations between brain metabolites and gut microbiota were found at genus level. As commented before, there

are genera that widely increased or decreased the number of associations with brain metabolites after the exposure to the CC and that Se-supplementation restored this behavior. Among these genera, *Lachnospiraceae NK4A136 group* has been previously claimed as a potential butyrate producer and thus, a promising therapeutic target in dementia because it is lower in these patients compared to controls (Stadlbauer et al., 2020). In our previous work (Callejón-Leblic et al., 2021), we demonstrated that *Lachnospiraceae* family increased after Se-supplementation. In the present work, this genus is negatively associated in CC group with important brain metabolites including PS, PC, ceramides, fatty acids and conjugates and fat-soluble vitamins. After Se-supplementation these associations disappears and this genus positively correlated with a fat-soluble vitamin, myo-inositol and the neurotransmitter aspartic acid, and negatively with monopalmitin. Another genus extensively associated with brain metabolites is *Lactobacillus genus*, a potentially health-relevant taxa, which also increased after Se-supplementation according to our previous results (Callejón-Leblic et al., 2021). After the CC exposure, this genus was positively associated with a brain ceramide, PS, PC, vitamin D3 derivative, fatty acids, malic acid, amino acids, and urea. After Se-supplementation, these correlations disappeared and it was negatively correlated with a PI and a fatty acid, and positively with monopalmitin. *Mucispirillum* genus was also negative associated after CC exposure, with brain vitamin D3 derivative, an endocannabinoid and an amino acid, while after Se-supplementation this genus only correlated with brain monopalmitin. Previously, this genus has been linked to sperm activity and testosterone, as well as glutathione peroxidase and selenoalbumin in testicular tissue (Ramírez-Acosta et al., 2022a). The associations of *Roseburia* genus with brain metabolites decreased after the CC to be only correlated with brain benzoic acid, but Se-supplementation increased the association to brain metabolome including 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid, monopalmitin and myo-inositol. This genus has been previously related with depressive symptoms in patients with the body mass index (BMI) in patients with anorexia nervosa (AN) (Di Lodovico et al., 2021) and with major depressive disorder (Ye et al., 2021). The genus *Escherichia-Shigella* genus did not correlated with any brain metabolites after CC exposure, but after Se-supplementation, they were positively associated with phosphoric acid and 3-hydroxy-isoheptanoic acid. This genus has been associated with reproductive endocrine systems sex hormones, as well as testicular selenoprotein P (Ramírez-Acosta et al., 2022a). In the present work, Se-supplementation induced the association with a brain PE, a PS, N-acetyl aspartic among others.

4.3. Specific brain metabolites associated with multiple gut microbes

Interestingly, there were brain metabolites altered after the CC and/or Se-supplementation that were associated repeatedly with a great number of gut microbes. These metabolites have been previously related with important brain functions and neurotoxicity. Among the class of *glycerophospholipids*, the phosphatidylserine PS(20:4/22:6) in mice brain, was associated with several genera after the exposure to the CC and with some others after Se-supplementation. In addition, the PS (14:00/22:0) was also associated with several genera in the control and CC-Se groups. There were no other PSs associated with gut bacteria in this study. PS(20:4/22:6) consists of one chain of arachidonic acid and one chain of docosahexaenoic acid and the greatest concentration is located in myelin from brain tissue (FooDB, 2011). In general, PSs are required for healthy nerve cell membranes and myelin (Glade and Smith, 2015). The *glycerophospholipid* glycerophosphocholine (GPCh), was associated with several genera in the C and CC-Se groups. Furthermore, the phosphatidylcholine PC(15:0/22:5) in mice brain was also associated with a great number of genera, but only in the CC and C groups. It is well-known that during neurodegeneration membrane phospholipids are breakdown and choline metabolites increases. These are the water-soluble metabolites of PC and includes GPCh, phosphocholine (PCh), and choline (Ch) (Walter et al., 2004). Only two

ceramides in mice brain were associated with gut microbiota, the cer (16:1/24:0) and cer(20:0/18:0) in the CC and Se-CC groups, as well as their corresponding phosphatidylinositol ceramides (PI-cer(20:0/18:0) and PI-cer(16.1:24:0), which belongs to the class of *phosphosphingolipids*. The *sphingolipid* psychosine in brain was associated with several genera only in the control group. Ceramides are sphingolipids precursors as well as powerful signaling molecules that mediate crucial processes in cellular pathophysiology (Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013). Alteration of the sphingolipid-ceramide profile led to the development of neurological, age-related and neuroinflammatory diseases (Mencarelli and Martinez-Martinez, 2013). The vitamin D3 derivatives 26,26,26, 27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxy-23,24-didehydrovitamin D3 and 1,20,25-trihydroxy-24-norvitamin D3 were mainly negatively associated with several genera in the CC and CC-Se groups. The effect of 26,26, 26,27,27,27-Hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of vitamin-D-responsive genes in vitamin-D-deficient mice has been previously reported (Yoshimura et al., 1998). In fact, Vitamin D has neuroprotective properties, modulates the immune system, and aids calcium homeostasis. It also has a role in the regulation of a wide number of genes that are crucial for brain function. Although vitamin D is classified as a vitamin, it acts as well as a neurosteroid and has key role in the brain (Anjum et al., 2018). Also, the neurotransmitter aspartic acid in brain was associated with several members of gut microbiota in the CC-Se mice. Other brain metabolites widely associated with gut microbes were malic acid (*hydroxy acid and derivatives*), monopalmitin (*monoradylglycerols*), myo-inositol (*alcohol*), 3-hydroxy-isoheptanoic acid and stearic acids (*fatty acyls*), the amino acids glycine, aspartic acid, threonine, proline and glutamine (*aminoacids*), UDP-N-acetyl-D-galactosaminuronic acid (*nucleotide-sugar*), benzoic acid, adenosine (*purine nucleoside*), spiculoline (*sphingolipids, organonitrogen compounds*), urea and phosphoric acid. Finally, the brain metabolite that presented more associations with gut microbiota was the fatty acid 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoic acid.

5. Conclusions

Untargeted brain metabolomics combining GC-MS and UHPLC-QTOF-MS revealed important impairments caused by CC that were modulated by Se supplementation. These metabolites belong to key compound classes for brain function such as excitatory amino acids, ceramides, fatty acyls and monoglycerides, among others. Interestingly, novel associations were determined between brain metabolites and gut microbes suggesting an intertwined mechanism, but they also disappeared or changed after Se supplementation. Our results demonstrated that there is a potential key interaction between Se intake-microbiota-brain metabolites with effects on the host health at multiple levels including gut-brain axis and reproductive health. However, the precise link needs to be ascertained and further studies targeted to the specific mechanisms are needed.

Funding Sources

This work was supported by the projects: PG2018-096608-B-C21 and PID2021-123073NB-C21 from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIN). Generación del Conocimiento. MCI/AEI/ FEDER “Una manera de hacer Europa”, UHU-1256905 and UHU-202009 from the FEDER Andalusian Operative Program 2014-2020 (Ministry of Economy, Knowledge, Business and Universities, Regional Government of Andalusia, Spain). The authors are grateful to FEDER (European Community) for financial support, Grant UNHU13-1E-1611. CPM thanks MICIN for a predoctoral grant (ref. PRE2019-091650). Funding for open access charge: Universidad de Huelva / CBUA. The authors would like to acknowledge the support from The Ramón Areces Foundation (ref. CIVP19A5918).

CRedit authorship contribution statement

C. Parra-Martínez: Formal analysis, Data curation, Visualization, Validation, Investigation, Writing – review & editing. **M. Selma-Royo:** Formal analysis, Data curation, Visualization, Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **B. Callejón-Leblic:** Visualization, Formal analysis, Data curation, Methodology, Supervision, Writing – review & editing. **M.C. Collado:** Conceptualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **N. Abril:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **T. García-Barrera:** Conceptualization, Supervision, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing, Funding acquisition, Project administration.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data Availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supporting information

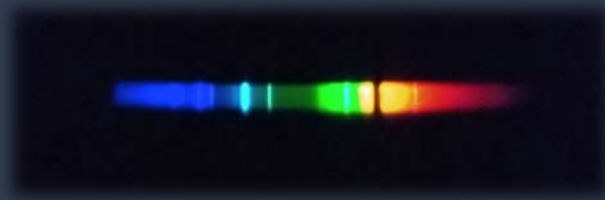
Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jhazmat.2022.129443](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129443).

References

- Anjum, I., Jaffery, S.S., Fayyaz, M., Samoo, Z., Anjum, S., 2018. The role of vitamin D in brain health: a mini literature review. *Cureus* 10. <https://doi.org/10.7759/CUREUS.2960>.
- Arias-Borrego, A., Callejón-Leblic, B., Calatayud, M., Gómez-Ariza, J.L., Collado, M.C., García-Barrera, T., 2019. Insights into cancer and neurodegenerative diseases through selenoproteins and the connection with gut microbiota - current analytical methodologies. *Expert Rev. Proteom.* 16, 805–814. <https://doi.org/10.1080/14789450.2019.1664292>.
- Arias-Borrego, A., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2022. Impact of “chemical cocktails” exposure in shaping mice gut microbiota and the role selenium supplementation combining metallomics, metabolomics and metatranscriptomics. *J. Hazard. Mater.*
- Birken, D.L., Oldendorf, W.H., 1989. N-Acetyl-L-Aspartic acid: a literature review of a compound prominent in 1H NMR spectroscopic studies of brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 13, 23–31. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80048-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80048-X).
- Bischoff, A., Czyborra, P., Meyer Zu Heringdorf, D., Jakobs, K.H., Michel, M.C., 2000. Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br. J. Pharm.* 130, 1878–1883. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703516>.
- Branca, J.J.V., Morucci, G., Pacini, A., 2018. Cadmium-induced neurotoxicity: still much ado. *Neural Regen. Res.* 13, 1879–1882. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.239434>.
- Burokas, A., Moloney, R.D., Dinan, T.G., Cryan, J.F., 2015. Microbiota regulation of the Mammalian gut-brain axis. *Adv. Appl. Microbiol.* 91, 1–62. <https://doi.org/10.1016/BS.AAMBS.2015.02.001>.
- Callejón-Leblic, B., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2021. Impact of antibiotic-induced depletion of gut microbiota and selenium supplementation on plasma selenoproteome and metal homeostasis in a mice model. *J. Agric. Food Chem.* 69, 7652–7662. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C02622>.
- Callejón-Leblic, B., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Gómez-Ariza, J.L., Abril, N., García-Barrera, T., 2022. Untargeted gut metabolomics to delve the interplay between selenium supplementation and gut microbiota. *J. Proteome Res.* 21 <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.1C00411>.
- Chai, C., Jin, B., Yan, Y., Yuan, Q., Wen, H., Tao, W., Cui, X., Shan, C., Yu, S., 2021. Anti-depressant effect of Zhi-zi-chi decoction on CUMS mice and elucidation of its signaling pathway. *J. Ethnopharmacol.* 266, 113283 <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113283>.
- Clarkson, T.W., Magos, L., 2006. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 609–662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>.
- D’Amato, A., Di Cesare Mannelli, L., Lucarini, E., Man, A.L., Le Gall, G., Branca, J.J.V., Ghelardini, C., Amedei, A., Bertelli, E., Regoli, M., Pacini, A., Luciani, G., Gallina, P., Altera, A., Narbad, A., Gulisano, M., Hoyles, L., Vauzour, D., Nicoletti, C., 2020. Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome* 8. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00914-W>.
- Dai, H., Xia, Y.Y., Ting-Li Han, T.L.H., Philip, P.N.B., Baker, N., Tang, X., Zhang, R.Y., Du, H., Cai, T.J., Cheng, S.Q., 2016. Effect of chronic arsenic exposure on mouse brain tissue and serum metabolomics. *Nan Fang. Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 36, 1192–1197. <https://europepmc.org/article/med/27687649> (Accessed 8 April 2022).
- Di Lodovico, L., Mondot, S., Doré, J., Mack, I., Hanachi, M., Gorwood, P., 2021. Anorexia nervosa and gut microbiota: a systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 106. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2020.110114>.
- Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., Farooqui, T., 2000. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem. Phys. Lipids* 106, 1–29. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00128-6).
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: a comparison of the African and European challenge. *Sci. Total Environ.* 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/J.SCIOTENV.2018.11.072>.
- FoodDB, Showing Compound PS(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) (FDB029055), (2011). <https://foodb.ca/compounds/FDB029055> (Accessed 28 April 2022).
- Fu, Y., Si, Z., Li, P., Li, M., Zhao, H., Jiang, L., Xing, Y., Hong, W., Ruan, L., Wang, J.S., 2017. Acute psychoactive and toxic effects of D. metel on mice explained by 1H NMR based metabolomics approach, 2017 324 *Metab. Brain Dis.* 32, 1295–1309. <https://doi.org/10.1007/S11011-017-0038-9>.
- García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., González-Fernández, M., Moreno, F., García-Sevillano, M.A., Gómez-Jacinto, V., 2012. Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2237–2253. <https://doi.org/10.1007/S00216-012-5776-2>.
- García-Sevillano, M.A., Jara-Biedma, R., González-Fernández, M., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2013a. Metal interactions in mice under environmental stress. *Biometals* 26, 651–666. <https://doi.org/10.1007/S10534-013-9642-2>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2013b. Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As2O3 based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 5, 1644–1655. <https://doi.org/10.1039/C3MT00186E>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2014b. Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments on laboratory mice for environmental metal toxicity assessment. *Metallomics* 6, 237–248. <https://doi.org/10.1039/C3MT00302G>.
- García-Sevillano, M.A., Rodríguez-Moro, G., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2015. Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. *Chem. Biol. Interact.* 229, 82–90. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2015.02.001>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro-Roldán, F., Montero-Lobato, Z., Gómez-Ariza, J.L., 2014a. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J. Proteom.* 104, 66–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.02.011>.
- Garza-Lombó, C., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., Gensebatt, M.E., Franco, R., 2019. Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *J. Biol. Inorg. Chem.* 24, 1305–1316. <https://doi.org/10.1007/S00775-019-01740-8>.
- Glade, M.J., Smith, K., 2015. Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition* 31, 781–786. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2014.10.014>.
- Glaser, V., Leipnitz, G., Straliootto, M.R., Oliveira, J., dos Santos, V.V., Wannmacher, C.M.D., de Bem, A.F., Rocha, J.B.T., Farina, M., Latini, A., 2010. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31, 454–460. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2010.05.012>.
- González-Gaya, B., García-Bueno, N., Buelow, E., Marin, A., Rico, A., 2022. Effects of aquaculture waste feeds and antibiotics on marine benthic ecosystems in the Mediterranean Sea. *Sci. Total Environ.* 806 <https://doi.org/10.1016/J.SCIOTENV.2021.151190>.
- Grau-Perez, M., Navas-Acien, A., Galan-Chilet, I., Briongos-Figuero, L.S., Morchon-Simon, D., Bermudez, J.D., Crainiceanu, C.M., de Marco, G., Rentero-Garrido, P., García-Barrera, T., Gomez-Ariza, J.L., Casasnovas, J.A., Martin-Escudero, J.C., Redon, J., Chaves, F.J., Tellez-Plaza, M., 2018. Arsenic exposure, diabetes-related genes and diabetes prevalence in a general population from Spain. *Environ. Pollut.* 235, 948–955. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.01.008>.
- Hrdina, J., Banning, A., Kipp, A., Loh, G., Blaut, M., Brigelius-Flohé, R., 2009. The gastrointestinal microbiota affects the selenium status and selenoprotein expression in mice. *J. Nutr. Biochem.* 20, 638–648. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2008.06.009>.
- Hu, Z.P., Browne, E.R., Liu, T., Angel, T.E., Ho, P.C., Chan, E.C.Y., 2012. Metabonomic profiling of TASTPM transgenic Alzheimer’s disease mouse model. *J. Proteome Res.* 11, 5903–5913. <https://doi.org/10.1021/PR300666P/ASSET/IMAGES/PR300666P.SOCIAL.JPEG.V03>.
- Huygens, J., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Dewulf, J., Van Coillie, E., Quataert, P., Daeleire, E., Becue, I., 2022. Impact of fertilization with pig or calf slurry on

- antibiotic residues and resistance genes in the soil. *Sci. Total Environ.* 822 <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.153518>.
- Iqbal, J., Zhang, K., Jin, N., Zhao, Y., Liu, Q., Ni, J., Shen, L., 2018. Selenium positively affects the proteome of 3 × Tg-AD mice cortex by altering the expression of various key proteins: unveiling the mechanistic role of selenium in AD prevention. *J. Neurosci. Res.* 96, 1798–1815. <https://doi.org/10.1002/JNR.24309>.
- Iqbal, A., Ahmed, M., Ahmad, S., Sahoo, C.R., Iqbal, M.K., Haque, S.E., 2020. Environmental neurotoxic pollutants: review, 2020 2733 *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 41175–41198. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-10539-Z>.
- Ji, F., Luan, H., Huang, Y., Cai, Z., Li, M., 2017. MS-based metabolomics for the investigation of neuro-metabolic changes associated with BDE-47 exposure in C57BL/6 mice, 2017 13 *J. Anal. Test.* 1, 233–244. <https://doi.org/10.1007/S41664-017-0026-4>.
- Kasaikina, M.V., Kravtsova, M.A., Lee, B.C., Seravalli, J., Peterson, D.A., Walter, J., Legge, R., Benson, A.K., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2011. Dietary selenium affects host selenoproteome expression by influencing the gut microbiota. *FASEB J.* 25, 2492–2499. <https://doi.org/10.1096/FJ.11-181990>.
- Kim, J., Combs, G.F., 1997. Effects of selenium on colonic fermentation in the rat. *Biol. Trace Elem. Res.* 56, 215–224. <https://doi.org/10.1007/BF02785394>.
- Li Yin, C., gang Lu, R., fang Zhu, J., min Huang, H., Liu, X., feng Li, Q., yi Mo, Y., jia Zhu, H., Chin, B., xia Wu, J., wen Liu, X., Cheng, B., xiang Ruan, J., hong Liang, Y., Song, H., wei Guo, H., heng Su, Z., Zheng, H., 2019. The study of neuroprotective effect of ferulic acid based on cell metabolomics. *Eur. J. Pharmacol.* 864, 172694 <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2019.172694>.
- Lovell, M.A., Xiong, S., Lyubartseva, G., Markesbery, W.R., 2009. Organoselenium (Sel-PS1 diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1527–1533. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.03.008>.
- Mencarelli, C., Martínez-Martínez, P., 2013. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 181–203. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1038-X>.
- Pruett, S.T., Bushnev, A., Hagedorn, K., Adiga, M., Haynes, C.A., Sullards, M.C., Liotta, D. C., Merrill, A.H., 2008. Biodiversity of sphingoid bases ('sphingosines') and related amino alcohols. *J. Lipid Res.* 49, 1621–1639. <https://doi.org/10.1194/JLR.R800012-JLR200>.
- Ramírez-Acosta, S., Huertas-Abril, P.V., Selma-Royo, M., Prieto-Álamob, M.J., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2022b. The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metabolomics, metallomics, gene expression and amplicon sequencing. *J. Adv. Res.* (submitted for publication).
- Ramírez-Acosta, S., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Navarro-Roldán, F., Abril, N., García-Barrera, T., 2022a. Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota. *Sci. Rep.* 12, 4218. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08121-3>.
- Rodríguez-Moro, G., Abril, N., Jara-Biedma, R., Ramírez-Acosta, S., Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., 2019. Metabolic impairments caused by a 'chemical cocktail' of DDE and selenium in mice using direct infusion triple quadrupole time-of-flight and gas chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1940–1954. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00102>.
- Rodríguez-Moro, G., Roldán, F.N., Baya-Arenas, R., Arias-Borrego, A., Callejón-Leblic, B., Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., 2020. Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 1762–1775. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-06573-1>.
- Stadlbauer, V., Engertsberger, L., Komarova, I., Feldbacher, N., Leber, B., Pichler, G., Fink, N., Scarpatetti, M., Schippinger, W., Schmidt, R., Horvath, A., 2020. Dysbiosis, gut barrier dysfunction and inflammation in dementia: a pilot study. *BMC Geriatr.* 20 <https://doi.org/10.1186/S12877-020-01644-2>.
- Stuve, O., Weideman, R.A., McMahan, D.M., Jacob, D.A., Little, B.B., 2020. Diclofenac reduces the risk of Alzheimer's disease: a pilot analysis of NSAIDs in two US veteran populations. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* 13 <https://doi.org/10.1177/1756286420935676>.
- Sun, D., Yang, N., Zhang, Q., Wang, Z., Luo, G., Pang, J., 2021. The discovery of combined toxicity effects and mechanisms of hexaconazole and arsenic to mice based on untargeted metabolomics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 226, 112859 <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112859>.
- Walter, A., Korth, U., Hilgert, M., Hartmann, J., Weichel, O., Hilgert, M., Fassbender, K., Schmitt, A., Klein, J., 2004. Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol. Aging* 25, 1299–1303. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2004.02.016>.
- Wang, C., Deng, H., Wang, D., Wang, J., Huang, H., Qiu, J., Li, Y., Zou, T., Guo, L., 2021. Changes in metabolomics and lipidomics in brain tissue and their correlations with the gut microbiome after chronic food-derived arsenic exposure in mice. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 228 <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112935>.
- Xu, J., ming Xu, H., Peng, Y., Zhao, C., lan Zhao, H., Huang, W., li Huang, H., He, J., lei Du, Y., jian Zhou, Y., lian Zhou, Y., qiang Nie, Y., 2021. The effect of different combinations of antibiotic cocktails on mice and selection of animal models for further microbiota research, 2021 1054 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 105, 1669–1681. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11131-2>.
- Xu, M.Y., Sun, Y.J., Wang, P., Xu, H.Y., Chen, L.P., Zhu, L., Wu, Y.J., 2015. Metabolomics analysis and biomarker identification for brains of rats exposed subchronically to the mixtures of low-dose cadmium and chlorpyrifos. *Chem. Res. Toxicol.* 28, 1216–1223. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.5B00054>.
- Ye, X., Wang, D., Zhu, H., Wang, D., Li, J., Tang, Y., Wu, J., 2021. Gut microbiota changes in patients with major depressive disorder treated with vortioxetine. *Front. Psychiatry* 12. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2021.641491>.
- Yoshimura, T., Itoh, S., Tsujikawa, K., Yamada, E., Ishii, T., Iemura, O., Kameda, Y., Mimura, T., Kohama, Y., 1998. Effect of 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D3 on the expression of vitamin-D-responsive genes in vitamin-D-deficient mice. *Pharmacology* 57, 286–294. <https://doi.org/10.1159/000028254>.
- Zarrinpar, A., Chaix, A., Xu, Z.Z., Chang, M.W., Marotz, C.A., Saghatelian, A., Knight, R., Panda, S., 2018. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat. Commun.* 9 <https://doi.org/10.1038/S41467-018-05336-9>.
- Zhai, Q., Cen, S., Li, P., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., 2018. Effects of dietary selenium supplementation on intestinal barrier and immune responses associated with its modulation of Gut Microbiota. *Environ. Sci. Technol. Lett.* 5, 724–730. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.8B00563/SUPPL_FILE/EZ8B00563_SI_001.PDF.
- Zwolak, I., 2020. The role of selenium in arsenic and cadmium toxicity: an updated review of scientific literature. *Biol. Trace Elem. Res.* 193, 44–63. <https://doi.org/10.1007/S12011-019-01691-W>.

CAPÍTULO 2



4.2. Capítulo 2:

Interacción entre el intestino y las gónadas en ratones expuestos a un “cóctel químico” que combina la metabolómica y el perfil microbiano mediante secuenciación de amplicones

Artículo 2

C. Parra-Martínez, M. Selma-Royo, B. Callejón-Leblic, M.C. Collado, N. Abril, T. García-Barrera. Gut-gonad crosstalk in mice exposed to a “chemical cocktail” combining metabolomics and microbial profile by amplicon sequencing. *Food and Chemical Toxicology*, 188 (2024), 114627.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114627>

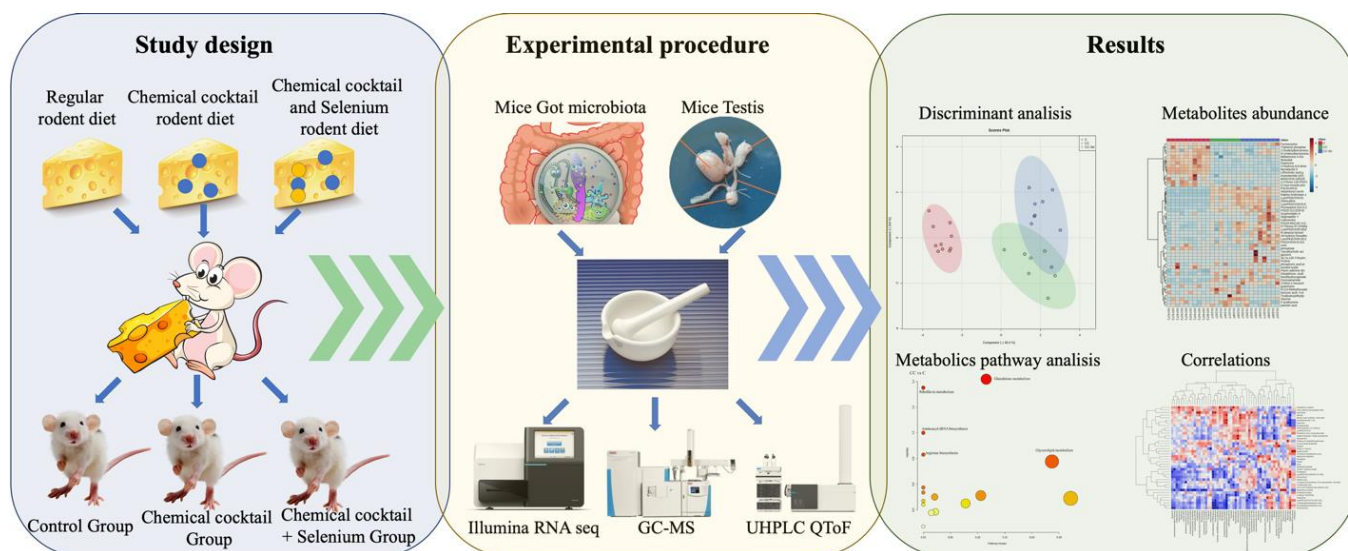


Figura 29. Resumen gráfico del estudio sobre interacción entre el intestino y las gónadas en ratones expuestos a un “cóctel químico” que combina la metabolómica y el perfil microbiano mediante secuenciación de amplicones

Las causas de la infertilidad masculina son muy variadas y la etiología de un alto porcentaje de los casos sigue siendo desconocida, pero han surgido preocupaciones con respecto al impacto de los contaminantes ambientales [229]. Entre ellos, la exposición al Hg puede alterar el sistema reproductivo e inducir inmunosupresión, fibrosis [28] y alteraciones metabólicas en ratones machos [230], el As puede afectar la espermatogénesis y la estructura morfológica testicular, lo que conduce al estrés oxidativo [231], alteraciones metabólicas [232] e induciendo una reducción gradual en la población de células de Leydig [233] y espermatozoides [233], mientras que el Cd puede dañar las células germinales y de Sertoli, y producir necrosis testicular, ya que este metal conduce a la ruptura de la barrera hemato-testicular [234].

No obstante, se han descrito con frecuencia efectos sinérgicos y antagónicos entre contaminantes [180, 235–238], por lo que su efecto biológico no debe estudiarse de forma aislada.

Debido a los efectos relevantes para la salud del Se, se ha propuesto como un suplemento en alimentos funcionales [239] así como para prevenir varias enfermedades como el cáncer [240, 241].

En este capítulo se presentan los resultados del impacto de una mezcla de contaminantes (As, Cd, Hg, FLQ y DCF) y del efecto de la suplementación con Se en el metaboloma cerebral de ratones y su relación con la microbiota intestinal. Con este fin, se llevó a cabo el experimento detallado en apartados anteriores: la sección 3.1.1 y representado en la Figura 19, utilizando los grupos experimentales C, CC y CC-Se. Posteriormente, las muestras fueron preparadas siguiendo lo indicado a lo largo de la sección 3.2.1. y los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente como se explica en la sección 3.3, en este análisis se incluyen el análisis PCA representado en la Figura 30 donde apreciamos una buena estabilidad de los resultados dado el agrupamiento mostrado por los QCs.

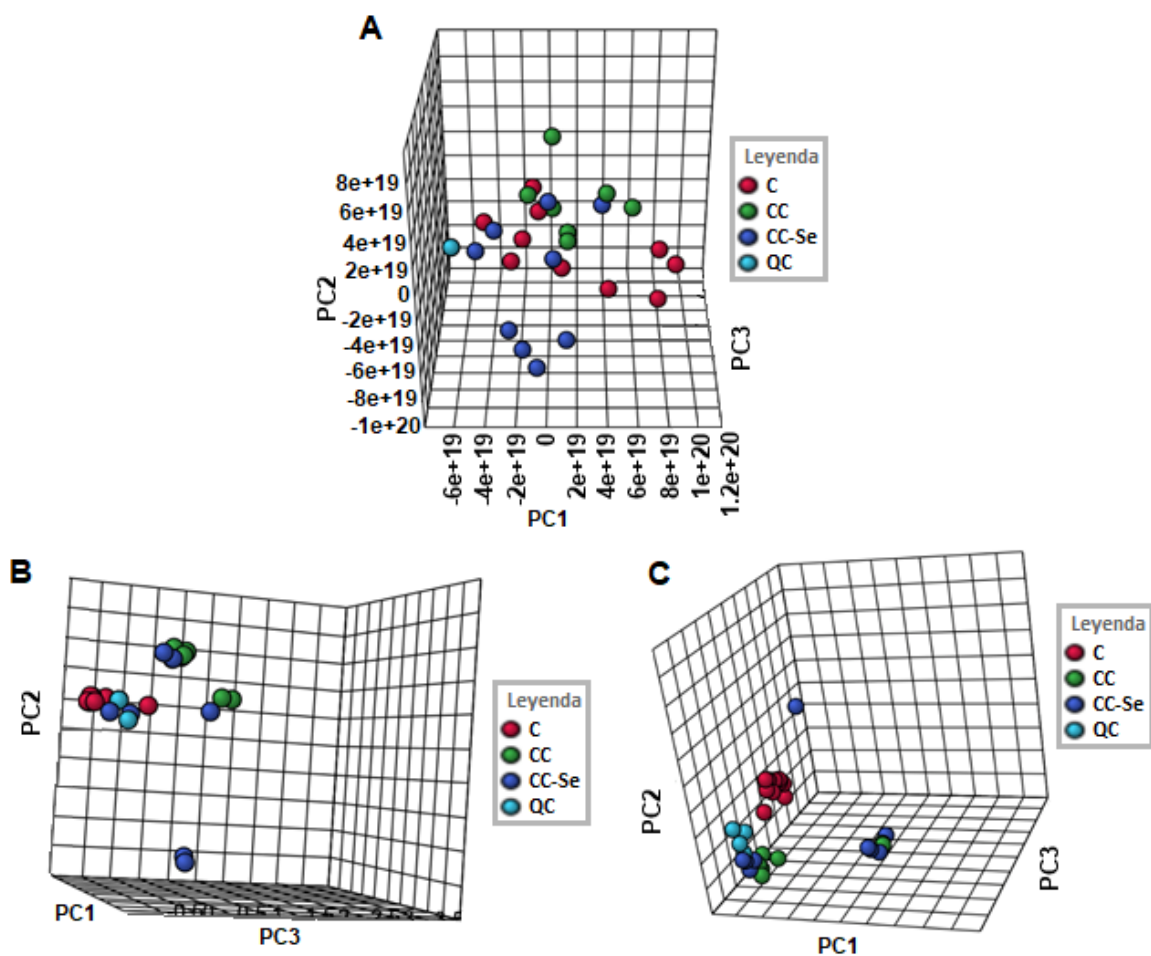


Figura 30: Análisis 3D de componentes principales de metabolitos cerebrales determinados por A) Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), B) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y C) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS).

Los grupos de ratones estudiados (C, CC y CC-Se) se agruparon y separaron según su metaboloma testicular como se aprecia en los diagramas PLS-DA en la Figura 31 utilizando GC-MS, UHPLC-ESI(+)-QTOF y UHPLC-ESI(-)-QTOF. En el análisis por GC-MS no se observó una separación tan clara entre los grupos, probablemente debido al escaso número de metabolitos identificados con esta técnica analítica. Sin embargo, la separación entre los grupos fue considerablemente mejor utilizando UHPLC-QTOF con

ambos modos de ionización. En estas condiciones, el grupo C presentó la mayor diferencia, mientras que CC y CC-Se se separaron solo parcialmente, lo que indica un efecto antagónico parcial de la suplementación con Se en el metaboloma testicular de los ratones después de la exposición al CC.

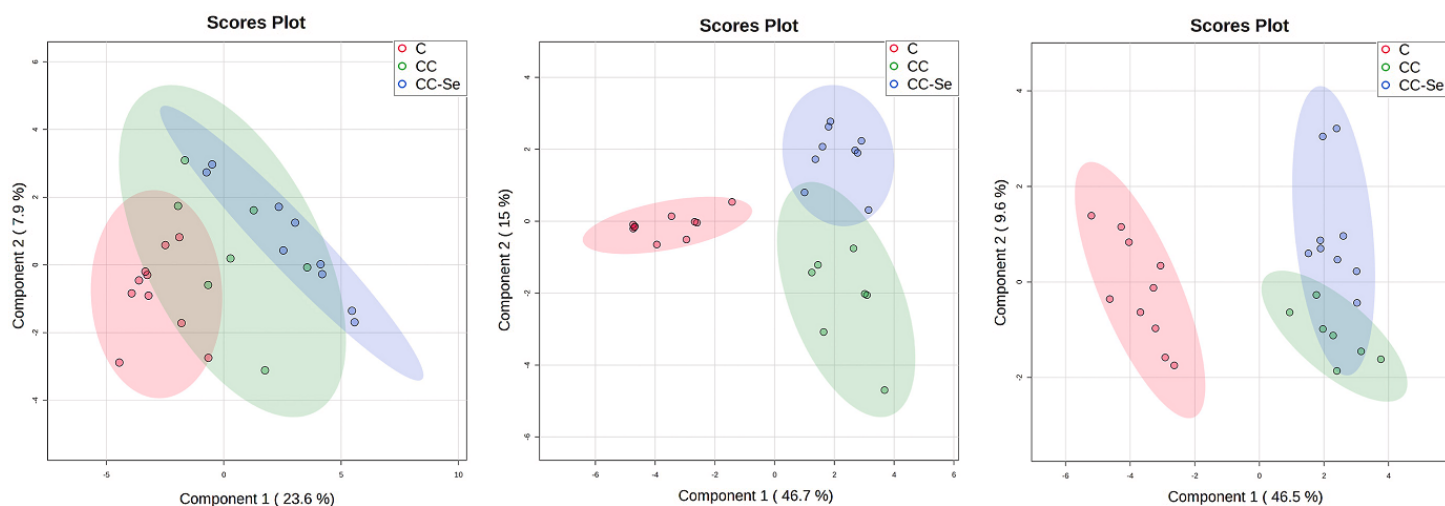


Figura 31. 3D-PLS-DA de muestras testiculares correspondientes al análisis A) Cromatografía de gases con analizador de trampa de iones (GC-MS), B) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo positivo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(+)-QTOF-MS) y C) Cromatografía líquida de ultra-alto rendimiento acoplado a electrospray en modo negativo con analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (UHPLC-ESI(-)-QTOF-MS). C: puntos rojos, CC: puntos verdes, CC-Se: puntos azules.

(Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo).

Después del análisis, se identificaron 41 metabolitos testiculares (Tabla 5, en Anexo 2) en los diferentes grupos estudiados mediante GC-MS (11 metabolitos) y UHPLC-ESI-QTOF (30 metabolitos). La Figura 32 muestra un diagrama de mapa de calor con la lista de metabolitos anotados y su abundancia relativa en los diferentes grupos.

Como puede observarse (Tabla 5, en Anexo 2), hubo un grupo de metabolitos que no fueron detectables en los testículos de C y por esta razón, no fue posible calcular el FC (CC vs C ni CC-Se vs C). Sin embargo, su abundancia relativa en el tejido testicular fue diferente en los ratones suplementados con Se o dieta para roedores. Este grupo incluye

(clase de compuesto, FC CC-Se vs CC): FLQ (quinolonas y derivados, FC: 2,36), 7-metil-octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (fenoles, FC: 1,69), prolina (ácido carboxílico y derivados, FC: 3,84) y propionato de 5-alfa-Androstan-17-beta-ol (esteroide, FC: 0,09). Otros metabolitos estaban ausentes en C, pero no resultaron cambios significativos en su abundancia al comparar CC con CC-Se: lisofosfatidiletanolamina (LPE) (16:0) (glicerofosfolípido) y N-(14-metilhexadecanoil) (pirrolidinas).

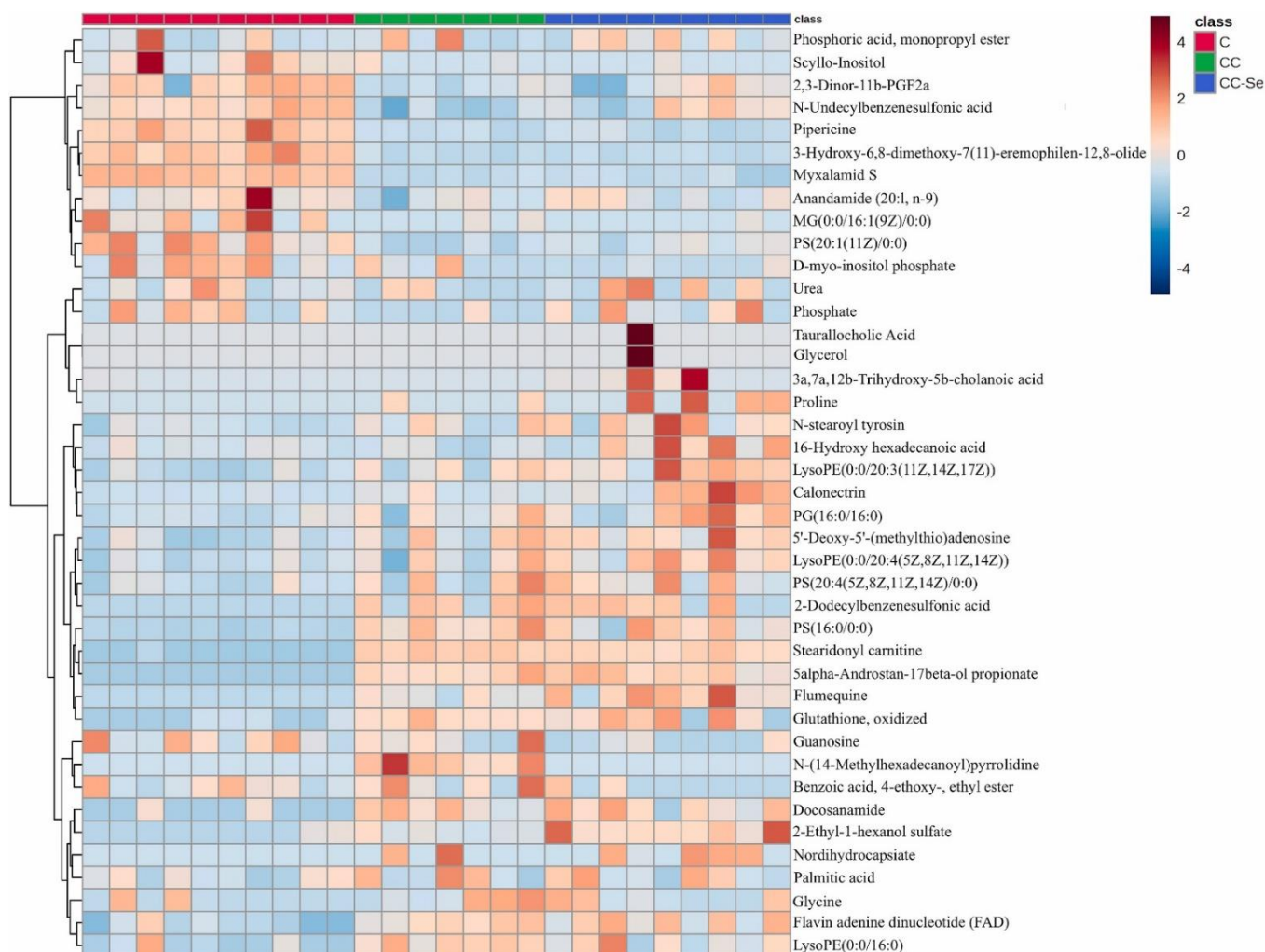


Figura 32. Mapa de calor de los metabolitos testiculares de los ratones control (C), ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se). Los metabolitos se representan en filas y los ratones de diferentes grupos en columnas. Los colores rojo y azul muestran niveles aumentados y disminuidos de metabolitos testiculares, respectivamente. (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo).

Curiosamente, también hay un grupo de metabolitos que se alteraron después de la exposición a CC, pero la suplementación con Se restauró su abundancia de manera similar a C (sin cambio significativo en su abundancia al comparar CC-Se vs C). Este grupo incluye (clase de compuesto y FC para CC vs C entre paréntesis): anandamida (20:1, n-9) (compuestos organonitrógenos, FC: 0,54), 2,3-Dinor-11b-PGF2a (acilo graso, FC: 0,12), PG (16:0/16:0) (glicerofosfolípido, FC: 1,57) y ácido N-undecilbencenosulfónico (benceno y derivado sustituto, FC: 0,45).

Del mismo modo, hubo otra banda de metabolitos que se regularon al alza o a la baja en los testículos de ratones después de la exposición a CC y la suplementación con Se condujo a la regulación opuesta. Este grupo incluye (clase de compuesto, FC CC vs C, CC-Se vs C): ácido tauralocólico (esteroides y derivados de esteroides, FC: 0,37, no calculable porque está ausente en un grupo) y glicerol (compuestos organooxigenados, no calculable porque está ausente en un grupo).

Finalmente, hay un grupo de metabolitos regulados al alza o a la baja después de la exposición a CC y la suplementación con Se que no se vieron afectados en el grupo CC que incluye (FC CC-Se vs C): 5'-desoxi-5'-(metiltio)adenosina (5'-desoxirribonucleósidos, FC: 1,59), ácido 3a,7a,12b-trihidroxi-5b-colanoico (compuesto organooxigenado, FC: 30,71), LPE(20:3) (glicerofosfolípido, FC: 1,63), LPE(20:4) (glicerofosfolípido, FC: 1,52), mixalamida S (FC: 0,16), PS(20:4) (glicerofosfolípidos, 1,59), N-estearoil tirosina (compuestos carboxílicos y derivados, FC: 3,27), calonectrina (prenol lípidos, FC: 3,11), Monoacilglicerol (MG) (16:1) (glicerolípido, FC: 0,04), ácido 16-hidroxi hexadecanoico (acilos grasos, FC: 1,38).

Como puede observarse en la Figura 32 y Tabla 5 (Anexo 2), había una banda de metabolitos que disminuyeron en los testículos de los ratones después de la exposición al CC e incluso después de la suplementación con Se. Este grupo incluye metabolitos como (clase de compuesto y FC para CC vs C y CC-Se vs C, respectivamente, entre paréntesis): pipericina (acilo graso, FC: 0,27, FC: 0,26), 3-hidroxi-6,8-dimetoxi-7(11)-eremophilen-12,8-olida (compuesto organooxigenado, FC: 0,12, FC: 0,14), mixalamida S (lípidos, FC: 0,18, 0,16 FC:), guanosina (purinas, FC: 0,02, FC: 0,01), ácido palmítico (lípidos,

FC: 0,21, FC: 0,27), carbamida (amida, FC: 0,3, FC: 0,36), 4-etoxibenzoato de etilo (derivado del benceno, FC: 0,85, FC: 0,86), ácido fosfórico, éster monopropílico (Éster de fosfato, FC: 0,58, FC: 0,71) y (MG) (16:1) (glicerolípido, FC: 0,13, FC: 0,04).

Por otra parte, también hay una banda de compuestos que aumentaron positivamente en los testículos de los ratones después de la exposición al CC e incluso después de la suplementación con Se. Este grupo incluye: FLQ (ácido carboxílico de quinolina, no presente en C), PS (16:0) (glicerofosfolípido, FC: 4,64, FC: 3,79), dinucleótido de flavina y adenina (nucleótido de flavina, FC: 2,7, FC: 2,8), estearidonil carnitina (acilo graso, FC: 47,04, FC: 42,48), docosanamida (acilo graso, FC: 6,02, FC: 6,20), PS(20:4) (glicerofosfolípido, FC: 1,52, FC: 1,58), LPE (16:0) (glicerofosfolípido, FC: 2,87, FC: 3,35), glutatión oxidado) (ácidos carboxílicos y derivados, FC: 2,81, FC: 2,10), PS(20:1) (glicerofosfolípido, FC: 7,25, FC: 7,14), LPE(16:0) (glicerofosfolípido, no calculable porque está ausente en un grupo), propionato de 5-alfa-Androstan-17-beta-ol (esteroide, no calculable porque está ausente en un grupo), sulfato de 2-etil-1-hexanol (ácidos sulfúricos orgánicos y derivados, FC: 4,00, FC: 10,72), fosfatidilglicerol (PG) (16:0/16:0) (glicerofosfolípido, FC: 1,57, FC: 2,14), 7-metil-octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo (fenol, no calculable porque está ausente en un grupo), glicina (compuestos carboxílicos y derivados, FC: 4,38, FC: 2,28), prolina (compuestos carboxílicos y derivados, no calculable porque está ausente en un grupo).

Las vías metabólicas alteradas en los testículos de ratones después de la exposición al CC y la suplementación con Se, se evaluaron utilizando la herramienta MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca). La Figura 33 (A) y Tabla 6, muestran que existen tres vías metabólicas que se vieron afectadas significativamente después de la exposición a CC cuando el metaboloma se compara con C, a saber: el metabolismo del glutatión, la biosíntesis de aminoacil-ARNt, el metabolismo de la riboflavina, el metabolismo de los glicerolípidos y la biosíntesis de arginina. Sin embargo, el impacto de la exposición a CC en la vía metabólica de los glicerolípidos y el glutatión fue muy alto.

Asimismo, después de la exposición a CC y la suplementación con Se (Figura 33 B) las mismas vías metabólicas se alteraron significativamente con impactos similares, cuando se compara el metaboloma con C. De lo contrario, cuando se compara el metaboloma

testicular entre CC y CC-Se (Tabla 6), hay cuatro vías metabólicas significativamente alteradas: la biosíntesis de aminoacil-ARNt, el metabolismo de las purinas, la biosíntesis de arginina y el metabolismo de los glicerolípidos, y la última con un importante impacto en la vía.

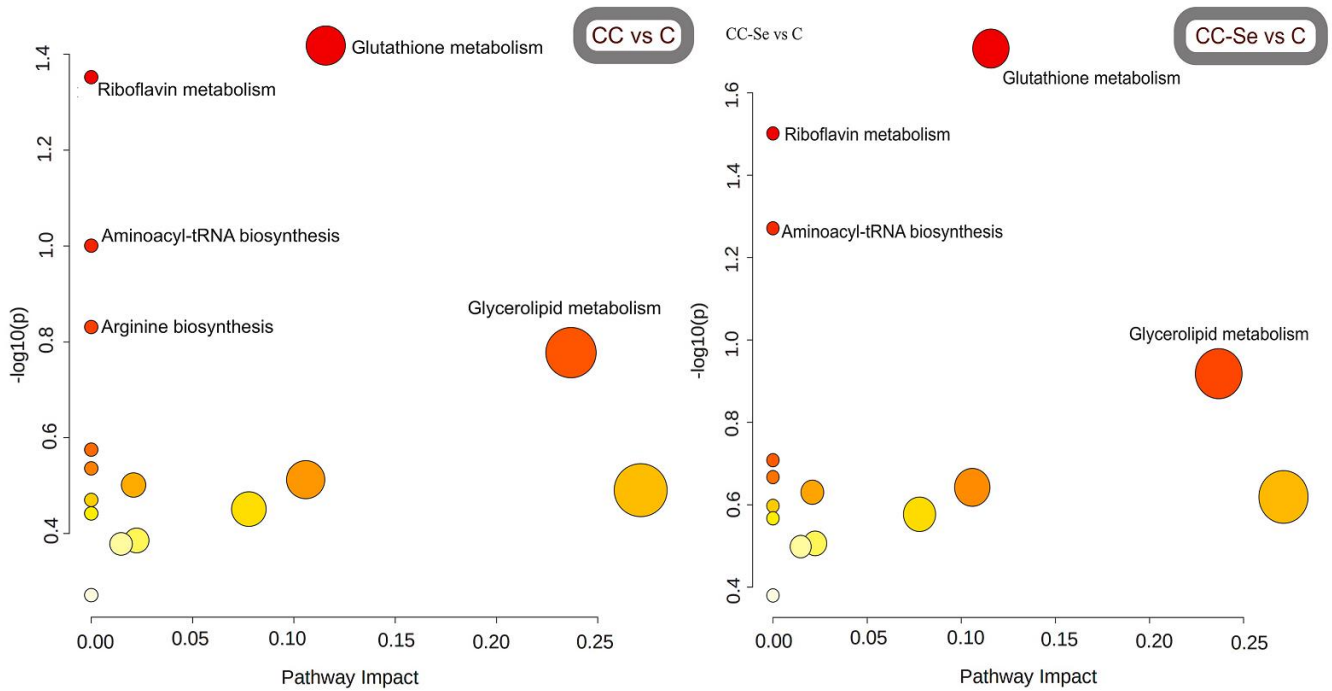


Figura 33. (A) Gráficas de análisis de vías que muestran las rutas metabólicas más deterioradas en los grupos de ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC) y (B) tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se). Los valores p calculados a partir del análisis de enriquecimiento se indican mediante un gradiente de color: desde el blanco (valor p más alto) hasta el rojo (valor p más bajo), mientras que el valor de impacto de la vía calculado a partir del análisis de topología de la vía se indica mediante el tamaño de los puntos. (Para la interpretación de las referencias al color en la leyenda de esta figura, se remite al lector a la versión web de este artículo).

Tabla 6. Detalles del análisis de la vía de metabolitos alterados por comparación de pares. Estado de coincidencia: número de metabolitos alterados del total de metabolitos que participan en la ruta; valor p: valor p calculado a partir del análisis de enriquecimiento; Impacto: valor de impacto de la vía calculado a partir del análisis de topología de la vía.

CC vs C			
Nombre de la ruta	Número de metabolitos afectados en la ruta	<i>p</i>	Impacto
Glutathione metabolism	2/28	0.038169	0.11571
Riboflavin metabolism	1/4	0.044437	0.0
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2/48	0.099858	0.0
Arginine biosynthesis	1/14	0.14754	0.0
Glycerolipid metabolism	1/16	0.16686	0.23676
Galactose metabolism	1/27	0.26597	0.0
Porphyrin and chlorophyll metabolism	1/30	0.29101	0.0
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1/32	0.30725	0.10582
CC-Se vs C			
Nombre de la ruta	Número de metabolitos afectados en la ruta	<i>p</i>	Impacto
Glutathione metabolism	1/28	0.019615	0.11571
Riboflavin metabolism	1/4	0.031525	0.0
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2/48	0.053571	0.0
Glycerolipid metabolism	1/16	0.12071	0.23676
Galactose metabolism	1/27	0.19579	0.0
Porphyrin and chlorophyll metabolism	1/30	0.21522	0.0
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1/32	0.22793	0.10582
Cysteine and methionine metabolism	1/33	0.23422	0.02089
CC-Se vs CC			
Nombre de la ruta	Número de metabolitos afectados en la ruta	<i>p</i>	Impacto
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	2/48	0.018865	0.0
Purine metabolism	2/66	0.034453	0.0
Arginine biosynthesis	1/14	0.063409	0.0
Glycerolipid metabolism	1/16	0.07218	0.23676

Estos resultados sugieren que la exposición al “cóctel químico” alteró el metaboloma testicular de los ratones y que la suplementación con Se restauró parte de los cambios. Por lo tanto, encontramos metabolitos testiculares solo presentes en los grupos CC y CC-Se, pero en niveles significativamente diferentes al comparar ambos.

Este grupo de metabolitos incluía FLQ, que estaba presente en el “cóctel químico” administrado a los ratones. La abundancia de este metabolito fue mayor en el tejido testicular de los ratones de CC-Se en comparación con CC (FC: 2,36), lo que sugiere que el Se condujo a su acumulación en el tejido testicular.

En el mismo grupo de metabolitos, el Se condujo a una disminución del esteroide 5-alfa-androstan-17-beta-ol propionato (FC: 0,09) y a un aumento de 7-metil-octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo y prolina. Curiosamente, se ha sugerido que el nivel plasmático de 17-beta-hidroxi-5alfa-androstan-3-ona (DHT) es un parámetro de androgenicidad independiente de los niveles de testosterona (T) [242]. Por otro lado, el 7-metil-octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo actúa sobre vías metabólicas específicas implicadas en la inflamación y ha demostrado tener posibles beneficios para la salud y la prolina mejoran los indicadores hematobioquímicos y reproductivos en conejos machos afectados por estrés ambiental [243].

Además, el CC provocó un deterioro significativo de varios metabolitos, pero sus niveles son comparables en los tejidos testiculares de ratones de los grupos C y CC-Se. Por lo tanto, se sugiere un posible efecto beneficioso de la suplementación con Se al restaurar los niveles de estos compuestos. Esos metabolitos testiculares, que disminuyeron después de la exposición al CC, incluyen el ligando del receptor cannabinoide endógeno anandamida (20:1, n-9), que regula las hormonas liberadoras de gonadotropina en mamíferos [244], 2,3-dinor-11b-PGF2a, siendo el producto metabólico más abundante de las prostaglandinas liberadas por los mastocitos activados. Este metabolito se ha relacionado con las hormonas reproductivas [245], neurotróficos [246] y PG(16:0/16:0).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores Ramírez-Acosta et al. [100], quienes también demostraron los efectos beneficiosos de la suplementación dietética con selenito de sodio sobre la salud reproductiva de los ratones.

La metabolómica testicular reveló la presencia inesperada de 4-etoxibenzoato de etilo, previamente documentado solo en ratas hembras lactantes [247], lo que plantea interrogantes sobre su posible papel en la función reproductiva masculina.

La suplementación con Se también antagonizó el aumento o disminución de varios metabolitos alterados por la exposición al “cóctel químico” como el ácido tauralocólico, un ácido biliar taurinado que, más allá de su papel en la digestión, afecta la fisiología testicular y las funciones reproductivas masculinas [248] y glicerol [248] que tiene propiedades antiespermatogénicas y, cuando sus niveles son altos en los testículos, provoca la alteración de la barrera hemato-testicular, lo que perjudica la homeostasis del líquido tubular [249].

En resumen, el CC alteró principalmente el metabolismo del glutatión, la biosíntesis de aminoacil-ARNt, el metabolismo de la riboflavina, el metabolismo de los glicerolípidos y la biosíntesis de arginina. Por otro lado, el impacto de la suplementación con Se alteró principalmente en la biosíntesis de aminoacil-ARNt, el metabolismo de las purinas, la biosíntesis de arginina y, especialmente, el metabolismo de los glicerolípidos. Por lo tanto, al comparar los dos perfiles metabólicos, observamos que una de las principales diferencias metabólicas fue que el metabolismo de la riboflavina no se vio afectado por la suplementación de Se. Este hallazgo concuerda con datos previos de otros autores [250] que confirman la infertilidad masculina debida a contaminantes mediada por el deterioro del metabolismo de la riboflavina.

Por otra parte, encontramos correlaciones específicas y significativas entre la abundancia relativa de la microbiota intestinal a nivel de género y los metabolitos testiculares en los diferentes grupos de ratones (Figura 34, Figura 35).

En este sentido, se identificaron sesenta y seis géneros con abundancia significativamente diferente entre los grupos de ratones estudiados en la microbiota intestinal de los ratones. Las asociaciones entre los metabolitos testiculares y los microbios intestinales presentes en el grupo C cambiaron después de la exposición a CC, así como por la suplementación con Se. Detallamos a continuación los cambios microbianos:

- (i) Géneros que presentan solo enlaces con metabolitos testiculares en el grupo C (*p. ej., Prevotellaceae* UCG-001, *Parvibacter*, *Oscillospiraceae* UCG-005, *Ruminococcaceae* UBA1819).

- (ii) Géneros que presentan solo enlaces con metabolitos testiculares en el grupo CC-Se (*p. ej., grupo Clostridium innocuum, grupo Lachnospiraceae FCS020, Merdibacter*).
- (iii) Géneros que presentan enlaces con metabolitos testiculares solo en el grupo C y CC-Se, pero no en CC (*p. ej., grupo intestinal Rikenellaceae RC9, Streptococcus, Enterorhabdus, Anaerovoracaceae Familia XIII UCG-001*).
- (iv) Géneros que presentan enlaces con metabolitos testiculares solo en los grupos CC y CC-Se, pero no en C (*p. ej., Roseburia, Enterococcus, Erysipelatoclostridium, Anaeroplasma, grupo Lachnospiraceae FCS020, grupo Eubacterium siraeum, Coriobacteriaceae UCG-002, Lachnospiraceae ASF356, Tuzzerella*).

No se halló ningún género relacionado con metabolitos testiculares en el grupo CC que estuvieran ausentes en los otros grupos.

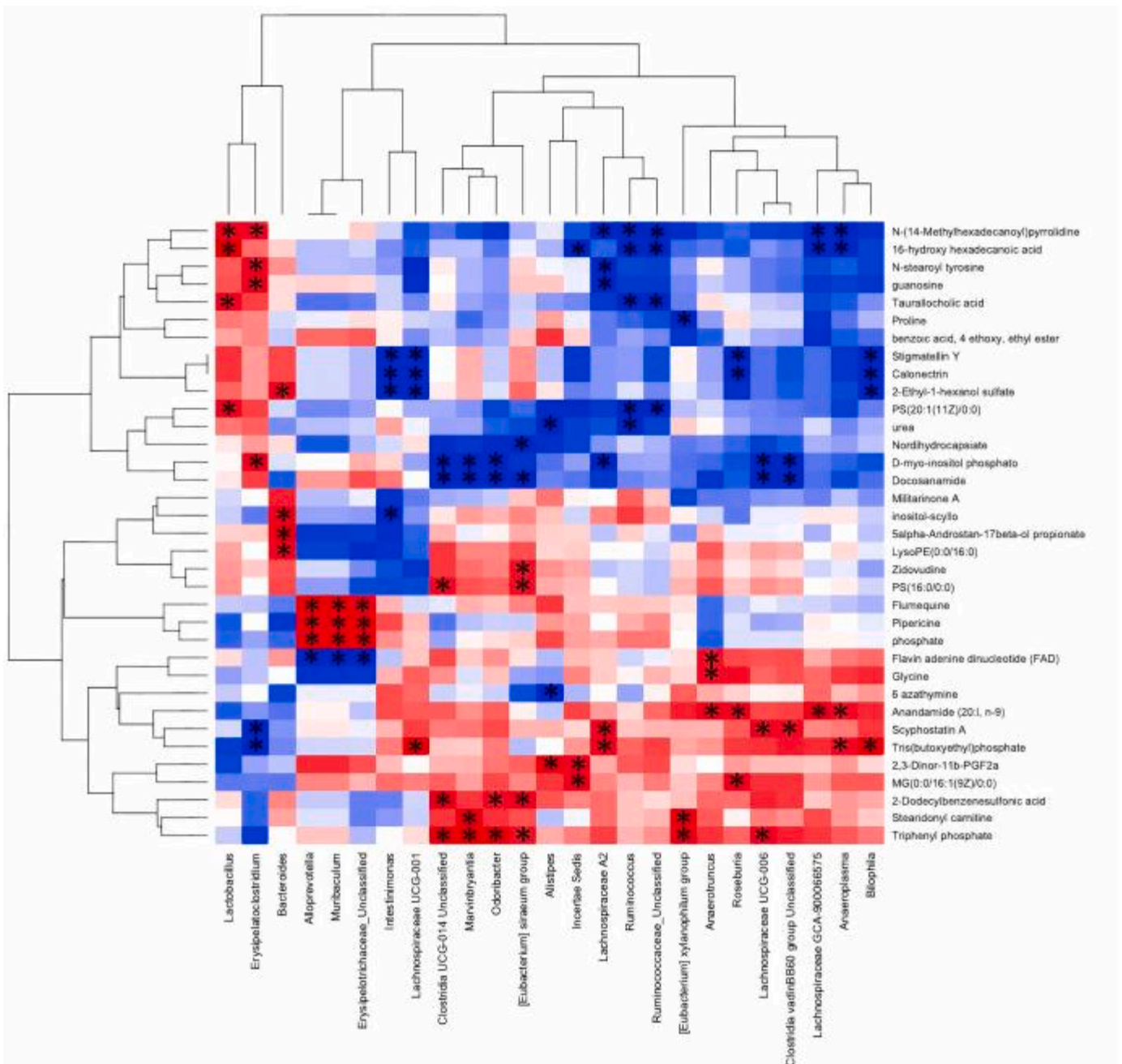


Figura 34. Mapas de calor de correlación de Spearman que muestran las asociaciones entre los metabolitos de los testículos y la microbiota intestinal en ratones tras la exposición a un “cóctel químico” (CC).

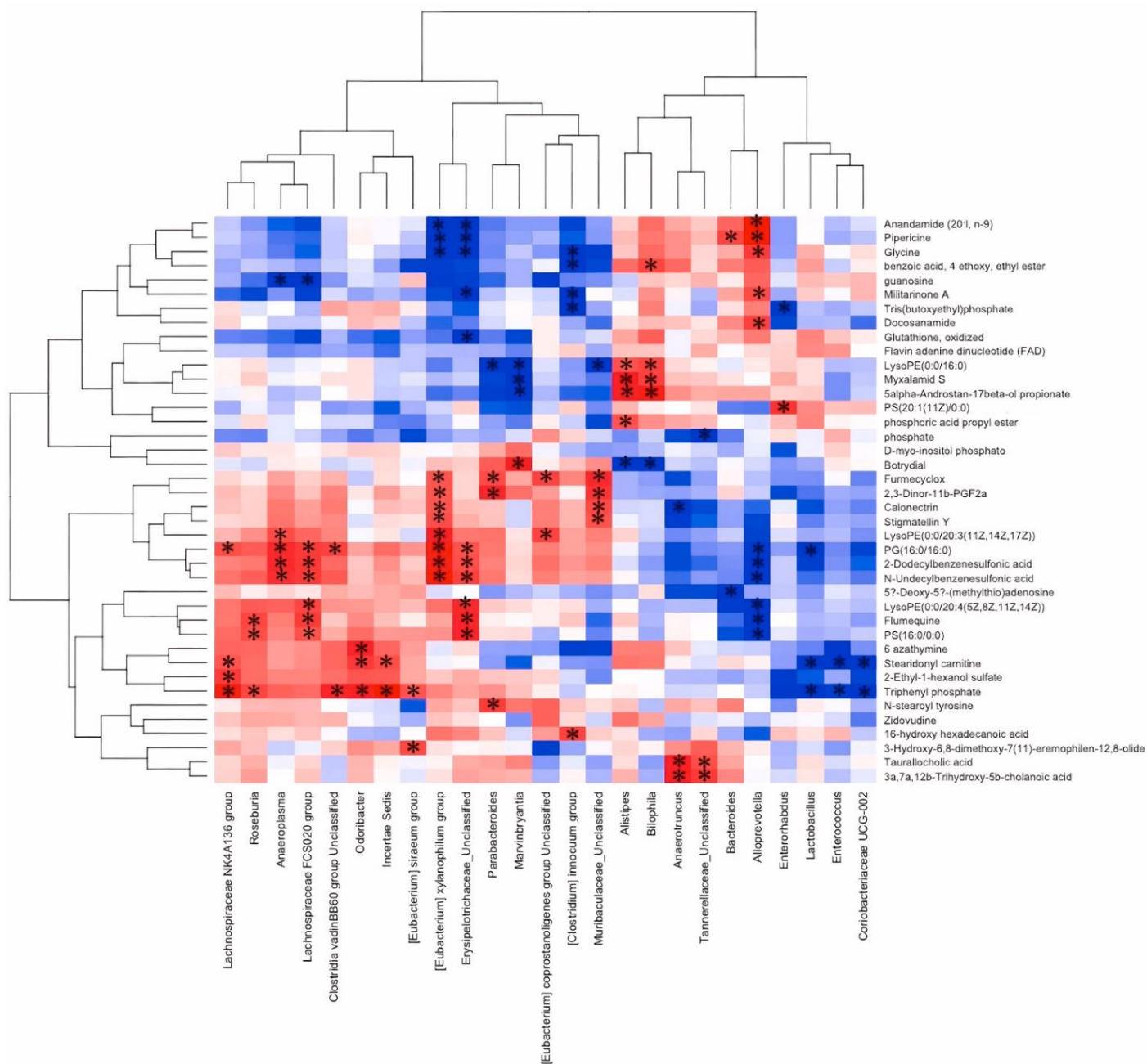


Figura 35. Mapas de calor de correlación de Spearman que muestran las asociaciones entre los metabolitos de los testículos y la microbiota intestinal en ratones tras la exposición a un “cóctel químico” suplementados con selenio (CC-Se).

De forma específica, en el grupo CC, el género *Roseburia* se relacionó negativamente con la anandamida testicular (20:1, n-9) y la MG(16:1), mientras que se relacionó positivamente con la calonectrina. Sin embargo, después de la suplementación con Se (CC-Se), este género se relacionó negativamente con la FLQ testicular y la PS (16:0).

El género *Lactobacillus* se asoció negativamente con la PS (20:1), la N-(14-metilhexadecanoil) pirrolidina, el ácido 16-hidroxihexadecanoico y el ácido tauralocólico en el grupo CC, mientras que en el grupo CC-Se, se relacionó positivamente con la estearidonil carnitina y la PG (16:0/16:0).

Asimismo, el género *Bacteroides* se asoció negativamente con LPE (16:0), propionato de 5-alfa-androstan-17-beta-ol y sulfato de 2-etil-1-hexanol inositol-scilo en el grupo CC, mientras que en el grupo CC-Se se asoció positivamente con 5-desoxi-5-(metiltio) adenosina y negativamente con pipericina.

Alloprevotella se asoció positivamente en el grupo CC con dinucleótido de flavina y adenina (FAD) y negativamente con fosfato, FLQ y pipericina, mientras que en el grupo CC-Se se asoció negativamente con anandamida (20:1, n-9), docosanamida, pipericina y glicina y positivamente con FLQ, PS(16:0), LPE(20:4), ácido 2-dodecibencenosulfónico, PG(16:0/16:0) y ácido N-undecilbencenosulfónico.

El grupo *Eubacterium xylanophilum* se asoció positivamente con prolina y D-mioinositol fosfato en CC, mientras que se asoció negativamente con estearidonil carnitina. Sin embargo, en CC-Se se asoció positivamente con anandamida (20:1 n-9), pipericina y glicina, mientras que se asoció negativamente con LysoPE (20:3), 2,3-dinor-11b-PGF2a y ácido 2-dodecibencenosulfónico.

Dado las numerosas asociaciones resultantes entre la microbiota intestinal y los metabolitos testiculares, se sugiere una posible comunicación cruzada inducida por la exposición al "cóctel químico" y la suplementación con Se.

Como ha sido referido, algunas asociaciones solo están presentes en los grupos C y CC-Se, pero no en CC, lo que sugiere un posible papel beneficioso del Se en la comunicación cruzada intestino-gónada. Sin embargo, los metabolitos testiculares relacionados con la microbiota intestinal específica, a nivel de género, son diferentes en la mayoría de los casos.

Entre estos géneros hay una gran cantidad de microbios intestinales que cambiaron las asociaciones con los metabolitos testiculares al comparar los grupos CC y CC-Se.

Entre estas bacterias, el género *Roseburia* se ha correlacionado previamente con metabolitos del plasma seminal en ovejas con espermatozoides de alta movilidad [251], se relacionó con selenoproteínas testiculares de ratones [100] y se correlacionó negativamente con la testosterona en ratones [252], el género *Lactobacillus* regula negativamente la expresión de genes relacionados con el cáncer de testículo [253], se informó que el género *Bacteroides* era uno de los géneros dominantes en la maduración de los espermatozoides testiculares [254], el género *Alloprevotella* correlacionó positivamente con la testosterona en ratones [252]. *Eubacterium siraeum* se ha asociado con una amplia gama de enfermedades, lo que indica su papel potencial como taxón microbiano con efectos perjudiciales para el huésped.

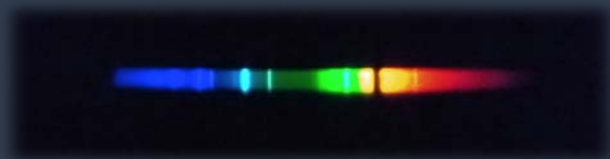
La abundancia o actividad alterada de estas bacterias, junto con su producción de metabolitos, puede alterar el delicado equilibrio de la interacción entre el huésped y la microbiota y contribuir al desarrollo o progresión de la enfermedad. La producción de metabolitos por parte de estos grupos bacterianos, que pueden incluir moléculas proinflamatorias o subproductos tóxicos, puede contribuir aún más al daño al huésped.

En cuanto a la posible acción antagónica del Se contra los contaminantes, nuestros resultados anteriores sugirieron que la suplementación con Se condujo al transporte de casi todos los elementos (excepto el Cd) desde los órganos metabólicos menos activos (testículos, cerebro y pulmón) a los riñones, probablemente estimulando la excreción y que la coexposición al Se y al Cd condujo a la acumulación de Cd en todos los órganos, pero especialmente en los testículos [255].

Podemos concluir que empleando una multiplataforma analítica multiplataforma basada en GC-MS y UHPLC-QTOF-MS para el análisis metabolómico no dirigido de testículos, es posible identificar un significativo impacto de CC y un potencial papel antagonista del suplemento de Se. Los metabolitos caracterizados pertenecen a clases de compuestos esenciales para la reproducción, previamente asociados con la regulación de las hormonas liberadoras de gonadotropinas en mamíferos. Estos metabolitos influyen en la fisiología testicular y las funciones reproductivas masculinas, incluyendo efectos antispermatogénicos y la disrupción de la barrera hemato-testicular. Además, nuestros hallazgos sugieren una importante interacción entre el intestino y las

gónadas, evidenciada por las numerosas asociaciones significativas observadas entre los microbios intestinales y los metabolitos testiculares.

ARTÍCULO 2





Gut-gonad crosstalk in mice exposed to a “chemical cocktail” combining metabolomics and microbial profile by amplicon sequencing

C. Parra-Martínez^a, M. Selma-Royo^b, B. Callejón-Leblic^a, M.C. Collado^{b,1}, N. Abril^{c,1}, T. García-Barrera^{a,*}

^a Research Center of Natural Resources, Health and the Environment (RENSMA), Department of Chemistry, Faculty of Experimental Sciences, University of Huelva, Fuerzas Armadas Ave., 21007, Huelva, Spain

^b Institute of Agrochemistry and Food Technology-National Research Council (IATA-CSIC), Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, Valencia, Spain

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Córdoba, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, E-14071, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Handling Editor: Bryan Delaney

Keywords:

Testicular metabolomics
Selenium
Chemical cocktails
Metallomics
Microbiota

ABSTRACT

Testes are very prone to be damaged by environmental pollutants, but there is a lack of information about the impact of “chemical cocktails” (CC) on the testicular metabolome and the possible influence in the gut-gonad crosstalk. For this, BALB/c mice were given flumequine and diclofenac orally in food and potentially toxic trace elements (Cd, Hg, As) in drinking water. A mice group was supplemented with selenium, a well-known antagonist against many pollutants. Our results revealed that the steroid 5- α -androstane-17- β -ol propionate, suggested as a parameter of androgenicity independent of testosterone levels, proline that improves reproductive indicators in male rabbits affected by environmental stress among others metabolites are only present after CC exposure with rodent and selenium supplemented diet. Selenium also antagonized the up-or down-regulation of anandamide (20:l, n-9) ($p < 0.001$ and FC 0.54 of CC vs C but $p > 0.05$ and FC 0.74 of CC-Se vs C), that regulates gonadotropin-releasing hormones in mammals, 2,3-dinor-11 β -PGF₂ α ($p < 0.001$ and FC 0.12 of CC vs C but $p > 0.05$ and FC 0.34 of CC-Se vs C), which has been related with reproductive hormones, besides others testicular metabolites altered by the exposure to the CC and reversed the levels to control. Moreover, numerous significant associations between gut microbes and testicular metabolites indicated a possible impact of pollutants in the testes mediated by gut microbiota due to a gut-gonad crosstalk.

1. Introduction

According to a recent report published in 2018 on assisted reproductive techniques in the European Union for the year 2014, there is a clear trend showing a continuous expansion of the number of reproductive treatments in Europe (De Geyter et al., 2018). In parallel, there is a continuous upward trend of the infertility rate in this century being about 15% of couples infertile and about 40–50% of infertility cases caused by males (Kilchevsky and Honig, 2012). The causes of male infertility are multifaceted and the etiology of a high percentage of cases remains unknown, but concerns have arisen regarding the impact of environmental pollutants (Gao et al., 2015). Among them, mercury (Hg) exposure can disrupt the reproductive system and induce immunosuppression, fibrosis (Li et al., 2022) and metabolic impairments in male mice (M. A. García-Sevillano et al., 2014), arsenic (As) can affect

spermatogenesis and testicular morphologic structure, leading to oxidative stress (Wu et al., 2021), metabolic impairments (García-Sevillano et al., 2013a) and inducing a gradual reduction in Leydig cell population (da Silva et al., 2017; Sarkar et al., 2008) and spermatozoa (da Silva et al., 2017), while cadmium (Cd) can damage germ and Sertoli cells, and produce testicular necrosis, since this metal leads to the rupture of the blood-testis barrier (Minutoli et al., 2015). However, synergistic and antagonistic effects between pollutants have been frequently described (García-Barrera et al., 2012; García-Sevillano et al., 2013b; M. A. García-Sevillano et al., 2014b, 2014a; Rodríguez-Moro et al., 2019), and thus, their biological effect should not be studied in isolation. Likewise, zinc (Zn) can protect testicular damage caused by low-dose of Hg in mice (Orisakwe et al., 2001), As and antimony (Sb) can cause synergistic toxic effects in mice testis (Wu et al., 2021), while selenium (Se) can attenuate diclofenac (DCF)-induced testicular and

* Corresponding author.

E-mail address: tamara@dqcm.uhu.es (T. García-Barrera).

¹ Senior authors.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114627>

Received 8 January 2024; Received in revised form 27 February 2024; Accepted 28 March 2024

Available online 30 March 2024

0278-6915/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

epididymal toxicity in rats (Owumi et al., 2020) and it is well-known for its antagonistic action against many other pollutants (García-Barrera et al., 2012). Due to the health-relevant effects of Se, it has been proposed as a functional supplement (Gómez-Jacinto et al., 2012) as well as for preventing several diseases like cancer (Cai et al., 2016).

In addition, “chemical cocktails” can shape gut microbiota (Arias-Borrego et al., 2022; Ramírez-Acosta et al., 2021) and brain metabolome (Parra-Martínez et al., 2022), while Se modulates the gut microbiota towards an increase in some potentially beneficial microorganisms (e.g. *Lactobacillus* genus) (Callejón-Leblic et al., 2021) and shapes gut metabolites (Callejón-Leblic et al., 2022).

Previous studies, including Jarak et al. (2018), have identified a diverse range of metabolites within the rat testis, highlighting the presence of amino acids, their derivatives, organic acids, lipid-related compounds, and nitrogenous bases. Notably, pathways involved in phospholipid, nucleotide, and amino acid metabolism, alongside energy-generating pathways like the TCA cycle, glycolysis, and glyoxylate and dicarboxylate metabolism, stand out as key players in testicular function.

Herein, we described the impact of a “chemical cocktail” of potentially toxic trace elements (As, Cd, Hg) and pharmaceuticals (DCF and flumequine, FLQ) on mice testicular metabolome and the potential communication with the gut microbiota. Moreover, a group of mice was supplemented with Se to delve into the potential antagonism against those pollutants.

2. Experimental section

2.1. Experimental design with mice and dosage information

The experiments with animals were performed at the Animal Experimentation Service of the University of Cordoba (SAEX-UCO), by qualified staff and following the European Community animal care guidelines. This work has been approved by the research ethics from Ethical Committee of the University of Córdoba and the Regional Government of Andalusia (Spain) and a proof/certificate is available on request (Code Num. October 17, 2022/126). The experimental design has been previously described (Arias-Borrego et al., 2022). Briefly, eight weeks *Mus musculus* BALB/c male mice were randomly divided into three groups for three weeks (n = 12) and they were housed in pairs under controlled laboratory conditions, with free access to food and water (Arias-Borrego et al., 2022). Control group (C) was fed a rodent diet, the group CC received a “chemical cocktail” of DCF and FLQ in the chow as well as Arsenic trioxide, Mercury (II) chloride and Cadmium chloride in the drinking water, and the group CC-Se received the “chemical cocktail”, but also a Se-supplemented show with a Se-dosage according to previous studies (D’Amato et al., 2020; Zarrinpar et al.,

2018). The dosages for pollutants were based on concentrations of environmental relevance (Fekadu et al., 2019; González-Gaya et al., 2022; Huygens et al., 2022). Fig. 1 summarizes the exposure experiment.

2.2. Extraction of metabolites from testicular tissues

Metabolites were extracted from testicular tissues following a previously described sample treatment (Ramírez-Acosta et al., 2023). Briefly, the testicular tissues were cryohomogenized using liquid nitrogen into a ceramic mortar. Then, 30.0000 mg of sample were mixed with cold methanol/water (1:1, v/v, -20°C) into a 2 mL cryotube of a TissueLyser LT homogenizer (Qiagen, Germany). A volume of 100 μL was treated with 400 μL of methanol/methyl *tert*-butyl ether (MTBE) (80:20, v/v) and vortex-mixed during 1h. Afterward, the extracts were centrifuged at 4000 g at 20°C for 20 min and the supernatants were divided in two exact aliquots for the analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight mass spectrometer (UHPLC-QTOF). The extracts were dried into a SpeedVac concentrator system at 35°C (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). For UHPLC-QTOF analysis, the extracts of metabolites were reconstituted using a mixture of methanol/MTBE (80:20, v/v) and then, 10 μL were injected into the UHPLC loop. The analysis by GC-MS required a derivatization procedure that consisted of two steps: (i) methoxylation, by adding to the dried extracts 50 μL of methoxyamine hydrochloride in pyridine (20 mg mL^{-1}), which was later incubated at 80°C during 15 min, to protect carbonyl groups. (ii) Silylation, by adding N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (50 μL), which was later incubated under the same conditions used in the methoxylation. The reproducibility and stability of the analysis were assured by preparing six pools with equal volumes of testicular extracts quality control (QCs).

2.3. Quality control samples preparation

For each matrix, a total of six Quality Control samples (QCs) were prepared by pooling equal volumes (20 μL) of all brain extracts from each mice in the study, which were treated with the sample procedure and analyzed for UPLC-QTOF-MS and GC-MS. Quality controls results were statistically treated by principal component analysis (PCA) and score plots represented to check the stability during the analysis”. The relative standard deviation of QC for each metabolite are shown in the supplementary material (Table S1).

2.4. GC-MS metabolomic analysis

The chromatographic separation of metabolites was carried out into

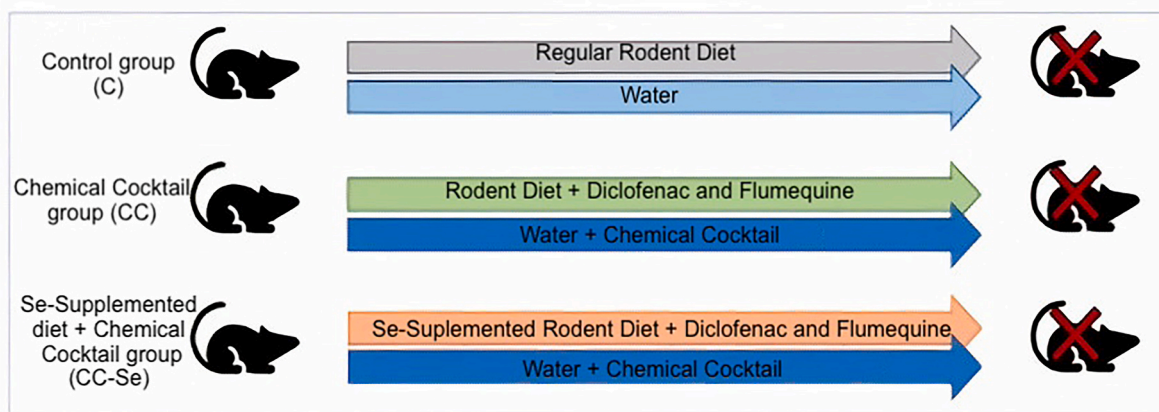


Fig. 1. Experimental design for the animal exposure experiment.

a GC-MS ion trap model Trace GC ULTRA ITQ900 (Thermo Fisher Scientific), using a VF-5MS Factor Four column with dimensions 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm (Agilent technologies, Tokyo, Japan) and helium at 1 mL min⁻¹ as carrier gas. A volume of 1 μL of the derivatized extract was injected into the oven at 200 °C. The temperature of the GC oven was ramped from 100 °C (maintained 0.5 min) to 320 °C at 15 °C min⁻¹ (2.8 min). Metabolites were ionized at 70 eV by electronic impact and the filament was turned off during the first 4 min. MS spectra were acquired in from 35 to 650 m/z.

2.5. UHPLC-QTOF metabolomic analysis

An IM-QTOF model 6560 Ion Mobility LC/Q-TOF system with a dual electrospray ion source handled in both positive and negative ionization modes (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) was used and coupled to a 1290 Agilent UHPLC. Metabolites were separated by reversed-phase chromatography at 0.4 mL min⁻¹ using a gradient from 5 to 95% of the organic mobile phase (acetonitrile) that was mixed with a second aqueous mobile phase, both with 0.5% (v/v) formic acid. The injection volume was 10 μL and the separation was carried out into a chromatographic column model Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 with dimensions of 50 × 2.1 mm, 1.8 μm. The temperature of the column was maintained at 45 °C. Reference masses were introduced for mass calibration in positive (121.0509 and 922.0098 m/z) and negative (1033.9881 and 112.9856 m/z) ionization modes. Other parameters are described in the supplementary material (Table S1).

2.6. Annotation of testicular tissue metabolites

GC-MS data were turned into CDF files utilizing the Thermo File Converter tool (Thermo Fisher Scientific). We used XCMS software included in the R platform (<http://www.r-project.org>) for the extraction, peaks alignment and data normal standardization. In this sense, information were obtained by utilizing the calculation “matched filter method” what cuts the information into extracted ion chromatograms (XIC) on a firm step size, and afterward each cut was sifted with matched filtration utilizing a second-subsidary Gaussian as the model peak shape. The data extraction parameters for GC-MS files were S/N threshold 2, full width at half-maximum (fwhm) 3, and width of the m/z range 0.1. After peak extraction, three iterative cycles with descending bandwidth (bw) from 5 to 1 s were used for grouping and retention time correction. To normalize the data we performed the locally weighted scatter plot smoothing (LOESS) method, which adjusts the local median of log fold changes of peak intensities between samples in the dataset to be approximately zero across the whole peak intensity range. Then, we exported the preprocessed data as a.csv file due to perform further statistical analysis.

We processed the UHPLC-QTOF-MS raw data with Agilent MassHunter Profinder B.10.0 software (Agilent Technologies). We used the Recursive Feature Extraction (RFE) for small molecules from the software to extract de data. RFE consists of two algorithms: First, Molecular Feature Extraction (MFE), which uses extraction, selection of ion species, and charge state to find the features in the dataset. Then, the initial features were aligned by retention time (RT) and mass to create a list of unique features through binning. Second, we performed the Find by Ion algorithm (FbI) using the RT and mass data pairs of the aligned and binning features as input criteria to find the features more accurately. Scoring, integration, and peak filters were also applied as additional filters to the dataset. We used Mass Profiler Professional B.10.0 (Agilent Technologies) to normalize the dataset using total area sums (Supporting information, Table S1).

In order to statistically process the GC-MS data the software SIMCA-P™ (version 11.5, published by UMetrics AB, Umeå, Sweden) was used, features were filtered according to the Variable Importance in the Projection (VIP), taking into account only variables with VIP values above 1.5, which is a good indicative of significant differences among groups.

Mass Profiler Professional B.10.0 (Agilent Technologies) was used to process the data obtained from UHPLC-QTOF-MS, resulting in the determination of the most relevant metabolites between groups. Principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) were carried out for the statistically relevant features found in UHPLC-QTOF-MS and GC-MS. The software supplied us with the predictive and class separation parameters R2 and Q2 of all models built. Before performing statistical analysis, Pareto scaling and logarithmic transformation were applied to the data.

STATISTICA 8.0 from StatSoft was the software used to obtain one-way ANOVA and Tukey test for multiple comparisons. Besides, p-values were adjusted with a Benjamin Hochberg FDR correction. On the other hand, we used R Software Package Hmisc (4.0.2 version) to determine Spearman correlations between gut metabolites and microbiota at the genus level and to plot the heatmaps. The level of statistical significance for all tests was set to p < 0.05.

For GC-MS metabolomic analysis, version 8 NIST Mass Spectral Library was used to annotate metabolites, selecting only those with a probability >80%. Target ions and at least two qualifiers (identifier ions) were selected from each mass spectrum. Those metabolites with a variation of less than 20% in the area qualifier/target ion ratio per metabolite were selected. Kovat's retention indexes (KRI) were calculated for the metabolites using a mixture of alkanes from C7–C40 (Sigma Aldrich, Germany). For UHPLC-QTOF-MS metabolomic analysis, the software MassHunter version B.08.00 was used. To this end, the workflow “Compound Discovery” and the compound mining “Find by Molecular Features” were applied to the dataset. METLIN (<http://metlin.scripps.edu>) and HMDB (<http://hmdb.ca>) databases were used considering only those metabolites with a score higher than 90%. In addition, MS-MS experiments were performed with the same experimental conditions as applied for the primary analysis. Collision-induced dissociation (CID) fragmentation was used.

2.7. Gut microbiota profiling

The gut microbiota profile was obtained by 16S rRNA V3–V4 amplicon sequencing following Illumina protocols as previously described (Arias-Borrego et al., 2022). Previous data was used to identify specific associations between testicular tissue metabolites and gut microbes. As described previously, sequences were processed with the DADA2 pipeline and taxonomy was assigned with the Silva v132 database. Tables with taxonomy at different levels (phylum, family, and genus) were used to combine with the available data in this study.

3. Results

3.1. Testicular mouse metabolome after exposure to the “chemical cocktail” and selenium supplementation

The mice groups studied (C, CC, and CC-Se) were grouped and separated according to their testicular metabolome as can be seen in the principal least squares discriminant analysis plots (PLS-DA) using GC-MS (Fig. 2A), UHPLC-(⁺ESI)-QTOF (Fig. 2B) and UHPLC-(⁻ESI)-QTOF (Fig. 2C). GC-MS led to the poorer separation between groups, probably due to the few number of metabolites annotated with this analytical technique. However, the separation between groups was much better by using UHPLC-QTOF with both ionization modes. Under these conditions, the C group presented the most difference, while CC and CC-Se were only partially separated indicating a partial antagonistic effect of Se-supplementation in the mice's testicular metabolome after the exposure to the CC. Principal components analysis (PCA) (Fig. S1) showed a perfect clustering of the QCs indicating a good reproducibility and stability of the analysis. The partial least squares discriminant analysis (PLS-DAs) built for pairwise comparisons between the studied groups are shown in Fig. S2.

After the analysis, 41 testicular metabolites were annotated

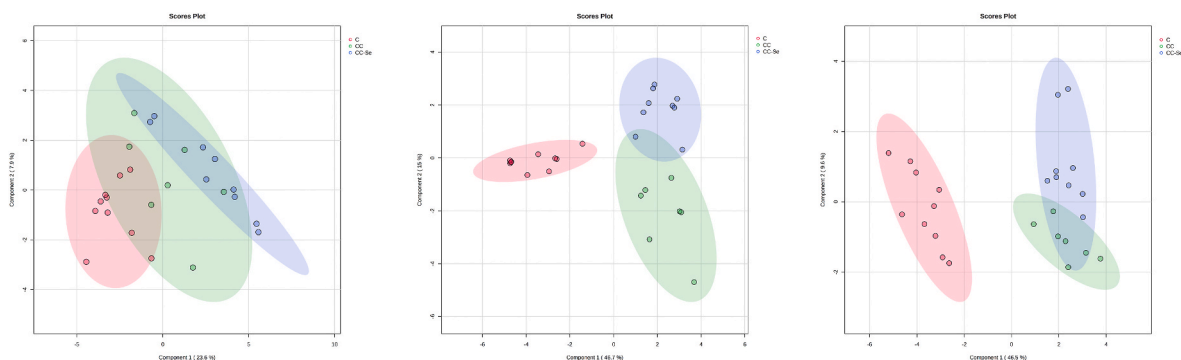


Fig. 2. (A) 3D-PLS-DA of testicular samples corresponding to GC-MS analysis, (B) UHPLC-ESI⁺-QTOF-MS and (C) UHPLC-ESI-QTOF-MS. C: red dots, CC: green dots, CC-Se: blue dots. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Table S2) in the different studied groups using GC-MS (11 metabolites) and UHPLC-(⁺/-ESI)-QTOF (30 metabolites). The *p*-values and fold-changes (FC) of their relative abundance were also calculated for each metabolite in testicular tissue after the comparison of the groups CC and CC-Se with C (Table S2). The FC showed several metabolites that were up-regulated and others down-regulated when comparing the CC and CC-Se groups with C. Table S3 collects the Kovat's retention index (KRIs) of each metabolite annotated by GC-MS as well as the number of trimethylsilyl groups attached to the metabolite (X-TMS), retention times and targeted/qualifier ions used. Fig. 3 shows a heatmap diagram with the list of metabolites annotated and their relative abundance in the different groups. As can be seen (Table S2), there was a group of

metabolites that were not detectable in mice testes of the control group and for this reason, it was not possible to calculate the FC (CC vs C nor CC-Se vs C). However, their relative abundance in testicular tissue was different in mice supplemented with Se or rodent diet. This group includes (compound class, FC CC-Se vs CC): FLQ (quinolones and derivatives, 2.36-fold), nordihydrocapsiate (phenols, 1.69-fold), proline (carboxylic acid and derivatives, 3.84-fold) and 5- α -Androstan-17- β -ol propionate (steraloid, 0.09-fold). **Other metabolites were absent in the control group, but there were not significant change in their abundance when comparing CC with CC-Se:** Lyso-phosphatidylethanolamine (LysoPE) (16:0) (glycerophospholipid) and N-(14-methylhexadecanoyl) (pyrrolidines).

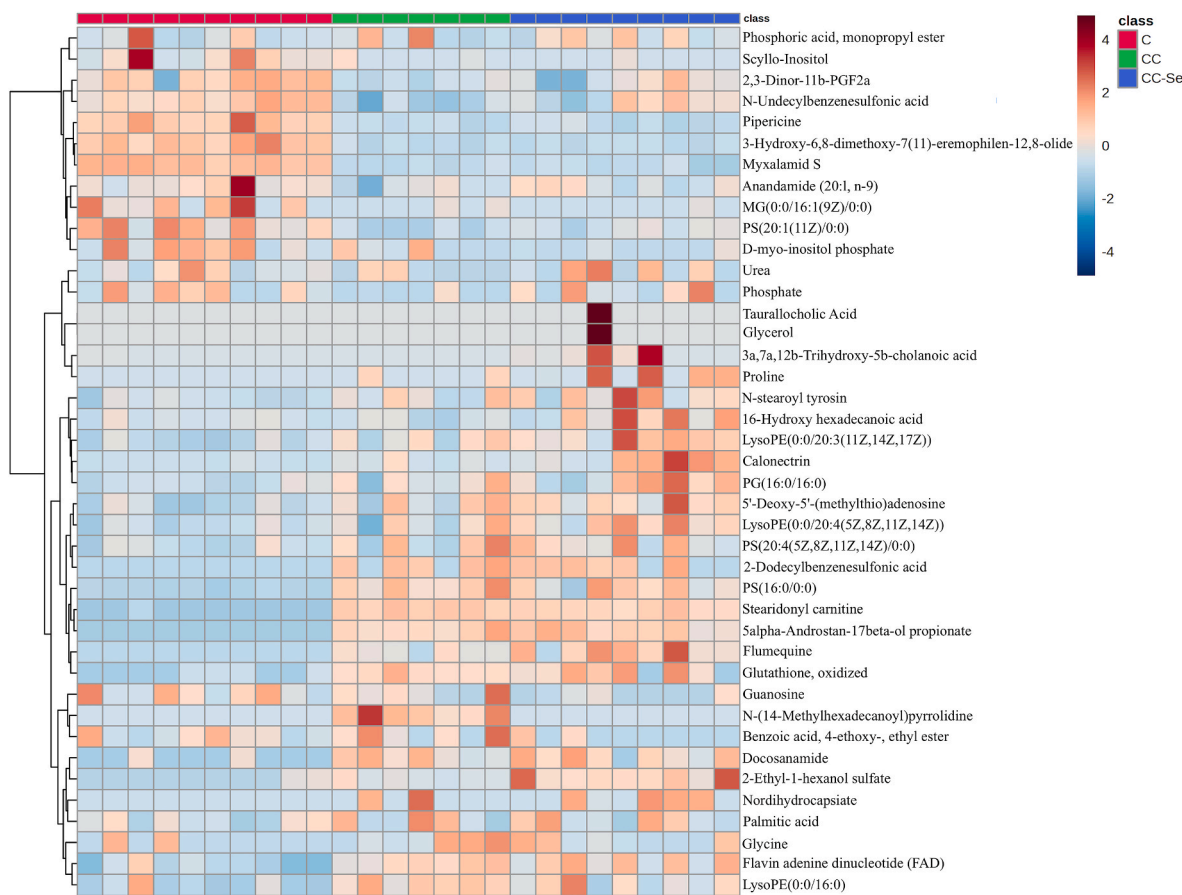


Fig. 3. Cluster heatmap of testicular metabolites from C, CC and CC-Se mice. Metabolites are represented in rows and mice of different groups in columns. Red and blue colors show increased and decreased levels of testicular metabolites, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Interestingly, there is also a group of metabolites that was altered after CC exposure, but Se-supplementation restored their abundance similar to the control group (not significant change in their abundance when comparing CC-Se vs C). This group includes (compound class and FC for CC vs C in brackets): anandamide (20:1, n-9) (organonitrogen compounds, 0.54-fold), 2,3-Dinor-11b-PGF2a (fatty acyl, 0.12-fold), PG(16:0/16:0) (glycerophospholipid, 1.57-fold), and N-undecylbenzenesulfonic acid (benzene and substitute derivative, 0.45-fold). Likewise, there was another band of metabolites that were up- or down-regulated in mice testes after the CC exposure and Se-supplementation led to the opposite regulation. This group includes (compound class, FC CC vs C, CC-Se vs C): taurallocholic acid (steroids and steroid derivatives, 0.37-fold, not calculable because absent in one group) and glycerol (organooxygen compounds, not calculable because absent in one group). Finally, there is a group of metabolites up- or down-regulated after CC exposure and Se-supplementation that were not impaired in the CC group that includes (FC CC-Se vs C): 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine (5'-deoxyribonucleosides, 1.59-fold), 3a,7a,12b-trihydroxy-5b-cholanoic acid (organooxygen compound, 30.71-fold), LysoPE(20:3) (glycerophospholipid, 1.63-fold), LysoPE(20:4) (glycerophospholipid, 1.52-fold), myxalamid S (0.16-fold), PS(20:4) (glycerophospholipids, 1.59-fold), N-stearoyl tyrosine (carboxylic compounds and derivatives, 3.27-fold), calonectrin (prenol lipids, 3.11-fold), MG(16:1) (glycerolipid, 0.04-fold), 16-hydroxy hexadecanoic acid (fatty acyls, 1.38-fold).

As can be seen (Fig. 3, Table S2), there was a band of metabolites that is down-regulated in mice testes after the exposure to the CC and even after Se-supplementation. This group includes metabolites as (compound class and FC for CC vs C and CC-Se vs C, respectively, in brackets): pipericine (fatty acyl, 0.27-fold, 0.26-fold), 3-hydroxy-6,8-dimethoxy-7(11)-eremophilene-12,8-olide (organooxygen compound, 0.12-fold, 0.14-fold), myxalamid S (lipid, 0.18-fold, 0.16-fold), Guanosine (purines, 0.02-fold, 0.01-fold), Palmitic acid (lipid, 0.21-fold, 0.27-fold), carbamide (amide, 0.3-fold, 0.36-fold), Ethyl 4-ethoxybenzoate (Benzene derivative, 0.85-fold, 0.86-fold), Phosphoric acid, monopropyl ester (Phosphate ester, 0.58-fold, 0.71-fold) and monoglyceride (MG) (16:1) (glycerolipid, 0.13-fold, 0.04-fold). Otherwise, there is also a band of compounds that was up-regulated in the mice testes after the exposure to the CC and even after Se-supplementation.

This group includes: FLQ (quinoline carboxylic acid, not present in C), phosphatidylserine (PS) (16:0) (glycerophospholipid, 4.64-fold, 3.79-fold), flavin adenine dinucleotide (flavin nucleotide, 2.7-fold, 2.8-fold), stearidonyl carnitine (fatty acyl, 47.04-fold, 42.48-fold), docosanamide (fatty acyl, 6.02-fold, 6.20-fold), PS(20:4) (glycerophospholipid, 1.52-fold, 1.58-fold), Lyso phosphatidylethanolamine (LysoPE) (16:0) (glycerophospholipid, 2.87-fold, 3.35-fold), oxidized glutathione (carboxylic acids and derivatives, 2.81-fold, 2.10-fold), PS(20:1) (glycerophospholipid, 7.25-fold, 7.14-fold), LysoPE(16:0) (glycerophospholipid, not calculable because absent in one group), 5-alpha-Androstan-17-beta-ol propionate (steroid, not calculable because absent in one group), 2-ethyl-1-hexanol sulfate (organic sulfuric acids and derivatives, 4.00-fold, 10.72-fold), phosphatidylglycerol (PG) (16:0/16:0) (glycerophospholipid, 1.57-fold, 2.14-fold), nordihydrocapsiate (phenol, not calculable because absent in one group), glycine (carboxylic compounds and derivatives, 4.38-fold, 2.28-fold), proline (carboxylic compounds and derivatives, not calculable because absent in one group).

The altered metabolic pathways in mice testes after CC exposure and Se-supplementation were evaluated using the MetaboAnalyst 5.0 tool (metaboanalyst.ca). Fig. 4A and Table S4 show that three metabolic pathways were significantly impaired after CC exposure when the metabolome is compared with C, namely: glutathione metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, riboflavin metabolism, glycerolipid metabolism and arginine biosynthesis. However, the pathway impact of CC exposure in the glycerolipid and glutathione metabolism was very high. Likewise, after CC exposure and Se-supplementation (Fig. 4B) the same metabolic pathways were significantly altered with similar pathway impacts, when the metabolome is compared with C. Otherwise, when the testicular metabolome is compared between CC and CC-Se (Table S4), there are four significantly altered metabolic pathways, namely: aminoacyl-tRNA biosynthesis, purine metabolism, arginine biosynthesis and glycerolipid metabolism, and the last with an important pathway impact.

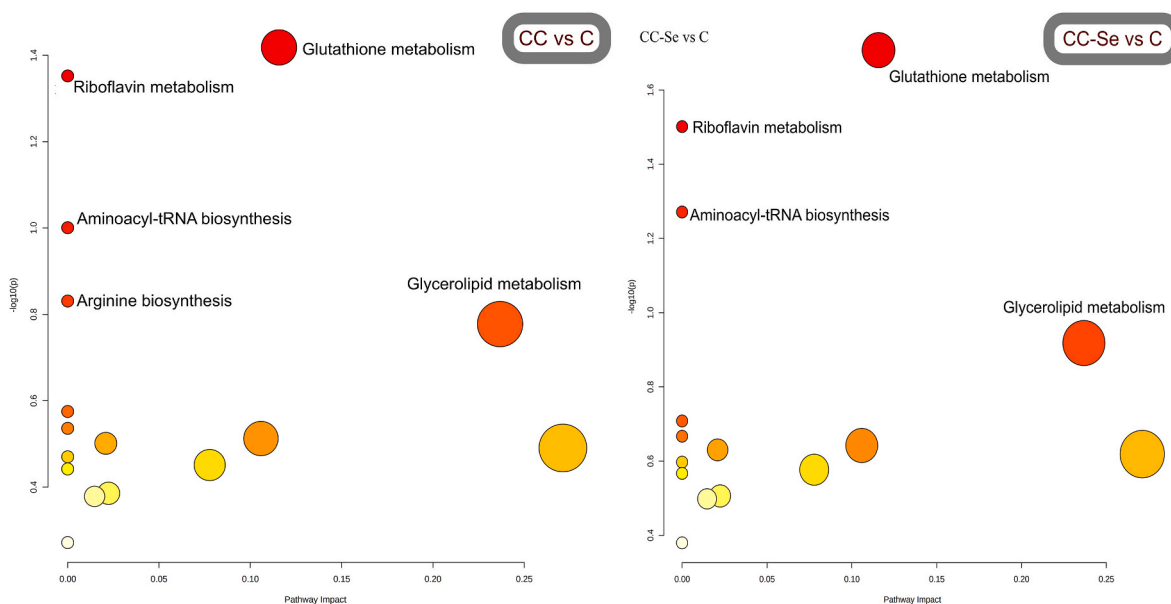


Fig. 4. (A) Pathway analysis plots showing the most impaired metabolic routes in CC and (B) CC-Se groups. The p -values calculated from the enrichment analysis are indicated by a color gradient: from white (highest p -value) to red (lowest p -value), while the pathway impact value calculated from pathway topology analysis is indicated by dot size. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3.2. Testicular metabolome is linked with gut microbiota and the associations are modulated by “chemical cocktail” exposure and selenium supplementation

Specific and significant links were found between the relative abundance of gut microbiota at the genus level and testicular metabolites in the different mice groups (Table S6, Figs. 5 and 6). Sixty-six genera with significantly different abundance among the studied mice groups were identified in mice gut microbiota (Table S5). These links between testicular metabolites and gut microbes present in the C group changed after CC exposure as well as by Se-supplementation. Thus, the microbial shifts can be classified as follows: (i) genera that present only links with testicular metabolites in C group (e.g., *Prevotellaceae* UCG-001, *Parvibacter*, *Oscillospiraceae* UCG-005, *Ruminococcaceae* UBA1819), (ii) genera that present only links with testicular metabolites in CC-Se group (e.g., *Clostridium innocuum* group, *Lachnospiraceae* FCS020 group, *Merdibacter*), (iii) genera that present links with testicular metabolites only in C and CC-Se group, but not in CC (e.g., *Rikenellaceae* RC9 gut group, *Streptococcus*, *Enterorhabdus*, *Anaerovoracaceae* Family XIII UCG-001), (iv) genera that present links with testicular metabolites only in CC and CC-Se groups, but not in C (e.g., *Roseburia*, *Enterococcus*, *Erysipelatoclostridium*, *Anaeroplasm*, *Lachnospiraceae* FCS020 group, *Eubacterium siraeum* group, *Coriobacteriaceae* UCG-002, *Lachnospiraceae* ASF356,

Tuzzerella). There were not any genus linked with testicular metabolites in CC group that were absent in the other groups.

The specific links between testicular metabolites and gut microbiota in CC and CC-Se groups are shown in Figs. 5 and 6, respectively. As can be seen, numerous links were shifted between both mice groups indicating a potential role of Se-supplementation in these associations. Thus, in CC group, *Roseburia* genus was negatively linked with testicular anandamide (20:1, n-9) and MG(16:1), while it was positively linked with calonelectrin. However, after Se-supplementation (CC-Se), this genus was negatively linked with testicular FLQ and PS(16:0). *Lactobacillus* genus was negatively associated with PS(20:1), N-(14-methylhexadecanoyl)pyrrolidine, 16-hydroxy hexadecanoic acid and taurallocholic acid in CC group, while in CC-Se group, it was positively linked with stearidonyl carnitine and PG(16:0/16:0). Likewise, *Bacteroides* genus was negatively linked with lysoPE(16:0), 5- α -androstan-17- β -ol propionate and 2-ethyl-1-hexanol sulfate in CC group, while in CC-Se group, it was positively linked with 5-deoxy-5-(methylthio)adenosine and negatively with pipericine. *Alloprevotella* was positively associated in CC group with flavin adenine dinucleotide (FAD) and negatively with phosphate, flumequine and pipericine, while in CC-Se group, it was negatively linked with anandamide (20:1, n-9), docosanamide, pipericine, and glycine and positively with flumequine, PS(16:0), LysoPE(20:4), 2-dodecylbenzenesulfonic acid, PG(16:0/16:0)

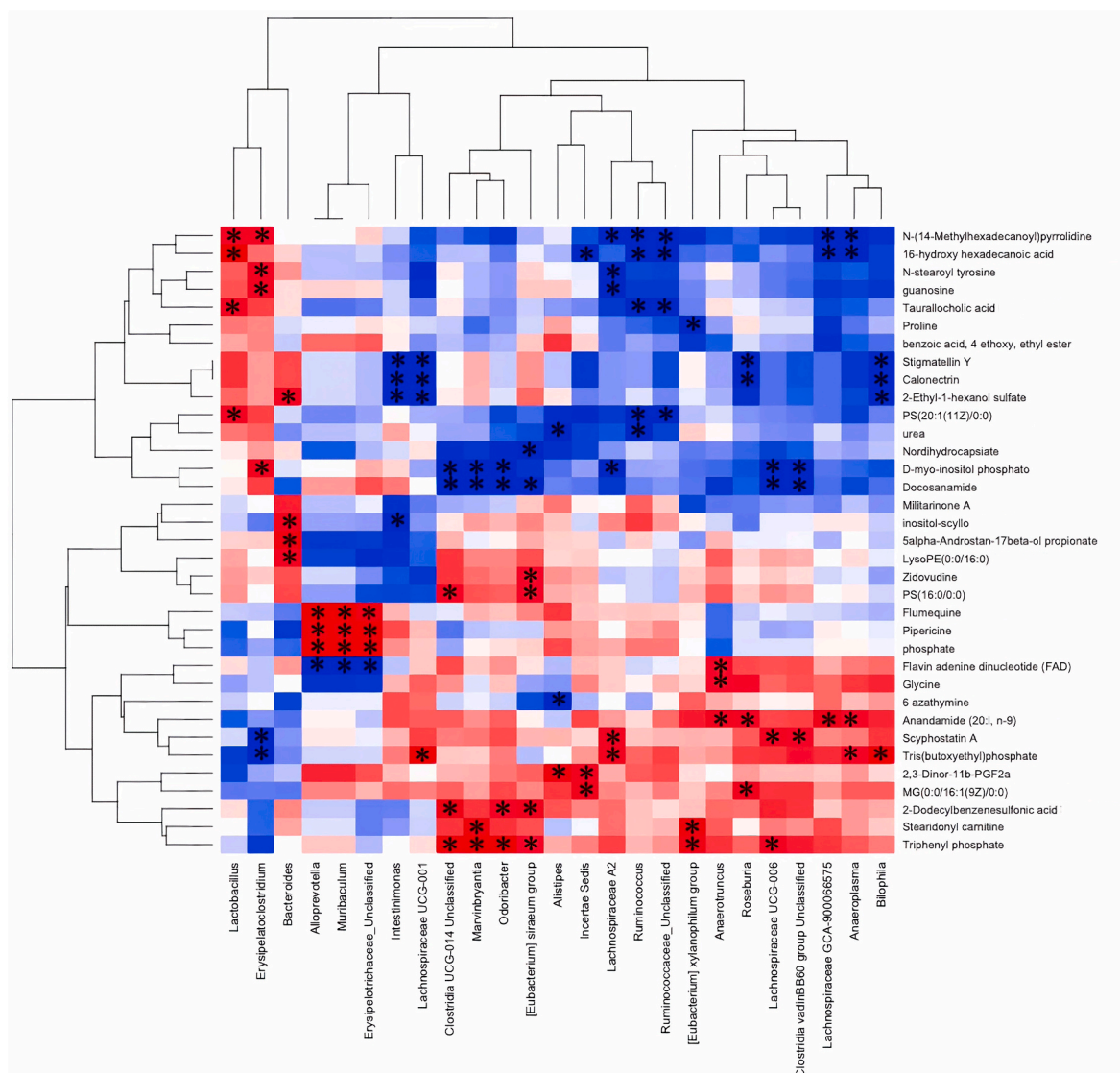


Fig. 5. Spearman correlation heatmaps showing the associations between testes metabolites and gut microbiota in CC.

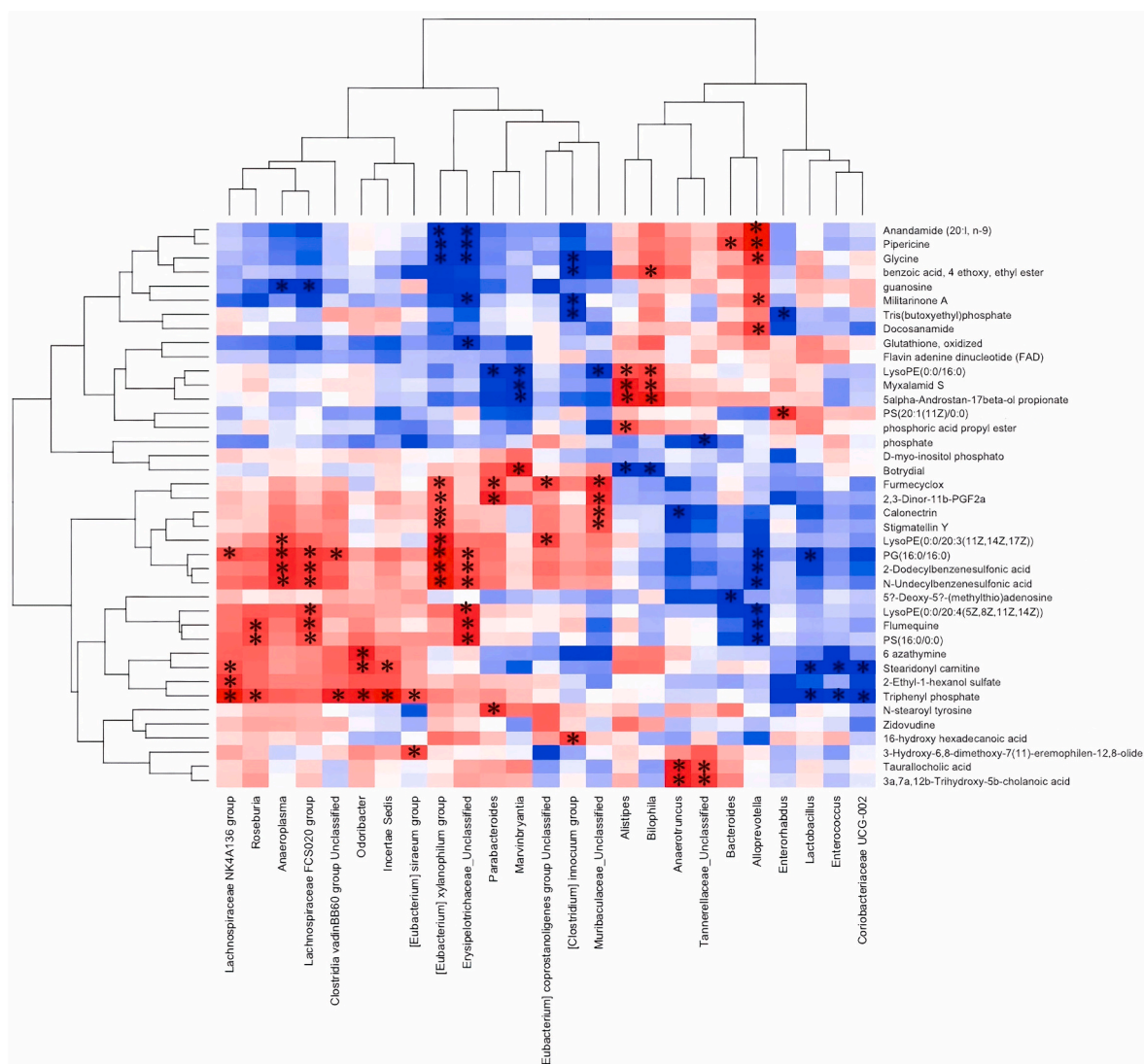


Fig. 6. Spearman correlation heatmaps showing the associations between testes metabolites and gut microbiota in CC-Se.

and N-undecylbenzenesulfonic acid. *Eubacterium xylanophilum* group was positively linked with proline, and D-myo-inositol phosphate in CC, while it was negatively with stearidonyl carnitine. However, in CC-Se it was positively linked with anandamide (20:1 n-9), pipericine and glycine, while it was negatively linked with LysoPE(20:3), 2,3-dinor-11b-PGF2a and 2-dodecylbenzenesulfonic acid.

4. Discussion

4.1. “Chemical cocktail” exposure and selenium supplementation modulated testicular metabolome

Our results suggest that the exposure to the “chemical cocktail” modulated mice testicular metabolome and that Se-supplementation restored many of them. Therefore, we found testicular metabolites only present in CC and CC-Se groups, but at significantly different levels when comparing both. This group of metabolites included FLQ, which was present in the “chemical cocktail” administered to the mice. The abundance of this metabolite was higher in the testicular tissue of mice from CC-Se when compared with CC (2.36-fold), suggesting that Se led to its accumulation in testicular tissue. In the same group of metabolites, Se led to a decrease of the steroid 5-alpha-androstan-17-beta-ol propionate (0.09-fold) in testis and an increase of nordihydrocapsiate and

proline. Interestingly, the level of plasma 17-beta-hydroxy-5alpha-androstan-3-one (DHT) has been suggested as a parameter of androgenicity independent of testosterone (T) levels (Vermeulen, 1976), nordihydrocapsiate target specific metabolic pathways involved in inflammation and has shown potential health benefits (Sancho et al. n. d.) and proline improves haemato-biochemical and reproductive indicators in male rabbits affected by environmental stress (Abdelnour et al., 2021).

Moreover, CC led to the significant impairment of several metabolites, but their levels are comparable in the testicular tissues of mice from the C and CC-Se groups. Thus, suggesting a potential beneficial effect of Se-supplementation by restoring the levels of these molecules. Those testicular metabolites, which are all down-regulated after CC exposure, include the endogenous cannabinoid receptor ligand anandamide (20:1, n-9), that regulates gonadotropin releasing hormones in mammals (Battista et al., 2008), 2,3-dinor-11b-PGF2a, which is the most abundant metabolic product of prostaglandins released by activated mast cells and has been and is related with reproductive hormones (Sanyal et al., 1979), a neurotrophic compound (Riese et al., 2004) and PG (16:0/16:0). Our findings were according to Ramírez-Acosta et al. (2022), who also demonstrated the beneficial effects of dietary sodium selenite supplementation on mice reproductive health.

Testicular metabolomics revealed the unexpected presence of Ethyl

4-ethoxybenzoate, previously documented only in lactating female rats (Sreng et al., 2017), raising questions about its potential role in male reproductive function.

Se-supplementation also antagonized the up-or down-regulation of several metabolites altered by the exposure to the “chemical cocktail” like taurallocholic acid, a taurinated bile acid that beyond its role in digestion, impacts testicular physiology and male reproductive functions (Sèdes et al., 2017), and glycerol (Sèdes et al., 2017), which has antispermatogenic properties and when its levels are high in testis causes blood-testis barrier disruption, impairing tubular fluid homeostasis (Crisóstomo et al., 2017).

While Yang et al. (2022), focused on the time-dependent effects of pollutant exposure, our approach differed by capturing metabolic snapshots at one specific moment. This was motivated by the complexity of our animal model and instrumental limitations, which demanded a targeted analysis of one specific point of the exposure process.

In summary, CC altered mainly glutathione metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, riboflavin metabolism, glycerolipid metabolism and arginine biosynthesis and the Se-supplementation impact was mainly in the aminoacyl-tRNA biosynthesis, purine metabolism, arginine biosynthesis and especially, glycerolipid metabolism. Thus, comparing the two metabolic profiles we observed that one of the major differences at pathways levels was that riboflavin metabolism is not mainly affected under selenium supplementation. This finding is according to previous data (Wei et al., 2018) that confirm male infertility due to pollutants mediated by riboflavin metabolism impairment.

4.2. Testicular metabolites association with gut microbes and shifts induced by selenium supplementation

Our results revealed numerous links between gut microbiota and testicular metabolites suggesting a potential crosstalk induced by the exposure to the “chemical cocktail” and Se-supplementation. As commented before, some links are only present in C and CC-Se groups, but not in CC, suggesting a potential beneficial role of Se in the gut-gonad crosstalk. However, the testicular metabolites related to the specific gut microbiota, at the genus level, are different in the majority of the cases. Among these genera, there is a wide number of gut microbes that shifted the links with testicular metabolites when comparing CC and CC-Se groups. Among this bacteria, *Roseburia* genus has been previously correlated with seminal plasma metabolites in sheep with high-motility sperm (Wang et al., 2023), it was linked with testicular mice selenoproteins (Ramírez-Acosta et al., 2022), and it was negatively correlated with testosterone in mice (Liu et al., 2021), *Lactobacillus* genus down-regulates expression of cancer-testis genes (Azam et al., 2014), *Bacteroides* genus was reported to be one of the dominant genera in testicular maturing spermatozoa (Molina et al., 2021), *Alloprevotella* genus was positively correlated with testosterone in mice (Liu et al., 2021). *Eubacterium siraeum* has been associated with a wide range of diseases, indicating its potential role as microbial taxa with detrimental effects on the host. The altered abundance or activity of these bacteria, along with their metabolite production, may disrupt the delicate balance of the host-microbiota interaction and contribute to disease development or progression. The production of metabolites by these bacterial groups, which can include pro-inflammatory molecules or toxic byproducts, may further contribute to host harm.

In our previously published works, we determined the impact of Se-supplementation in plasma selenoproteins and gut microbiota (Callejón-Leblic et al., 2021), gut metabolites (Callejón-Leblic et al., 2022), brain metabolome (Ramírez-Acosta et al., 2023), testicular selenoproteins (Ramírez-Acosta et al., 2022) and interestingly, we found numerous associations between those selenoproteins and metabolites with specific gut microbes. Moreover, we described the impact of CC exposure on gut microbiota, plasma metabolome, plasma selenoproteins, and plasma arsenometabolites (Arias-Borrego et al., 2022) as well as brain metabolome (Parra-Martínez et al., 2022), demonstrating

potential links between those molecules and gut microbiota. Regarding the potential antagonistic action of Se against pollutants, our previous results suggested that Se-supplementation led to the transport of almost all elements (except Cd) from less metabolic active organs (testes, brain, and lung) to the kidneys, probably stimulating the excretion and that Se and Cd co-exposure led to the accumulation of Cd in all the organs, but especially in testes (Rodríguez-Moro et al., 2020). The present work suggests the impact of “chemical cocktails” in the testicular metabolome and thus, in the gut-gonad crosstalk, as well as the influence of Se-supplementation on that.

4.2.1. Future perspectives

Our study provides novel insights into the role of pollutants and gut microbiota over mice testes metabolome. While our findings offer valuable information, further research is needed to address the specific and synergistic behavior of the different contaminants involved in our chemical cocktail. Additionally, our study used regular BALB/c mice which has certain limitations. Future studies could employ Germ-Free mice to further confirm and expand our gut microbiota-related findings. Ultimately, elucidating the role of microbiota in pollutant exposure could facilitate the development of more effective treatment strategies.

4.2.2. Limitations

Additionally, we were unable to control for all potential confounding factors, such as: understanding of the bioavailability and accumulations of the studied pollutants individually and as a cocktail, difficulties in accurately quantifying individual exposure levels, difficulties in the time-dependent effect of each pollutants and its synergistic effects, we are also affected by the challenges in metabolite identification and annotation. Future studies with more rigorous control of confounding variables and enhanced databases for metabolomics studies are needed to confirm and extend our findings.

5. Conclusions

Untargeted testicular metabolomics combining an analytical multi-platform based on GC-MS and UHPLC-QTOF-MS revealed an important impact of CC and a potential role of selenium supplementation as an antagonist. The annotated metabolites belongs to important class of compounds related to reproduction that have been reported to regulate gonadotropin releasing hormones in mammals, which are related with reproductive hormones. Thus, they impact on testicular physiology and on male reproductive functions, which has antispermatogenic properties and causes blood-testis barrier disruption, or that impairs tubular fluid homeostasis, among others. Our results also suggested an important “gut-gonad crosstalk” due to the great number of significant associations between gut microbes and testicular metabolites.

Funding sources

This work was supported by the projects: PID2021-123073NB-C21 from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICIN). Generación del Conocimiento. MCI/AEI/FEDER “Una manera de hacer Europa”; UHU-1256905 and UHU-202009 from the FEDER Andalusian Operative Program 2014–2020 (Ministry of Economy, Knowledge, Business and Universities, Regional Government of Andalusia, Spain). The authors are grateful to FEDER (European Community) for financial support, Grant UNHU13-1E-1611. CPM thanks MICIN for a predoctoral grant (ref. PRE2019-091,650). MSR and MCC also acknowledge the award of the Spanish Government MCIN/AEI to the Institute of Agrochemistry and Food Technology (IATA-CSIC) as Centre of Excellence Severo Ochoa (CEX2021-001189-S MCIN/AEI / 10.13039/501100011033). The authors would like to acknowledge the support from The Ramón Areces Foundation (ref. CIVP19A5918). Funding for open access charge: Universidad de Huelva/CBUA.

CRedit authorship contribution statement

C. Parra-Martínez: Writing – review & editing, Visualization, Validation, Investigation, Formal analysis, Data curation. **M. Selma-Royo:** Writing – review & editing, Investigation, Formal analysis, Data curation. **B. Callejón-Leblic:** Writing – review & editing, Supervision, Formal analysis, Data curation. **M.C. Collado:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. **N. Abril:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization, Validation, Visualization. **T. García-Barrera:** Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization, Resources, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Abbreviations

C	control mice group fed regular rodent diet
CC	mice fed regular diet exposed to the chemical cocktail
CC-Se	mice fed Se supplemented diet exposed to the chemical cocktail
KRI	Kovat's retention indexes
FC	Fold change
PE	phosphatidylethanolamine
PS	phosphatidylserine
PG	Phosphatidylglycerol
MG	Monoacylglycerol
QC	quality control samples
PLS-Das	partial least squares discriminant analysis
PCA	Principal Components Analysis
MTBE	Methyl tertiary-butyl ether
DCF	diclofenac
FLQ	flumequine
GC-MS	gas chromatography-mass spectrometry
UHPLC-QTOF	ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time of flight
TMS	trimethylsilyl
FC	fold-changes
PCAs	polycyclic aromatic compounds
As	arsenic
Hg	Mercury
Cd	Cadmium
Se	Selenium
Sb	antimony

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2024.114627>.

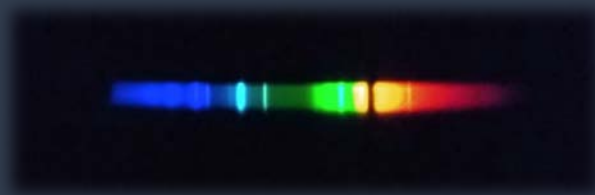
References

Abdelnour, S.A., Al-Gabri, N.A., Hashem, N.M., Gonzalez-Bulnes, A., 2021. Supplementation with proline improves haemato-biochemical and reproductive indicators in male rabbits affected by environmental Heat-stress. *Anim. an open access J. from MDPI* 11, 1–15. <https://doi.org/10.3390/ANI11020373>.

- Arias-Borrego, A., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2022. Impact of 'chemical cocktails' exposure in shaping mice gut microbiota and the role of selenium supplementation combining metallomics, metabolomics, and metataxonomics. *J. Hazard Mater.* 438 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129444>.
- Azam, R., Ghafouri-Fard, S., Tabrizi, M., Modarressi, M.H., Ebrahimzadeh-Vesal, R., Daneshvar, M., Mobasheri, M.B., Motevaseli, E., 2014. Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus crispatus culture supernatants downregulate expression of cancer-testis genes in the MDA-MB-231 cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15, 4255–4259. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.10.4255>.
- Battista, N., Rapino, C., Di Tommaso, M., Bari, M., Pasquariello, N., Maccarrone, M., 2008. Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 286 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.01.010>.
- Cai, X., Wang, C., Yu, W., Fan, W., Wang, S., Shen, N., Wu, P., Li, X., Wang, F., 2016. Selenium exposure and cancer risk: an updated meta-analysis and meta-regression. *Sci. Rep.* 6 <https://doi.org/10.1038/SREP19213>.
- Callejón-Leblic, B., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2021. Impact of antibiotic-induced depletion of gut microbiota and selenium supplementation on plasma selenoproteome and metal homeostasis in a mice model. *J. Agric. Food Chem.* 69, 7652–7662. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C02622>.
- Callejón-Leblic, B., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Gómez-Ariza, J.L., Abril, N., García-Barrera, T., 2022. Untargeted gut metabolomics to delve the interplay between selenium supplementation and gut microbiota. *J. Proteome Res.* 21, 758–767. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.1C00411>.
- Crisóstomo, L., Alves, M.G., Calamita, G., Sousa, M., Oliveira, P.F., 2017. Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. *Mol. Hum. Reprod.* 23, 725–737. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAX049>.
- D'Amato, A., Di Cesare Mannelli, L., Lucarini, E., Man, A.L., Le Gall, G., Branca, J.J.V., Ghelardini, C., Amedei, A., Bertelli, E., Regoli, M., Pacini, A., Luciani, G., Gallina, P., Altera, A., Narbad, A., Gulisano, M., Hoyle, L., Vauzour, D., Nicoletti, C., 2020. Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- and neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome* 8. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00914-W>.
- da Silva, R.F., Borges, C., dos, S., Lamas, C. de A., Cagnon, V.H.A., Kempinas, W. de G., 2017. Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. *J. Toxicol. Environ. Health* 80, 1166–1179. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1376405>.
- De Geyter, C., Calhaz-Jorge, C., Kupka, M.S., Wyns, C., Mocanu, E., Motrenko, T., Scaravelli, G., Smeenk, J., Vidakovic, S., Goossens, V., Gliozheni, O., Strohm, H., Petrovskaya, E., Tishkevich, O., Bogaerts, K., Balic, D., Sibincic, S., Antonova, I., Vrcic, H., Ljiljak, D., Pelekanos, M., Rezabek, K., Markova, M.J., Lemmen, J., Sörtsa, D., Gissler, M., Tiitinen, A., Royere, D., Tandler—schneider, A., Kimmel, M., Antsaklis, A.J., Loutradis, D., Urbancsek, J., Kosztolanyi, G., Björgvinsson, H., de Luca, R., Lokshin, V., Ravil, V., Magomedova, V., Gudleviciene, Z., Belo Lopes, G., Petanovskii, Z., Calleja-Agius, J., Xuereb, J., Moshin, V., Simic, T.M., Vukicevic, D., Romundstad, L.B., Janicka, A., Laranjeira, A.R., Rugescu, I., Doroftei, B., Korsak, V., Radunovic, N., Tabs, N., Virant-Klun, I., Saiz, I.C., Mondéjar, F.P., Bergh, C., Weder, M., Smeenk, J.M.J., Gryshchenko, M., Baranowski, R., 2018. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE: the European IVF-monitoring consortium (EIM) for the European society of human reproduction and embryology (ESHRE). *Hum. Reprod.* 33, 1586–1601. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEY242>.
- Fekadu, S., Alemayehu, E., Dewil, R., Van der Bruggen, B., 2019. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: a comparison of the African and European challenge. *Sci. Total Environ.* 654, 324–337. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.072>.
- Gao, Y., Mruk, D.D., Cheng, C.Y., 2015. Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis - a mechanistic and therapeutic insight. *Expert Opin. Ther. Targets* 19, 1073–1090. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1039513>.
- García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., González-Fernández, M., Moreno, F., García-Sevillano, M.A., Gómez-Jacinto, V., 2012. Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2237–2253. <https://doi.org/10.1007/S00216-012-5776-2>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Abril, N., Pueyo, C., López-Barea, J., Gómez-Ariza, J.L., 2014a. Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J. Proteomics* 104, 4–23. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.032>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro-Roldán, F., Montero-Lobato, Z., Gómez-Ariza, J.L., 2014b. A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J. Proteomics* 104, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.02.011>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gailer, J., Gómez-Ariza, J.L., 2014. Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 5853–5865. <https://doi.org/10.1007/S00216-014-8010-6>.
- García-Sevillano, M.A., García-Barrera, T., Navarro, F., Gómez-Ariza, J.L., 2013a. Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As2O3 based on integrated-omics approaches. *Metallomics* 5, 1644–1655. <https://doi.org/10.1039/C3MT00186E>.
- García-Sevillano, M.A., Jara-Biedma, R., González-Fernández, M., García-Barrera, T., Gómez-Ariza, J.L., 2013b. Metal interactions in mice under environmental stress. *Biomaterials* 26, 651–666. <https://doi.org/10.1007/S10534-013-9642-2>.
- Gómez-Jacinto, V., García-Barrera, T., Garbayo, I., Vílchez, C., Gómez-Ariza, J.L., 2012. Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella*

- sorkiniana in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium. *Pure Appl. Chem.* 84, 269–280. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-09-18/MACHINERADABLECITATION/RIS>.
- González-Gaya, B., García-Buena, N., Buelow, E., Marin, A., Rico, A., 2022. Effects of aquaculture waste feeds and antibiotics on marine benthic ecosystems in the Mediterranean Sea. *Sci. Total Environ.* 806 <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151190>.
- Huygens, J., Rasschaert, G., Heyndrickx, M., Dewulf, J., Van Coillie, E., Quataert, P., Daeseleire, E., Becue, L., 2022. Impact of fertilization with pig or calf slurry on antibiotic residues and resistance genes in the soil. *Sci. Total Environ.* 822 <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.153518>.
- Jarak, I., Almeida, S., Carvalho, R.A., Sousa, M., Barros, A., Alves, M.G., Oliveira, P.F., 2018. Senescence and declining reproductive potential: insight into molecular mechanisms through testicular metabolomics. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1864 (10), 3388–3396. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.07.028>.
- Kilchevsky, A., Honig, S., 2012. Semen quality, sperm selection and hematospermia. *Nat. Rev. Urol.* 92 (9), 68–70. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2011.234>.
- Li, S., Han, B., Wu, P., Yang, Q., Wang, X., Li, J., Liao, Y., Deng, N., Jiang, H., Zhang, Z., 2022. Effect of inorganic mercury exposure on reproductive system of male mice: immunosuppression and fibrosis in testis. *Environ. Toxicol.* 37, 69–78. <https://doi.org/10.1002/TOX.23378>.
- Liu, L., Shu, A., Zhu, Y., Chen, Y., 2021. Cornusid alleviates diabetes mellitus-induced testicular damage by modulating the gut microbiota. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* <https://doi.org/10.1155/2021/5301942>.
- Minutoli, L., Micali, A., Pisani, A., Puzzolo, D., Bitto, A., Rinaldi, M., Pizzino, G., Irrera, N., Galfo, F., Arena, S., Pallio, G., Mecchio, A., Germanà, A., Bruschetta, D., Laurà, R., Magno, C., Marini, H., Squadrito, F., Altavilla, D., 2015. Flavocoxid protects against cadmium-induced disruption of the blood–testis barrier and improves testicular damage and germ cell impairment in mice [corrected]. *Toxicol. Sci.* 148, 311–329. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFV185>.
- Molina, N.M., Plaza-Díaz, J., Vilchez-Vargas, R., Sola-Leyva, A., Vargas, E., Mendoza-Tesarik, R., Galán-Lázaro, M., Mendoza-Ladrón de Guevara, N., Tesarik, J., Altmäe, S., 2021. Assessing the testicular sperm microbiome: a low-biomass site with abundant contamination. *Reprod. Biomed. Online* 43, 523–531. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2021.06.021>.
- Orisakwe, O.E., Afonne, O.J., Nwobodo, E., Asomugha, L., Dioka, C.E., 2001. Low-dose mercury induces testicular damage protected by zinc in mice. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 95, 92–96. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(00\)00374-2](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00374-2).
- Owumi, S.E., Aliyu-Banjo, N.O., Odunola, O.A., 2020. Selenium attenuates diclofenac-induced testicular and epididymal toxicity in rats. *Andrologia* 52. <https://doi.org/10.1111/AND.13669>.
- Parra-Martínez, C., Selma-Royo, M., Callejón-Leblic, B., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2022. Mice brain metabolomics after the exposure to a ‘chemical cocktail’ and selenium supplementation through the gut-brain axis. *J. Hazard Mater.* 438 <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.129443>.
- Ramírez-Acosta, S., Arias-Borrego, A., Navarro-Roldán, F., Selma-Royo, M., Calatayud, M., Collado, M.C., Huertas-Abril, P.V., Abril, N., Barrera, T.G., 2021. Omic methodologies for assessing metal(-loid)s-host-microbiota interplay: a review. *Anal. Chim. Acta* 1176, 338620. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2021.338620>.
- Ramírez-Acosta, S., Huertas-Abril, P.V., Selma-Royo, M., Prieto-Álamo, M.J., Collado, M.C., Abril, N., García-Barrera, T., 2023. The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metabolomics, metallomics, gene expression and amplicon sequencing. *J. Nutr. Biochem.* 109323 <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2023.109323>.
- Ramírez-Acosta, S., Selma-Royo, M., Collado, M.C., Navarro-Roldán, F., Abril, N., García-Barrera, T., 2022. Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota. *Sci. Rep.* 12 <https://doi.org/10.1038/S41598-022-08121-3>.
- Riese, U., Ziegler, E., Hamburger, M., 2004. Militarionone A induces differentiation in PC12 cells via MAP and Akt kinase signal transduction pathways. *FEBS Lett.* 577, 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.045>.
- Rodríguez-Moro, G., Abril, N., Jara-Biedma, R., Ramírez-Acosta, S., Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., 2019. Metabolic impairments caused by a ‘chemical cocktail’ of DDE and selenium in mice using direct infusion triple quadrupole time-of-flight and gas chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1940–1954. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00102>.
- Rodríguez-Moro, G., Roldán, F.N., Baya-Arenas, R., Arias-Borrego, A., Callejón-Leblic, B., Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., 2020. Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27, 1762–1775. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-06573-1>.
- Sancho, R., on Lucena, C., Macho, A., Calzado, M.A., Blanco-Molina, M., Minassi, A., Appendino, G., MuñozMu, E., n.d. Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF- κ B activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200206\)32:6](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200206)32:6).
- Sanyal, S., Deb, C., Patra, P.B., Biswas, N.M., 1979. In vitro studies on histochemical localization of testicular delta5-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity from indomethacin pretreated rats—effect of prostaglandins and luteinizing hormone. *Andrologia* 11, 157–162. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.1979.TB02180.X>.
- Sarkar, S., Hazra, J., Upadhyay, S.N., Singh, R.K., Chowdhury, A.R., 2008. Arsenic induced toxicity on testicular tissue of mice. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 52, 84–90.
- Sèdes, L., Martinot, E., Baptissart, M., Baron, S., Caira, F., Beaudoin, C., Volle, D.H., 2017. Bile acids and male fertility: from mouse to human? *Mol. Aspect. Med.* 56, 101–109. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2017.05.004>.
- Sreng, L., Temime-Roussel, B., Wortham, H., Mourre, C., 2017. Chemical identification of “maternal signature odors” in rat. *Chem. Senses* 42 (3), 211–222. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjw124>.
- Vermeulen, A., 1976. Testosterone and 5alpha-androstan-17beta-ol-3-one (DHT) levels in man. *Acta Endocrinol.* 83, 651–654. <https://doi.org/10.1530/ACTA.0.0830651>.
- Wang, M., Ren, C., Wang, P., Cheng, X., Chen, Y., Huang, Y., Chen, J., Sun, Z., Wang, Q., Zhang, Z., 2023. Microbiome-metabolome reveals the contribution of the gut-testis Axis to sperm motility in sheep (Ovis aries). *Anim. an open access J. from MDPI* 13, 996. <https://doi.org/10.3390/ANI13060996>.
- Wei, Z., Xi, J., Gao, S., You, X., Li, N., Cao, Y., et al., 2018. Metabolomics coupled with pathway analysis characterizes metabolic changes in response to BDE-3 induced reproductive toxicity in mice. *Sci. Rep.* 8 (1), 5423. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23484-2>.
- Wu, S., Zhong, G., Wan, F., Jiang, X., Tang, Z., Hu, T., Rao, G., Lan, J., Hussain, R., Tang, L., Zhang, H., Huang, R., Hu, L., 2021. Evaluation of toxic effects induced by arsenic trioxide or/and antimony on autophagy and apoptosis in testis of adult mice. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 28, 54647–54660. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-14486-1>.
- Yang, J., Liao, A., Hu, S., Zheng, Y., Liang, S., Han, S., Lin, Y., 2022. Acute and chronic toxicity of binary mixtures of bisphenol A and heavy metals, 2022 *Toxics* 10, 255. <https://doi.org/10.3390/toxics10050255>. Aquatic Emerging Contaminants and Their Ecotoxicological Consequences, 115.
- Zarrinpar, A., Chaix, A., Xu, Z.Z., Chang, M.W., Marotz, C.A., Saghatelian, A., Knight, R., Panda, S., 2018. Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat. Commun.* 9 <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05336-9>.

CAPÍTULO 3



4.3. CAPÍTULO 3.

Debido a restricciones relativas a derechos de autor, el capítulo 3 (incluido el artículo en proceso de publicación), ha sido retirado de la tesis. En sustitución del artículo ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, resumen y palabras claves.

C. Parra-Martínez, B. Callejón-Leblic, H. Rodrigo-Lara, I. Fernández Vega, M. C. Guerrero Márquez, A. Rábano, T. García-Barrera. Asociación de los metales en el cerebro del Alzheimer con los estadios de Braak, *Redox Biology*, 2024, submitted.

RESUMEN:

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Limited studies have evaluated the influence of redox-related metals on Alzheimer's brain. We determined 16 metals in 249 human brain samples including putamen (P), caudate (C), amygdala (A), basal ganglia (BG) and frontal cortex (CTX) with different stages, ranging from Braak I and II (neurofibrillary tangle involvement confined mainly to the transentorhinal region of the brain) to Braak V and VI (extensive neocortical involvement). **METHODS:** Se, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb, Tl, Mo, Mg, Al, V, As and Sb were measured by ICP-MS. Imbalances in the Alzheimer's brain metallome of different Braak stages and different regions compared to controls and associations in the different areas were estimated by ANOVA and Spearman correlations, respectively. **RESULTS:** In V and VI Braak stages, the geometric means of metal biomarker levels significantly different with other groups were (ng g⁻¹): 1192.4 Al, 1.594 V, 4.734 As, 63.1 Mo, 194.4 Se, 36.9 Cr, 0.239 Sb, 4760 Cu, and 11850 Zn in CTX samples, 1510 Al, 285.56 Mn, 10270 Fe, 1.226 V and 1.284 Co in BG samples, and 1.984 Co, 80.063 Mo, and 3.919 As in P. The associations of Mn with Fe and Se were positive for CTX and P samples in the Braak V-VI stages. Associations of Cr, V, and Fe with other elements were mainly positive in BG and C. **CONCLUSIONS:** The metallomes of brain regions compared to the controls were significantly different for most of the metals, particularly in the CTX, P, and BG. Metals may differ in Braak stages across different human brain regions.

PALABRAS CLAVES:

Metals, human brain, putamen, caudate, amygdale, frontal cortex, basal ganglions, post-mortem, inductively coupled plasma mass spectrometry

4.3. Capítulo 3:

El metaloma cerebral post mortem del paciente con Alzheimer depende de los estadios de Braak y de las regiones cerebrales.

Subtítulo de publicación: Asociación de los metales en el cerebro del Alzheimer con los estadios de Braak

Artículo 3

C. Parra-Martínez, B. Callejón-Leblic, H. Rodrigo-Lara, I. Fernández Vega, M. C. Guerrero Márquez, A. Rábano, T. García-Barrera. Asociación de los metales en el cerebro del Alzheimer con los estadios de Braak, *Redox Biology*, 2024, submitted.

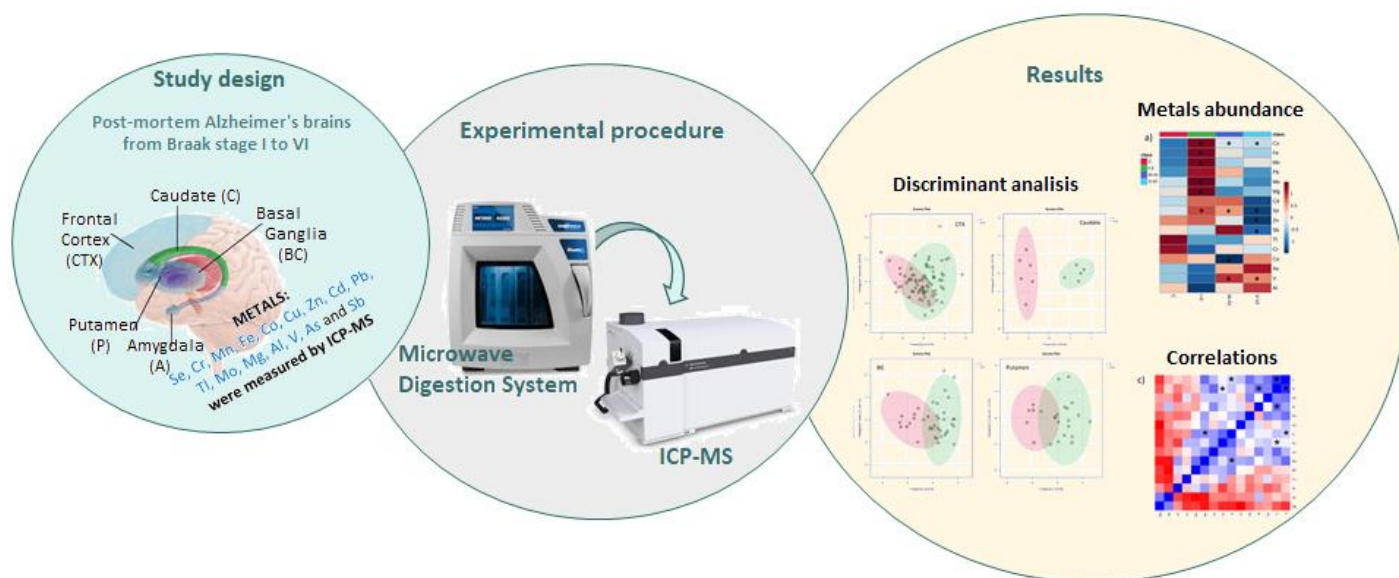


Figura 36. Resumen gráfico del estudio sobre la asociación de los metales en el cerebro del Alzheimer con los estadios de Braak.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

5.1. Conclusiones

Las conclusiones de la presente Tesis Doctoral se exponen a continuación:

- 1) La aplicación de la plataforma analítica basada en la combinación de GC-MS y UHPLC-QTOF ha permitido identificar importantes alteraciones en el metaboloma testicular y cerebral de ratones expuestos a un CC.
- 2) Los metabolitos alterados en tejido cerebral tras la exposición al CC como aminoácidos excitatorios, ceramidas, ácidos grasos y monoglicéridos, entre otros, están relacionados con importantes funciones cerebrales. Dichos metabolitos han sido relacionados en investigaciones previas con trastornos neurológicos o estados alterados de células cerebrales. Además, se determinaron nuevas asociaciones entre los metabolitos cerebrales y los microbios intestinales, apoyando la hipótesis de una comunicación a través del eje microbiota intestinal-cerebro.
- 3) Los metabolitos alterados en tejido testicular están relacionados con la regulación de hormonas reproductivas, afectando a la fisiología testicular y a las funciones reproductivas masculinas. Nuestros resultados también sugirieron una importante "intercomunicación intestino-gónada" debido a la gran cantidad de asociaciones significativas entre los microbios intestinales y los metabolitos testiculares.
- 4) Un importante número de metabolitos alterados en tejido cerebral y testicular de ratones expuestos a CC se modularon tras la suplementación con Se, sugiriendo que este oligoelemento tiene un papel modulador y antagonista frente a dichos contaminantes. Nuestros resultados ponen de manifiesto que existe una posible interacción clave entre la ingesta de Se, la microbiota y los metabolitos cerebrales con efectos sobre la salud del huésped en múltiples niveles, incluido el GBA y la salud reproductiva. Sin embargo, es necesario

determinar el vínculo preciso y se necesitan más estudios dirigidos a los mecanismos específicos.

- 5) El análisis multielemental mediante ICP-MS de tejido cerebral post-mortem de humanos con EA permitió concluir que los neurometales Mg, Fe, Cu y Zn fueron los elementos más abundantes.
- 6) Hemos encontrado diferencias significativas en el metaloma en las diferentes regiones cerebrales obtenidas post-mortem de humanos con EA que dependen significativamente de los estadios de Braak. En este sentido, encontramos niveles aumentados de metales tóxicos (p. ej. Cr, Pb, As y Cd) y elementos minoritarios (p. ej. V) en pacientes con EA avanzados, mientras que otros elementos minoritarios (p. ej. Co y Mo) disminuyeron en varias regiones cerebrales.
- 7) La corteza cerebral y los ganglios basales de cerebros con EA presentaron el metaloma con mayores diferencias entre estadios de Braak.

5.2. Conclusions

The conclusions of this doctoral dissertation are presented below:

- 1) The application of the analytical platform based on GC-MS and UHPLC-MS allows determining important impairments in the testicular and brain metabolomes when mice were exposed to the CC.
- 2) Altered metabolites in brain tissue after CC exposure such as excitatory amino acids, ceramides, fatty acyls and monoglycerides, among others, are of great importance in brain function. These metabolites have been previously described in the literature in connection with neurological disorders or altered states of brain cells. In addition, new associations between brain metabolites and gut microbes were determined, suggesting an intertwined mechanism related to the gut microbiota-brain axis.
- 3) Altered metabolites in testicular tissue of mice exposed to the CC demonstrated a relationship with the regulation of reproductive hormones thus having potential effects on testicular physiology and male reproductive functions. Our results also suggested an important "gut-gonad crosstalk" due to the large number of significant associations between gut microbes and testicular metabolites.
- 4) An important number of altered metabolites in brain and testicular tissues of CC-exposed mice were modulated after Se supplementation, suggesting that this trace element has potential modulatory and antagonistic role against these pollutants. Our results demonstrated that there is a possible key interaction between Se intake, microbiota, and brain metabolites with effects on host health at multiple levels, including GBA and reproductive health. However, the precise link needs to be determined and further studies targeting the specific mechanisms are needed.
- 5) Multielemental analysis by ICP-MS of post-mortem brain tissue from humans with AD allowed us to conclude that the neurometals Mg, Fe, Cu and Zn were the most abundant elements in the different brain regions.

- 6) We found significant differences in the metallome in different brain regions, obtained post-mortem from AD humans, which strongly depend on Braak stages. In this regard, we found increased levels of toxic metals (e.g. Cr, Pb, As and Cd) and minor elements (e.g. V) in advanced AD patients, while other minor elements (e.g. Co and Mo) were decreased in several brain regions.
- 7) The cerebral cortex and basal ganglia of AD brains presented a metallome with greater differences between Braak stages than the rest of the brain tissue analyzed.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. Fernández-Cisnal F (2016) Respuestas biológicas a contaminantes del entorno de Doñana. Integración de metodologías ómicas que evalúan el estrés ambiental en animales de ecosistemas acuáticos. Universidad de Córdoba
2. González N, Marquès M, Nadal M, Domingo JL (2019) Occurrence of environmental pollutants in foodstuffs: A review of organic vs. conventional food. *Food Chem Toxicol* 125:370–375. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.01.021>
3. Peters A, Crane M, Merrington G, Ryan J (2022) Environmental quality standards for diclofenac derived under the European water framework directive: 2. Avian secondary poisoning. *Environ Sci Eur* 34:1–16. <https://doi.org/10.1186/S12302-022-00601-7/FIGURES/2>
4. Rehman K, Fatima F, Waheed I, Akash MSH (2018) Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences. *J Cell Biochem* 119:157–184. <https://doi.org/10.1002/JCB.26234>
5. Carneiro MFH, Barcelos GRM, Barbosa F, Adeyemi J, Gobe G (2018) Metal and Metalloid-Induced Oxidative Damage: Biological Importance of Potential Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2018:.. <https://doi.org/10.1155/2018/3586071>
6. Rivera D, Godoy K, Gaspar A (2022) El veneno no declarado del Río Pilcomayo. In: *Inst. War Peace Report. (IWPR)*. <https://accesoinvestigativo.com/micrositios/venenopilcomayo/index.html>
7. Wilkinson JL, Hooda PS, Barker J, Barton S, Swinden J (2016) Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans. *Crit Rev Environ Sci Technol* 46:336–381. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1096876>
8. Fiati Kenston SS, Su H, Li Z, Kong L, Wang Y, Song X, Gu Y, Barber T, Aldinger J, Hua Q, Li Z, Ding M, Zhao J, Lin X (2018) The systemic toxicity of heavy metal mixtures in rats. *Toxicol Res (Camb)* 7:396–407. <https://doi.org/10.1039/C7TX00260B>
9. Lin X, Gu Y, Zhou Q, Mao G, Zou B, Zhao J (2016) Combined toxicity of heavy metal

- mixtures in liver cells. *J Appl Toxicol* 36:1163–1172.
<https://doi.org/10.1002/JAT.3283>
10. Matejczyk M, Ofman P, Dąbrowska K, Świsłocka R, Lewandowski W (2020) Synergistic interaction of diclofenac and its metabolites with selected antibiotics and amygdalin in wastewaters. *Environ Res* 186:..
<https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.109511>
 11. Chormare R, Kumar MA (2022) Environmental health and risk assessment metrics with special mention to biotransfer, bioaccumulation and biomagnification of environmental pollutants. *Chemosphere* 302:..
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.134836>
 12. Nagpal R, Wang S, Solberg Woods LC, Seshie O, Chung ST, Shively CA, Register TC, Craft S, McClain DA, Yadav H (2018) Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. *Front Microbiol* 9:.. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02897>
 13. Nilsen E, Smalling KL, Ahrens L, Gros M, Miglioranza KSB, Picó Y, Schoenfuss HL (2019) Critical review: Grand challenges in assessing the adverse effects of contaminants of emerging concern on aquatic food webs. *Environ Toxicol Chem* 38:46–60. <https://doi.org/10.1002/ETC.4290>
 14. Zenker A, Cicero MR, Prestinaci F, Bottoni P, Carere M (2014) Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J Environ Manage* 133:378–387.
<https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2013.12.017>
 15. Shiek SS, Sajai ST, Dsouza HS (2023) Arsenic-induced toxicity and the ameliorative role of antioxidants and natural compounds. *J Biochem Mol Toxicol* 37:..
<https://doi.org/10.1002/JBT.23281>
 16. [OMS] OM de la S (2022) Arsenico. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
 17. Wang YX, Sun Y, Huang Z, Wang P, Feng W, Li J, Yang P, Wang M, Sun L, Chen YJ, Liu C, Yue J, Gu LJ, Zeng Q, Lu WQ (2016) Associations of urinary metal levels with serum hormones, spermatozoa apoptosis and sperm DNA damage in a Chinese population. *Environ Int* 94:177–188.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2016.05.022>

18. He Z, Han S, Zhu H, Hu X, Li X, Hou C, Wu C, Xie Q, Li N, Du X, Ni J, Liu Q (2020) The Protective Effect of Vanadium on Cognitive Impairment and the Neuropathology of Alzheimer's Disease in APPSwe/PS1dE9 Mice. *Front Mol Neurosci* 13:512283. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.00021>
19. Wang YX, Wang P, Feng W, Liu C, Yang P, Chen YJ, Sun L, Sun Y, Yue J, Gu LJ, Zeng Q, Lu WQ (2017) Relationships between seminal plasma metals/metalloids and semen quality, sperm apoptosis and DNA integrity. *Environ Pollut* 224:224–234. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.083>
20. Renu K, V.G. A, Tirupathi TP, Arunachalam S (2018) Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy - An update. *Eur J Pharmacol* 818:241–253. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2017.10.043>
21. Tian M, Wang YX, Wang X, Wang H, Liu L, Zhang J, Nan B, Shen H, Huang Q (2021) Environmental doses of arsenic exposure are associated with increased reproductive-age male urinary hormone excretion and in vitro Leydig cell steroidogenesis. *J Hazard Mater* 408:124904. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.124904>
22. Couto-Santos F, Viana AG de A, Souza ACF, Dutra AA de A, Mendes TA de O, Ferreira AT da S, Aguilar JEP, Oliveira LL, Machado-Neves M (2021) Prepubertal arsenic exposure alters phosphoproteins profile, quality, and fertility of epididymal spermatozoa in sexually mature rats. *Toxicology* 460:152886. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2021.152886>
23. Zhang C, Xiong B, Chen L, Ge W, Yin S, Feng Y, Sun Z, Sun Q, Zhao Y, Shen W, Zhang H (2021) Rescue of male fertility following faecal microbiota transplantation from alginate oligosaccharide-dosed mice. *Gut* 70:2213–2215. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-323593>
24. Han Y, Liang C, Yu Y, Manthari RK, Cheng C, Tan Y, Li X, Tian X, Fu W, Yang J, Yang W, Xing Y, Wang J, Zhang J (2020) Chronic arsenic exposure lowered sperm motility via impairing ultra-microstructure and key proteins expressions of sperm acrosome and flagellum formation during spermiogenesis in male mice. *Sci Total Environ* 734:139233. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139233>
25. Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M (2014) Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res* 24:378–399.

- <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>
26. Schaefer HR, Dennis S, Fitzpatrick S (2020) Cadmium: Mitigation strategies to reduce dietary exposure. *J Food Sci* 85:260–267. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14997>
 27. Wang C, Deng H, Wang D, Wang J, Huang H, Qiu J, Li Y, Zou T, Guo L (2021) Changes in metabolomics and lipidomics in brain tissue and their correlations with the gut microbiome after chronic food-derived arsenic exposure in mice. *Ecotoxicol Environ Saf* 228:112935. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112935>
 28. Li S, Han B, Wu P, Yang Q, Wang X, Li J, Liao Y, Deng N, Jiang H, Zhang Z (2022) Effect of inorganic mercury exposure on reproductive system of male mice: Immunosuppression and fibrosis in testis. *Environ Toxicol* 37:69–78. <https://doi.org/10.1002/TOX.23378>
 29. Organización Mundial de la Salud. [OMS] (2017) El Mercurio y la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>
 30. AMAP/UN Environment (2019) Technical Background Report for the Global Mercury Assessment 2018. Arctic Monitoring and Assessment Programme, Oslo, Norway/UN Environment Programme, Chemicals and Health Branch, Geneva, Switzerland. viii + 426 pp including E-Annexes.
 31. Gutiérrez-Pérez LE (2023) Efectos neurológicos de pobladores del municipio de bonanza expuestos al mercurio para el año 2022
 32. United States Environmental Protection Agency [EPA] An official website of the United States government Health effects of exposure to mercury. <https://www.epa.gov/mercury/health-effects-exposures-mercury>
 33. Penna Videau SJ (2013) Trastornos inmunológicos inducidos por mercurio en el sistema reproductor masculino humano. *Saber* 25:11–34
 34. Gan TJ (2010) Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin* 26:1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
 35. He B shu, Wang J, Liu J, Hu X min (2017) Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities. *Chemosphere* 181:178–189. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.04.084>

36. Ungemach FR, Müller-Bahrtdt D, Abraham G (2006) Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 41:33–38. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2006.01.059>
37. Winther KH, Rayman MP, Bonnema SJ, Hegedüs L (2020) Selenium in thyroid disorders - essential knowledge for clinicians. *Nat Rev Endocrinol* 16:165–176. <https://doi.org/10.1038/S41574-019-0311-6>
38. Lü J, Zhang J, Jiang C, Deng Y, Özten N, Bosland MC (2016) Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges. *Nutr Cancer* 68:1–17. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1105267>
39. Fairweather-Tait SJ, Collings R, Hurst R (2010) Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *Am J Clin Nutr* 91:. <https://doi.org/10.3945/AJCN.2010.28674J>
40. Rayman MP (2012) Selenium and human health. *Lancet (London, England)* 379:1256–1268. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61452-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61452-9)
41. Hujeriletu H, Bobe G, Vorachek WR, Gorman ME, Mosher WD, Pirelli GJ, Hall JA (2013) Selenium supplementation alters gene expression profiles associated with innate immunity in whole-blood neutrophils of sheep. *Biol Trace Elem Res* 154:28–44. <https://doi.org/10.1007/S12011-013-9716-6>
42. Mistry HD, Broughton Pipkin F, Redman CWG, Poston L (2012) Selenium in reproductive health. *Am J Obstet Gynecol* 206:21–30. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2011.07.034>
43. Qazi IH, Angel C, Yang H, Zoidis E, Pan B, Wu Z, Ming Z, Zeng CJ, Meng Q, Han H, Zhou G (2019) Role of Selenium and Selenoproteins in Male Reproductive Function: A Review of Past and Present Evidences. *Antioxidants* 2019, Vol 8, Page 268 8:268. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8080268>
44. Lovell MA, Xiong S, Lyubartseva G, Markesbery WR (2009) Organoselenium (Sel-Plex diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice. *Free Radic Biol Med* 46:1527–1533. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2009.03.008>
45. Iqbal J, Zhang K, Jin N, Zhao Y, Liu Q, Ni J, Shen L (2018) Selenium positively affects

- the proteome of 3 × Tg-AD mice cortex by altering the expression of various key proteins: unveiling the mechanistic role of selenium in AD prevention. *J Neurosci Res* 96:1798–1815. <https://doi.org/10.1002/JNR.24309>
46. García-Sevillano MA, Rodríguez-Moro G, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2015) Biological interactions between mercury and selenium in distribution and detoxification processes in mice under controlled exposure. Effects on selenoprotein. *Chem Biol Interact* 229:82–90. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2015.02.001>
 47. García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, González-Fernández M, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2013) Metal interactions in mice under environmental stress. *Biometals* 26:651–666. <https://doi.org/10.1007/S10534-013-9642-2>
 48. Rodríguez-Moro G, Roldán FN, Baya-Arenas R, Arias-Borrego A, Callejón-Leblic B, Gómez-Ariza JL, García-Barrera T (2020) Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res Int* 27:1762–1775. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-06573-1>
 49. Zwolak I (2020) The Role of Selenium in Arsenic and Cadmium Toxicity: an Updated Review of Scientific Literature. *Biol Trace Elem Res* 193:44–63. <https://doi.org/10.1007/S12011-019-01691-W>
 50. Parížek J, Ostádalová I, Kalousková J, Babický A, Pavlík L, Bíbr B (1971) Effect of mercuric compounds on the maternal transmission of selenium in the pregnant and lactating rat. *Reproduction* 25:157–170. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0250157>
 51. Carvalho CML, Lu J, Zhang X, Arnér ESJ, Holmgren A (2011) Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J* 25:370–381. <https://doi.org/10.1096/FJ.10-157594>
 52. García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2013) Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 5:1644–1655. <https://doi.org/10.1039/C3MT00186E>
 53. García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Navarro-Roldán F, Montero-Lobato Z,

- Gómez-Ariza JL (2014) A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics* 104:66–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.02.011>
54. Derrien M, Belzer C, de Vos WM (2017) *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions. *Microb Pathog* 106:171–181. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.02.005>
 55. Liu W, Crott JW, Lyu L, Pflazer AC, Li J, Choi SW, Yang Y, Mason JB, Liu Z (2016) Diet- and Genetically-induced Obesity Produces Alterations in the Microbiome, Inflammation and Wnt Pathway in the Intestine of *Apc⁺/1638N* Mice: Comparisons and Contrasts. *J Cancer* 7:1780–1790. <https://doi.org/10.7150/JCA.15792>
 56. Plovier H, Everard A, Druart C, Depommier C, Van Hul M, Geurts L, Chilloux J, Ottman N, Duparc T, Lichtenstein L, Myridakis A, Delzenne NM, Klievink J, Bhattacharjee A, Van Der Ark KCH, Aalvink S, Martinez LO, Dumas ME, Maiter D, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, Belzer C, De Vos WM, Cani PD (2017) A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice. *Nat Med* 23:107–113. <https://doi.org/10.1038/NM.4236>
 57. Presley LL, Wei B, Braun J, Borneman J (2010) Bacteria associated with immunoregulatory cells in mice. *Appl Environ Microbiol* 76:936–941. <https://doi.org/10.1128/AEM.01561-09>
 58. Dowd JB, Renson A (2018) ‘Under the Skin’ and into the Gut: Social Epidemiology of the Microbiome. *Curr Epidemiol reports* 5:432–441. <https://doi.org/10.1007/S40471-018-0167-7>
 59. Sherwin E, Bordenstein SR, Quinn JL, Dinan TG, Cryan JF (2019) Microbiota and the social brain. *Science* 366:. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAR2016>
 60. Hussain T, Murtaza G, Kalhoro DH, Kalhoro MS, Metwally E, Chughtai MI, Mazhar MU, Khan SA (2021) Relationship between gut microbiota and host-metabolism: Emphasis on hormones related to reproductive function. *Anim Nutr (Zhongguo xu mu shou yi xue hui)* 7:1–10. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2020.11.005>
 61. Moos WH, Faller D V., Harpp DN, Kanara I, Pernokas J, Powers WR, Steliou K

- (2016) Microbiota and Neurological Disorders: A Gut Feeling. *Biores Open Access* 5:137–145. <https://doi.org/10.1089/BIORES.2016.0010>
62. Wu W, Kong Q, Tian P, Zhai Q, Wang G, Liu X, Zhao J, Zhang H, Lee YK, Chen W (2020) Targeting Gut Microbiota Dysbiosis: Potential Intervention Strategies for Neurological Disorders. *Engineering* 6:415–423. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2019.07.026>
63. Rayman MP (2020) Selenium intake, status, and health: a complex relationship. *Hormones (Athens)* 19:9. <https://doi.org/10.1007/S42000-019-00125-5>
64. Brito-Sánchez Y, Marrero-Ponce Y, Barigye SJ, Yaber-Goenaga I, Morell Pérez C, Le-Thi-Thu H, Cherkasov A (2015) Towards Better BBB Passage Prediction Using an Extensive and Curated Data Set. *Mol Inform* 34:308–330. <https://doi.org/10.1002/MINF.201400118>
65. Di L, Kerns EH (2015) *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery*. Wiley
66. Aggarwal V, Mehndiratta MM, Wasay M, Garg D (2022) Environmental Toxins and Brain: Life on Earth is in Danger. *Ann Indian Acad Neurol* 25:S15–S21. https://doi.org/10.4103/AIAN.AIAN_169_22
67. Belyaeva EA, Sokolova T V., Emelyanova L V., Zakharova IO (2012) Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: effects of cadmium, mercury, and copper. *ScientificWorldJournal* 2012:.. <https://doi.org/10.1100/2012/136063>
68. Bharagava RN, Saxena G, Mulla SI (2020) Introduction to Industrial Wastes Containing Organic and Inorganic Pollutants and Bioremediation Approaches for Environmental Management. In: *Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety*. Springer Singapore, pp 1–18
69. da Silva IF, Freitas-Lima LC, Graceli JB, Rodrigues LC de M (2018) Organotins in Neuronal Damage, Brain Function, and Behavior: A Short Review. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8:.. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2017.00366>
70. Vargas R, Ponce-Canchihuamán J (2017) Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. *Toxicol reports* 4:467–473. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2017.08.002>
71. Salvi A, Liu H, Salim S (2019) Involvement of oxidative stress and mitochondrial mechanisms in air pollution-related neurobiological impairments. *Neurobiol*

- Stress 12: <https://doi.org/10.1016/J.YNSTR.2019.100205>
72. Wolfe M, McDonald N, Arunachalam S, Valencia A (2017) Air Pollution Exposure during School Commutes. *J Transp Heal* 5:S48–S49. <https://doi.org/10.1016/J.JTH.2017.05.339>
 73. Solís V, Quijano M (2014) Rehabilitación neuropsicológica en un caso de TDAH con predominio impulsivo. *Rev Chil Neuropsicol* 9:67–71. <https://doi.org/10.5839/rcnp.2014.0902E.05>
 74. Goldberg E (2001) *The executive brain: Frontal lobes and the civilized mind*. Oxford University Press, New York, NY, US
 75. Luria AR (1983) *Las funciones psíquicas superiores y su organización cerebral*. Fontanella, Barcelona
 76. Martín-Lobo P (2015) *Procesos y programas de neuropsicología educativa*. MINISTERIO DE EDUCACIÓN, CULTURA Y DEPORTE, Madrid
 77. Rodríguez VAA (2021) Funciones ejecutivas: una revisión de su fundamentación teórica. *Poiésis* 39–51. <https://doi.org/10.21501/16920945.4051>
 78. Centro de Neurorehabilitación Integral (CENERI) (2019) *Ganglios Basales y procesamiento lingüístico*
 79. Ospina-García N, Pérez-Lohman C, Vargas-Jaramillo JD, Cervantes-Arriaga A, Rodríguez-Violante M (2018) Ganglios Basales y Conducta. *Rev Mex Neurocienc* 18:74–86
 80. Sabater-Gárriz, Álvaro Martínez-Bueso P (2024) *Guía anatómica de los ganglios basales: material docente para profesionales de la salud y estudiantes de ciencias de la salud*
 81. Block ML, Calderón-Garcidueñas L (2009) Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci* 32:506–516. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2009.05.009>
 82. Cannon JR, Greenamyre JT (2011) The role of environmental exposures in neurodegeneration and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* 124:225–250. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFR239>
 83. Sekirov I, Russell SL, Caetano M Antunes L, Finlay BB (2010) Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90:859–904. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00045.2009>

84. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN (2015) Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21:8836–8847. <https://doi.org/10.3748/WJG.V21.I29.8787>
85. Miller I (2018) The gut-brain axis: historical reflections. *Microb Ecol Health Dis* 29:1542921. <https://doi.org/10.1080/16512235.2018.1542921>
86. Bustos-Fernández LM, Hanna-Jairala I (2022) Eje cerebro intestino microbiota. Importancia en la práctica clínica. *Rev Gastroenterol del Perú* 42:106–116. <https://doi.org/10.47892/RGP.2022.422.1438>
87. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A (2015) Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest* 125:926–938. <https://doi.org/10.1172/JCI76304>
88. Gómez-Eguílaz M, Ramón-Trapero JL, Pérez-Martínez L, Blanco JR (2019) The microbiota-gut-brain axis and its great projections. *Rev Neurol* 68:111–117. <https://doi.org/10.33588/rn.6803.2018223>
89. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C (2015) The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol* 28:203
90. Alcock J, Maley CC, Aktipis CA (2014) Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms. *Bioessays* 36:940. <https://doi.org/10.1002/BIES.201400071>
91. Stilling RM, Bordenstein SR, Dinan TG, Cryan JF (2014) Friends with social benefits: host-microbe interactions as a driver of brain evolution and development? *Front Cell Infect Microbiol* 4:. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2014.00147>
92. Dinan TG, Cryan JF (2017) The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am* 46:77–89. <https://doi.org/10.1016/J.GTC.2016.09.007>
93. Holzer P, Farzi A (2014) Neuropeptides and the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Adv Exp Med Biol* 817:195–219. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_9
94. Neufeld K-AM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA (2011) Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun Integr Biol* 4:492. <https://doi.org/10.4161/CIB.4.4.15702>
95. Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, Deng Y, Blennerhassett P, MacRi J, McCoy KD, Verdu EF, Collins SM (2011) The intestinal microbiota affect

- central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141:.. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.04.052>
96. Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, Guyonnet D, Legrain-Raspaud S, Trotin B, Naliboff B, Mayer EA (2013) Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology* 144:.. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.02.043>
97. Callejón-Leblic B, Selma-Royo M, Collado MC, Abril N, García-Barrera T (2021) Impact of Antibiotic-Induced Depletion of Gut Microbiota and Selenium Supplementation on Plasma Selenoproteome and Metal Homeostasis in a Mice Model. *J Agric Food Chem* 69:7652–7662. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C02622/ASSET/IMAGES/LARGE/JF1C02622_0006.JPEG
98. Callejón-Leblic B, Selma-Royo M, Collado MC, Gómez-Ariza JL, Abril N, García-Barrera T (2022) Untargeted Gut Metabolomics to Delve the Interplay between Selenium Supplementation and Gut Microbiota. *J Proteome Res* 21:758–767. https://doi.org/10.1021/ACS.JPROTEOME.1C00411/ASSET/IMAGES/LARGE/PR1C00411_0004.JPEG
99. Ramírez-Acosta S, Huertas-Abril P V., Selma-Royo M, Prieto-Álamo MJ, Collado MC, Abril N, García-Barrera T (2023) The role of selenium in shaping mice brain metabolome and selenoproteome through the gut-brain axis by combining metabolomics, metallomics, gene expression, and amplicon sequencing. *J Nutr Biochem* 117:109323. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2023.109323>
100. Ramírez-Acosta S, Selma-Royo M, Collado MC, Navarro-Roldán F, Abril N, García-Barrera T (2022) Selenium supplementation influences mice testicular selenoproteins driven by gut microbiota. *Sci Reports* 2022 12:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08121-3>
101. Arias-Borrego A, Selma-Royo M, Collado MC, Abril N, García-Barrera T (2022) Impact of “chemical cocktails” exposure in shaping mice gut microbiota and the role of selenium supplementation combining metallomics, metabolomics, and metataxonomics. *J Hazard Mater* 438:129444. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2022.129444>
102. Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ (2014) Brain-gut microbiome interactions and

- functional bowel disorders. *Gastroenterology* 146:1500–1512.
<https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2014.02.037>
103. Gacias M, Gaspari S, Santos PMG, Tamburini S, Andrade M, Zhang F, Shen N, Tolstikov V, Kiebish MA, Dupree JL, Zachariou V, Clemente JC, Casaccia P (2016) Microbiota-driven transcriptional changes in prefrontal cortex override genetic differences in social behavior. *Elife* 5:. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.13442>
 104. Kesika P, Suganthy N, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C (2021) Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer’s disease. *Life Sci* 264:118627. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2020.118627>
 105. Balaguer-Trias J, Deepika D, Schuhmacher M, Kumar V (2022) Impact of Contaminants on Microbiota: Linking the Gut–Brain Axis with Neurotoxicity. *Int J Environ Res Public Heal* 2022, Vol 19, Page 1368 19:1368. <https://doi.org/10.3390/IJERPH19031368>
 106. Ashonibare VJ, Akorede BA, Ashonibare PJ, Akhigbe TM, Akhigbe RE (2024) Gut microbiota-gonadal axis: the impact of gut microbiota on reproductive functions. *Front Immunol* 15:1346035. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2024.1346035/BIBTEX>
 107. Al-Asmakh M, Stukenborg JB, Reda A, Anuar F, Strand ML, Hedin L, Pettersson S, Söder O (2014) The gut microbiota and developmental programming of the testis in mice. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0103809>
 108. Griswold MD (1995) Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* 52:211–216. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD52.2.211>
 109. Markle JGM, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, Von Bergen M, McCoy KD, Macpherson AJ, Danska JS (2013) Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 339:1084–1088. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1233521>
 110. Ding N, Zhang X, Zhang X Di, Jing J, Liu SS, Mu YP, Peng LL, Yan YJ, Xiao GM, Bi XY, Chen H, Li FH, Yao B, Zhao AZ (2020) Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. *Gut* 69:1608–1619. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2019-319127>
 111. Valcarce DG, Genovés S, Riesco MF, Martorell P, Herráez MP, Ramón D, Robles V (2017) Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic

- human donors. *Benef Microbes* 8:193–206.
<https://doi.org/10.3920/BM2016.0122>
112. Cai H, Cao X, Qin D, Liu Y, Liu Y, Hua J, Peng S (2022) Gut microbiota supports male reproduction via nutrition, immunity, and signaling. *Front Microbiol* 13:977574.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.977574/BIBTEX>
 113. Organización Mundial de la Salud. [OMS] (2023) Demencia.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
 114. Sánchez-Mejías E (2015) Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la Enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos. Universidad de Malaga [UMA]
 115. Carvalho VC de J, Fonseca CSM de (2021) A bioquímica do Alzheimer. *Rev Multidiscip em Saúde* 2:20. <https://doi.org/10.51161/remis/664>
 116. Regalado-Reyes M (2021) Estudio de la hiperfosforilación de la proteína tau y su efecto sobre la morfología neuronal en el hámster sirio durante la hibernación. Universidad Autónoma de Madrid (UAM)
 117. Pedrosa M (2015) Bioquímica del Alzheimer Aproximaciones terapéuticas. Universidad Complutense de Madrid
 118. Campos RM (2023) Novas abordagens para detecção e caracterização bioquímica dos principais biomarcadores da doença de Alzheimer. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
 119. Janeiro MH, Ardanaz CG, Sola-Sevilla N, Dong J, Cortés-Erice M, Solas M, Puerta E, Ramírez MJ (2021) Biomarcadores en la enfermedad de Alzheimer. *Adv Lab Med* 2:39–50. https://doi.org/10.1515/ALMED-2020-0109/ASSET/GRAPHIC/J_ALMED-2020-0109_FIG_002.JPG
 120. Angelucci F, Cechova K, Amlerova J, Hort J (2019) Antibiotics, gut microbiota, and Alzheimer’s disease. *J Neuroinflammation* 2019 161 16:1–10.
<https://doi.org/10.1186/S12974-019-1494-4>
 121. Davies P, Maloney AJF (1976) Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer’s disease. *Lancet* (London, England) 2:1403.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)91936-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)91936-X)
 122. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverría I, Monge-Bonilla C (2017) Molecular Pathogenesis of Alzheimer’s Disease: An Update. *Ann Neurosci* 24:46–54.

- <https://doi.org/10.1159/000464422>
123. Tang X, Miller MI, Younes L (2017) Biomarker change-point estimation with right censoring in longitudinal studies. *Ann Appl Stat* 11:1738–1762. <https://doi.org/10.1214/17-AOAS1056>
 124. H. Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F (2016) Alzheimer’s disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol* 14:101–115. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150716165726>
 125. Deardorff WJ, Feen E, Grossberg GT (2015) The Use of Cholinesterase Inhibitors Across All Stages of Alzheimer’s Disease. *Drugs Aging* 32:537–547. <https://doi.org/10.1007/S40266-015-0273-X>
 126. Hardy J, Allsop D (1991) Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer’s disease. *Trends Pharmacol Sci* 12:383–388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
 127. Liu PP, Xie Y, Meng XY, Kang JS (2019) History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer’s disease. *Signal Transduct Target Ther* 4:1–22. <https://doi.org/10.1038/S41392-019-0071-8>
 128. Angelova PR, Abramov AY (2018) Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett* 592:692–702. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>
 129. Karran E, De Strooper B (2016) The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem* 139 Suppl 2:237–252. <https://doi.org/10.1111/JNC.13632>
 130. Bacchella C, Gentili S, Bellotti D, Quartieri E, Draghi S, Baratto MC, Remelli M, Valensin D, Monzani E, Nicolis S, Casella L, Tegoni M, Dell’Acqua S (2020) Binding and Reactivity of Copper to R1 and R3 Fragments of tau Protein. *Inorg Chem* 59:274–286. https://doi.org/10.1021/ACS.INORGCHEM.9B02266/SUPPL_FILE/IC9B02266_SI_001.PDF
 131. Congdon EE, Sigurdsson EM (2018) Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 14:399–415. <https://doi.org/10.1038/S41582-018-0013-Z>
 132. Lučiūnaitė A, McManus RM, Jankunec M, Rácz I, Dansokho C, Dalgėdienė I, Schwartz S, Brosseron F, Heneka MT (2020) Soluble A β oligomers and protofibrils

- induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J Neurochem* 155:650–661.
<https://doi.org/10.1111/JNC.14945>
133. Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, Cesari M, Nourhashemi F (2013) Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc* 14:877–882.
<https://doi.org/10.1016/J.JAMDA.2013.05.009>
 134. Sy M, Kitazawa M, Medeiros R, Whitman L, Cheng D, Lane TE, LaFerla FM (2011) Inflammation induced by infection potentiates tau pathological features in transgenic mice. *Am J Pathol* 178:2811–2822.
<https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2011.02.012/ATTACHMENT/A346E451-2548-4CE2-9645-B3CE707A7981/MMC6.PDF>
 135. Nasrabady SE, Rizvi B, Goldman JE, Brickman AM (2018) White matter changes in Alzheimer’s disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathol Commun* 6:22. <https://doi.org/10.1186/S40478-018-0515-3/FIGURES/3>
 136. Chen X, Firulyova M, Manis M, Herz J, Smirnov I, Aladyeva E, Wang C, Bao X, Finn MB, Hu H, Shchukina I, Kim MW, Yuede CM, Kipnis J, Artyomov MN, Ulrich JD, Holtzman DM (2023) Microglia-mediated T cell infiltration drives neurodegeneration in tauopathy. *Nature* 615:668–677.
<https://doi.org/10.1038/S41586-023-05788-0>
 137. López-Álvarez J, Agüera-Ortiz LF (2015) Evolución histórica Nuevos criterios diagnósticos de la demencia y la enfermedad de Alzheimer: una visión desde la psicogeriatría. *Psicogeriatría* 5:3–14
 138. Duyckaerts C, Lowe J, Frosch M (2018) Escourolle and Poirier’s Manual of Basic Neuropathology. In: Gray F, Duyckaerts C, Girolami U De (eds) Escourolle & Poirier’s Manual of Basic Neuropathology, 5th ed. Oxford University Press, pp 173–204
 139. Arriagada B. P (2016) Neuropatología de las demencias neurodegenerativas. *Rev Médica Clínica Las Condes* 27:297–308.
<https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2016.06.004>
 140. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, Holtzman DM, Jagust W, Jessen F, Karlawish J, Liu E, Molinuevo JL, Montine T, Phelps C, Rankin KP, Rowe CC, Scheltens P, Siemers E, Snyder HM, Sperling R, Elliott C,

- Masliah E, Ryan L, Silverberg N (2018) NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement* 14:535–562. <https://doi.org/10.1016/J.JALZ.2018.02.018>
141. Perneczky R, Kurz A (2012) Dealing with uncertainty: biomarkers for the early detection of Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatrics* 24:1533–1535. <https://doi.org/10.1017/S1041610212001056>
 142. Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Cummings JL, DeKosky ST, Barberger-Gateau P, Delacourte A, Frisoni G, Fox NC, Galasko D, Gauthier S, Hampel H, Jicha GA, Meguro K, O'Brien J, Pasquier F, Robert P, Rossor M, Salloway S, Sarazin M, de Souza LC, Stern Y, Visser PJ, Scheltens P (2010) Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9:1118–1127. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70223-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70223-4)
 143. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* 112:389–404. <https://doi.org/10.1007/S00401-006-0127-Z/FIGURES/5>
 144. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR (1998) Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J Neurol Sci* 158:47–52. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(98\)00092-6/ASSET/C8E510B5-6156-42F0-852F-FA7B521ACFE4/MAIN.ASSETS/GR1.SML](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(98)00092-6/ASSET/C8E510B5-6156-42F0-852F-FA7B521ACFE4/MAIN.ASSETS/GR1.SML)
 145. James SA, Churches QI, De Jonge MD, Birchall IE, Streltsov V, McColl G, Adlard PA, Hare DJ (2017) Iron, Copper, and Zinc Concentration in A β Plaques in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease Correlates with Metal Levels in the Surrounding Neuropil. *ACS Chem Neurosci* 8:629–637. https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.6B00362/SUPPL_FILE/CN6B00362_SI_001.PDF
 146. Kozłowski H, Luczkowski M, Remelli M, Valensin D (2012) Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord Chem Rev* 256:2129–2141. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2012.03.013>
 147. Egaña JT, Zambrano C, Nuñez MT, Gonzalez-Billault C, Maccioni RB (2003) Iron-induced oxidative stress modify tau phosphorylation patterns in hippocampal cell cultures. *BioMetals* 16:215–223.

<https://doi.org/10.1023/A:1020727218493/METRICS>

148. Chen J, Berry MJ (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 86:1–12. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2003.01854.X>
149. Loef M, Schrauzer GN, Walach H (2011) Selenium and Alzheimer's Disease: A Systematic Review. *J Alzheimer's Dis* 26:81–104. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110414>
150. Santos MA, Chand K, Chaves S (2016) Recent progress in multifunctional metal chelators as potential drugs for Alzheimer's disease. *Coord Chem Rev* 327–328:287–303. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2016.04.013>
151. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC (2018) Neuronal cell death. *Physiol Rev* 98:813–880. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00011.2017/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0011828320019.JPEG>
152. Zatta P, Drago D, Bolognin S, Sensi SL (2009) Alzheimer's disease, metal ions and metal homeostatic therapy. *Trends Pharmacol Sci* 30:346–355. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2009.05.002/ASSET/E0515774-EE25-43BD-A62E-7DF42289D1A0/MAIN.ASSETS/GR1B1.SML>
153. Babić Leko M, Langer Horvat L, Španić Popovački E, Zubčić K, Hof PR, Šimić G (2023) Metals in Alzheimer's Disease. *Biomed* 2023, Vol 11, Page 1161 11:1161. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11041161>
154. Zatta P, Lucchini R, Van Rensburg SJ, Taylor A (2003) The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Res Bull* 62:15–28. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(03\)00182-5](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(03)00182-5)
155. Hughes J (2009) Making isotopes matter: Francis Aston and the mass-spectrograph. *Dynamis* 29:131–165. <https://doi.org/10.4321/S0211-95362009000100007>
156. Harris DC (2007) Análisis químico cuantitativo. Reverté, Editorial S.A.
157. Beynon JH, Brown L (2024) Mass spectrometry. In: *Encycl. Br.* <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>
158. Skoog DA (2008) *Principios de análisis instrumental*, 6th ed. Cengage Learning
159. López Galera RM, Pajares García S (2020) *La Espectrometría de Masas*.

- Aplicaciones en el laboratorio clínico. Ed Cont Lab Clin 47:85–97
160. Martín-Blas T, Serrano-Fernández A (2024) Magnetismo. Espectrómetro de masas. In: Univ. Politécnica Madrid. <https://www2.montes.upm.es/dptos/digfa/cfisica/magnet/espectrometro.html>
 161. Lay JO, Holland RD (2000) Rapid Identification of Bacteria Based on Spectral Patterns Using MALDI-TOFMS. *Methods Mol Biol* 146:461–487. <https://doi.org/10.1385/1-59259-045-4:461>
 162. Wilschefski SC, Baxter MR (2019) Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects. *Clin Biochem Rev* 40:115–133. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00024>
 163. Fic E, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Pirog A, Dziedzicka-Wasylewska M (2010) Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* 31:3573–3579. <https://doi.org/10.1002/ELPS.201000197>
 164. Müller E, Berger R, Blass E, Sluyts D, Pfennig A (2008) Liquid–Liquid Extraction. In: Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley, p 60
 165. Kim B, Araujo R, Howard M, Magni R, Liotta LA, Luchini A (2018) Affinity enrichment for mass spectrometry: improving the yield of low abundance biomarkers. *Expert Rev Proteomics* 15:353–366. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1450631>
 166. Finoulst I, Pinkse M, Van Dongen W, Verhaert P (2011) Sample preparation techniques for the untargeted LC-MS-based discovery of peptides in complex biological matrices. *J Biomed Biotechnol* 2011:. <https://doi.org/10.1155/2011/245291>
 167. Guerrasio R, Haberhauer-Troyer C, Steiger M, Sauer M, Mattanovich D, Koellensperger G, Hann S (2013) Measurement uncertainty of isotopologue fractions in fluxomics determined via mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405:5133–5146. <https://doi.org/10.1007/S00216-013-6910-5>
 168. Vilbaste M, Tammekivi E, Leito I (2020) Uncertainty contribution of derivatization in gas chromatography/mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* 34:. <https://doi.org/10.1002/RCM.8704>
 169. Bourgogne E, Wagner M (2015) Sample preparation and bioanalysis in mass

- spectrometry. *Ann Biol Clin (Paris)* 73:11–23.
<https://doi.org/10.1684/ABC.2014.1016>
170. Fothergill WT (1968) Gas chromatography. *Technique. Proc R Soc Med* 61:525.
<https://doi.org/10.1177/003591576806100544>
171. Abonnenc M, Qiao L, Liu BH, Girault HH (2010) Electrochemical aspects of electrospray and laser desorption/ionization for mass spectrometry. *Annu Rev Anal Chem* 3:231–254.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ANCHEM.111808.073740/CITE/REFWORKS>
172. Universidad Santiago de Compostela (USC) APCI (Ionización Química a Presión Atmosférica). <https://www.usc.gal/es/servicios/area/infraestructuras-investigacion/servicios-equipamientos/espectrometria-masas-proteomica/apci-ionizacion-quimica-presion-atmosferica>
173. Montaser A, Golightly DW (1992) *Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, 2nd ed. VCH Publishers, New York
174. Zumdahl S (2005) *Chemical Principles*, 5th ed. Mifflin, Houghton
175. Manning TJ, Grow WR (1997) Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry. *Chem Educ* 2:1–19
176. Urban PL (2016) Quantitative mass spectrometry: an overview. *Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci* 374:. <https://doi.org/10.1098/RSTA.2015.0382>
177. Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) *Espectrometría de masas*
178. Bargalló-Rocha JE, Lara-Medina F, Pérez-Sánchez V, Vázquez-Romo R, Villarreal-Garza C, Martínez-Said H, Shaw-Dulin RJ, Mohar-Betancourt A, Hunt B, Plun-Favreau J, Valentine WJ (2015) Cost-Effectiveness of the 21-Gene Breast Cancer Assay in Mexico. *Adv Ther* 32:239–253. <https://doi.org/10.1007/S12325-015-0190-8/METRICS>
179. Kim SJ, Kim SH, Kim JH, Hwang S, Yoo HJ (2016) Understanding Metabolomics in Biomedical Research. *Endocrinol Metab* 31:7–16.
<https://doi.org/10.3803/ENM.2016.31.1.7>
180. Rodríguez-Moro G, Abril N, Jara-Biedma R, Ramírez-Acosta S, Gómez-Ariza JL, Garcíá-Barrera T (2019) Metabolic Impairments Caused by a ‘chemical Cocktail’ of DDE and Selenium in Mice Using Direct Infusion Triple Quadrupole Time-of-Flight and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chem Res Toxicol* 32:1940–

1954.
https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00102/SUPPL_FILE/TX9B00102_SI_001.PDF
181. Thota S, Rodrigues DA, Crans DC, Barreiro EJ (2018) Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics? *J Med Chem* 61:5805–5821. https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.7B01689/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JM-2017-01689K_0015.GIF
182. Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 5:763–769. <https://doi.org/10.1038/nrm1451>
183. Hyun JY, Liu H, Håkansson K (2007) Infrared Multiphoton Dissociation and Electron-Induced Dissociation as Alternative MS/MS Strategies for Metabolite Identification. *Anal Chem* 79:7858–7866. <https://doi.org/10.1021/AC071139W>
184. Johnson CH, Gonzalez FJ (2012) Challenges and opportunities of metabolomics. *J Cell Physiol* 227:2975–2981. <https://doi.org/10.1002/JCP.24002>
185. Johnson CH, Patterson AD, Idle JR, Gonzalez FJ (2012) Xenobiotic metabolomics: Major impact on the metabolome. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52:37–56. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010611-134748/CITE/REFWORKS>
186. Wilson ID, Nicholson JK (2009) The Role of Gut Microbiota in Drug Response. *Curr Pharm Des* 15:1519–1523. <https://doi.org/10.2174/138161209788168173>
187. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, Venkatesh M, Jobin C, Yeh LA, Mani S, Redinbo MR (2010) Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* (80-) 330:831–835. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1191175/SUPPL_FILE/WALLACE.SOM.PDF
188. Gingell R, Bridges JW, Williams RT (1971) The Role of the Gut Flora in the Metabolism of Prontosil and Neoprontosil in the Rat. *Xenobiotica* 1:143–156. <https://doi.org/10.3109/00498257109044386>
189. Sweeny DJ, Li W, Clough J, Bhamidipati S, Singh R, Park G, Baluom M, Grossbard E, Lau DTW (2010) Metabolism of Fostamatinib, the Oral Methylene Phosphate Prodrug of the Spleen Tyrosine Kinase Inhibitor R406 in Humans: Contribution of Hepatic and Gut Bacterial Processes to the Overall Biotransformation. *Drug*

- Metab Dispos 38:1166–1176. <https://doi.org/10.1124/DMD.110.032151>
190. Mikov M, Caldwell J, Dolphin CT, Smith RL (1988) The role of intestinal microflora in the formation of the methylthio adduct metabolites of paracetamol: Studies in neomycin-pretreated and germ-free mice. *Biochem Pharmacol* 37:1445–1449. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90005-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90005-6)
 191. Callejon-Leblic B (2019) Desarrollo de metodologías ómicas para el estudios y detección precoz del cáncer de pulmón. Universidad de Huelva
 192. Lahner B, Gong J, Mahmoudian M, Smith EL, Abid KB, Rogers EE, Guerinot ML, Harper JF, Ward JM, McIntyre L, Schroeder JI, Salt DE (2003) Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 2003 2110 21:1215–1221. <https://doi.org/10.1038/nbt865>
 193. Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Metallomics: the concept and methodology. *Chem Soc Rev* 38:1119–1138. <https://doi.org/10.1039/B713633C>
 194. del Campo-Moreno R, Alarcón-Cavero T, D’Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martínez M (2018) Microbiota and Human Health: Characterization techniques and transference. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)* 36:241–245. <https://doi.org/10.1016/J.EIMCE.2018.02.016>
 195. D’Amore R, Ijaz UZ, Schirmer M, Kenny JG, Gregory R, Darby AC, Shakya M, Podar M, Quince C, Hall N (2016) A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics* 17:1–20. <https://doi.org/10.1186/S12864-015-2194-9/TABLES/9>
 196. Fekadu S, Alemayehu E, Dewil R, Van der Bruggen B (2019) Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Sci Total Environ* 654:324–337. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.11.072>
 197. González-Gaya B, García-Bueno N, Buelow E, Marin A, Rico A (2022) Effects of aquaculture waste feeds and antibiotics on marine benthic ecosystems in the Mediterranean Sea. *Sci Total Environ* 806:151190. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.151190>
 198. Huygens J, Rasschaert G, Heyndrickx M, Dewulf J, Van Coillie E, Quataert P, Daeseleire E, Becue I (2022) Impact of fertilization with pig or calf slurry on antibiotic residues and resistance genes in the soil. *Sci Total Environ* 822:153518.

- <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.153518>
199. D'Amato A, Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Man AL, Le Gall G, Branca JIV, Ghelardini C, Amedei A, Bertelli E, Regoli M, Pacini A, Luciani G, Gallina P, Altera A, Narbad A, Gulisano M, Hoyles L, Vauzour D, Nicoletti C (2020) Faecal microbiota transplant from aged donor mice affects spatial learning and memory via modulating hippocampal synaptic plasticity- And neurotransmission-related proteins in young recipients. *Microbiome* 8:1–19. <https://doi.org/10.1186/S40168-020-00914-W/FIGURES/10>
 200. Zarrinpar A, Chaix A, Xu ZZ, Chang MW, Marotz CA, Saghatelian A, Knight R, Panda S (2018) Antibiotic-induced microbiome depletion alters metabolic homeostasis by affecting gut signaling and colonic metabolism. *Nat Commun* 2018 9:1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05336-9>
 201. R Core Team (2020) R: A Language and Environment for Statistical Computing
 202. Iqbal A, Ahmed M, Ahmad S, Sahoo CR, Iqbal MK, Haque SE (2020) Environmental neurotoxic pollutants: review. *Environ Sci Pollut Res* 27:41175–41198. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-10539-Z/METRICS>
 203. Glaser V, Leipnitz G, Stralioetto MR, Oliveira J, dos Santos VV, Wannmacher CMD, de Bem AF, Rocha JBT, Farina M, Latini A (2010) Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology* 31:454–460. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2010.05.012>
 204. Clarkson TW, Magos L (2006) The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Crit Rev Toxicol* 36:609–662. <https://doi.org/10.1080/10408440600845619>
 205. Garza-Lombó C, Pappa A, Panayiotidis MI, Gonsebatt ME, Franco R (2019) Arsenic-induced neurotoxicity: a mechanistic appraisal. *JBIC J Biol Inorg Chem* 2019 24:1305–1316. <https://doi.org/10.1007/S00775-019-01740-8>
 206. Grau-Perez M, Navas-Acien A, Galan-Chilet I, Briongos-Figuero LS, Morchon-Simon D, Bermudez JD, Crainiceanu CM, de Marco G, Rentero-Garrido P, Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL, Casasnovas JA, Martin-Escudero JC, Redon J, Chaves FJ, Tellez-Plaza M (2018) Arsenic exposure, diabetes-related genes and diabetes prevalence in a general population from Spain. *Environ Pollut* 235:948–955. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.01.008>

207. Branca JJV, Morucci G, Pacini A (2018) Cadmium-induced neurotoxicity: Still much ado. *Neural Regen Res* 13:1879–1882. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.239434>
208. Birken DL, Oldendorf WH (1989) N-Acetyl-L-Aspartic acid: A literature review of a compound prominent in ¹H-NMR spectroscopic studies of brain. *Neurosci Biobehav Rev* 13:23–31. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(89\)80048-X](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(89)80048-X)
209. Mencarelli C, Martinez-Martinez P (2013) Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell Mol Life Sci C* 70:181. <https://doi.org/10.1007/S00018-012-1038-X>
210. Pruetz ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, Liotta DC, Merrill AH (2008) Biodiversity of sphingoid bases ('sphingosines') and related amino alcohols. *J Lipid Res* 49:1621–1639. <https://doi.org/10.1194/JLR.R800012-JLR200>
211. Bischoff A, Czyborra P, Meyer Zu Heringdorf D, Jakobs KH, Michel MC (2000) Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br J Pharmacol* 130:1878–1883. <https://doi.org/10.1038/SJ.BJP.0703516>
212. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T (2000) Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids* 106:1–29. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(00\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(00)00128-6)
213. Yin C li, Lu R gang, Zhu J fang, Huang H min, Liu X, Li Q feng, Mo Y yi, Zhu H jia, Chin B, Wu J xia, Liu X wen, Cheng B, Ruan J xiang, Liang Y hong, Song H, Guo H wei, Su Z heng, Zheng H (2019) The study of neuroprotective effect of ferulic acid based on cell metabolomics. *Eur J Pharmacol* 864:172694. <https://doi.org/10.1016/J.EJP HAR.2019.172694>
214. Chai C, Jin B, Yan Y, Yuan Q, Wen H, Tao W, Cui X, Shan C, Yu S (2021) Anti-depressant effect of Zhi-zi-chi decoction on CUMS mice and elucidation of its signaling pathway. *J Ethnopharmacol* 266:113283. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113283>
215. Ji F, Luan H, Huang Y, Cai Z, Li M (2017) MS-Based Metabolomics for the Investigation of Neuro-Metabolic Changes Associated with BDE-47 Exposure in

- C57BL/6 Mice. *J Anal Test* 1:233–244. <https://doi.org/10.1007/S41664-017-0026-4>
216. Dai H, Xia YY, Ting-Li Han TLH, Philip N Baker PNB, Tang X, Zhang RY, Du H, Cai TJ, Cheng SQ (2016) Effect of chronic arsenic exposure on mouse brain tissue and serum metabolomics. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 36:1192–1197
217. Sun D, Yang N, Zhang Q, Wang Z, Luo G, Pang J (2021) The discovery of combined toxicity effects and mechanisms of hexaconazole and arsenic to mice based on untargeted metabolomics. *Ecotoxicol Environ Saf* 226:112859. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112859>
218. Fu Y, Si Z, Li P, Li M, Zhao H, Jiang L, Xing Y, Hong W, Ruan L, Wang JS (2017) Acute psychoactive and toxic effects of D. metel on mice explained by 1H NMR based metabolomics approach. *Metab Brain Dis* 32:1295–1309. <https://doi.org/10.1007/S11011-017-0038-9/METRICS>
219. Hu ZP, Browne ER, Liu T, Angel TE, Ho PC, Chan ECY (2012) Metabonomic profiling of TASTPM transgenic Alzheimer’s disease mouse model. *J Proteome Res* 11:5903–5913. <https://doi.org/10.1021/PR300666P>
220. Xu J, Xu H ming, Peng Y, Zhao C, Zhao H lan, Huang W, Huang H li, He J, Du Y lei, Zhou Y jian, Zhou Y lian, Nie Y qiang (2021) The effect of different combinations of antibiotic cocktails on mice and selection of animal models for further microbiota research. *Appl Microbiol Biotechnol* 105:1669–1681. <https://doi.org/10.1007/S00253-021-11131-2/METRICS>
221. Stadlbauer V, Engertsberger L, Komarova I, Feldbacher N, Leber B, Pichler G, Fink N, Scarpatetti M, Schippinger W, Schmidt R, Horvath A (2020) Dysbiosis, gut barrier dysfunction and inflammation in dementia: A pilot study. *BMC Geriatr* 20:1–13. <https://doi.org/10.1186/S12877-020-01644-2/FIGURES/5>
222. Di Lodovico L, Mondot S, Doré J, Mack I, Hanachi M, Gorwood P (2021) Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 106:110114. <https://doi.org/10.1016/J.PNPBP.2020.110114>
223. Ye X, Wang D, Zhu H, Wang D, Li J, Tang Y, Wu J (2021) Gut Microbiota Changes in Patients With Major Depressive Disorder Treated With Vortioxetine. *Front Psychiatry* 12:641491. <https://doi.org/10.3389/FPSYT.2021.641491/BIBTEX>

224. Glade MJ, Smith K (2015) Phosphatidylserine and the human brain. *Nutrition* 31:781–786. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2014.10.014>
225. Showing Compound PS(20:4(5Z,8Z,11Z,14Z)/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) (FDB029055) - FoodB. <https://foodb.ca/compounds/FDB029055>. Accessed 10 Oct 2024
226. Walter A, Korth U, Hilgert M, Hartmann J, Weichel O, Hilgert M, Fassbender K, Schmitt A, Klein J (2004) Glycerophosphocholine is elevated in cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. *Neurobiol Aging* 25:1299–1303. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.016>
227. Yoshimura T, Itoh S, Tsujikawa K, Yamada E, Ishii T, Iemura O, Kameda Y, Mimura T, Kohama Y (1998) Effect of 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1,25-Dihydroxyvitamin D₃ on the Expression of Vitamin-D-Responsive Genes in Vitamin-D-Deficient Mice. *Pharmacology* 57:286–294. <https://doi.org/10.1159/000028254>
228. Anjum I, Jaffery SS, Fayyaz M, Samoo Z, Anjum S, Anjum I, Jaffery SS, Fayyaz M, Samoo Z, Anjum S (2018) The Role of Vitamin D in Brain Health: A Mini Literature Review. *Cureus* 10:. <https://doi.org/10.7759/CUREUS.2960>
229. Gao Y, Mruk DD, Cheng CY (2015) Sertoli cells are the target of environmental toxicants in the testis – a mechanistic and therapeutic insight. *Expert Opin Ther Targets* 19:1073–1090. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1039513>
230. García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gailer J, Gómez-Ariza JL (2014) Use of elemental and molecular-mass spectrometry to assess the toxicological effects of inorganic mercury in the mouse *Mus musculus*. *Anal Bioanal Chem* 406:5853–5865. <https://doi.org/10.1007/S00216-014-8010-6/METRICS>
231. Wu S, Zhong G, Wan F, Jiang X, Tang Z, Hu T, Rao G, Lan J, Hussain R, Tang L, Zhang H, Huang R, Hu L (2021) Evaluation of toxic effects induced by arsenic trioxide or/and antimony on autophagy and apoptosis in testis of adult mice. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:54647–54660. <https://doi.org/10.1007/S11356-021-14486-1>
232. García-Sevillano MA, García-Barrera T, Navarro F, Gómez-Ariza JL (2013) Analysis of the biological response of mouse liver (*Mus musculus*) exposed to As₂O₃ based on integrated -omics approaches. *Metallomics* 5:1644–1655. <https://doi.org/10.1039/C3MT00186E>

233. da Silva RF, Borges C dos S, Lamas C de A, Cagnon VHA, Kempinas W de G (2017) Arsenic trioxide exposure impairs testicular morphology in adult male mice and consequent fetus viability. *J Toxicol Environ Health A* 80:1166–1179. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1376405>
234. Minutoli L, Micali A, Pisani A, Puzzolo D, Bitto A, Rinaldi M, Pizzino G, Irrera N, Galfo F, Arena S, Pallio G, Mecchio A, Germanà A, Bruschetta D, Laurà R, Magno C, Marini H, Squadrito F, Altavilla D (2015) Retracted: Research Article Flavocoxid Protects Against Cadmium-Induced Disruption of the Blood-Testis Barrier and Improves Testicular Damage and Germ Cell Impairment in Mice. *Toxicol Sci* 148:311–329. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFV185>
235. García-Barrera T, Gómez-Ariza JL, González-Fernández M, Moreno F, García-Sevillano MA, Gómez-Jacinto V (2012) Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal Bioanal Chem* 403:2237–2253. <https://doi.org/10.1007/S00216-012-5776-2/METRICS>
236. García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, González-Fernández M, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2013) Metal interactions in mice under environmental stress. *BioMetals* 26:651–666. <https://doi.org/10.1007/S10534-013-9642-2/METRICS>
237. García-Sevillano MA, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL (2014) Application of metallomic and metabolomic approaches in exposure experiments on laboratory mice for environmental metal toxicity assessment. *Metallomics* 6:237–248. <https://doi.org/10.1039/C3MT00302G>
238. García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Navarro-Roldán F, Montero-Lobato Z, Gómez-Ariza JL (2014) A combination of metallomics and metabolomics studies to evaluate the effects of metal interactions in mammals. Application to *Mus musculus* mice under arsenic/cadmium exposure. *J Proteomics* 104:66–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2014.02.011>
239. Gómez-Jacinto V, García-Barrera T, Garbayo I, Vílchez C, Gómez-Ariza JL (2012) Metallomic study of selenium biomolecules metabolized by the microalgae *Chlorella sorokiniana* in the biotechnological production of functional foods enriched in selenium. *Pure Appl Chem* 84:269–280. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-11-09-18>
240. Cai X, Wang C, Yu W, Fan W, Wang S, Shen N, Wu P, Li X, Wang F (2016) Selenium

- Exposure and Cancer Risk: an Updated Meta-analysis and Meta-regression. *Sci Reports* 2016 6:1–18. <https://doi.org/10.1038/srep19213>
241. Rayman MP (2005) Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 64:527–542. <https://doi.org/10.1079/PNS2005467>
242. Vermeulen A (1976) Testosterone and 5 α -Androstan-17 β -OL-3-One (DHT) Levels in Man. *Acta Endocrinol (Copenh)* 83:651–664. <https://doi.org/10.1530/ACTA.0.0830651>
243. Abdelnour SA, Al-Gabri NA, Hashem NM, Gonzalez-Bulnes A (2021) Supplementation with Proline Improves Haemato-Biochemical and Reproductive Indicators in Male Rabbits Affected by Environmental Heat-Stress. *Anim* 2021, Vol 11, Page 373 11:373. <https://doi.org/10.3390/ANI11020373>
244. Battista N, Rapino C, Di Tommaso M, Bari M, Pasquariello N, Maccarrone M (2008) Regulation of male fertility by the endocannabinoid system. *Mol Cell Endocrinol* 286:S17–S23. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2008.01.010>
245. SANYAL S, DEB C, PATRA PB, BISWAS NM (1979) In vitro Studies on Histochemical Localization of Testicular $\delta 5$ -3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity from Indomethacin Pretreated Rats — Effect of Prostaglandins and Luteinizing Hormone. *Andrologia* 11:157–162. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0272.1979.TB02180.X>
246. Riese U, Ziegler E, Hamburger M (2004) Militarionone A induces differentiation in PC12 cells via MAP and Akt kinase signal transduction pathways. *FEBS Lett* 577:455–459. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2004.10.045>
247. Sreng L, Temime-Roussel B, Wortham H, Mourre C (2017) Chemical Identification of “Maternal Signature Odors” in Rat. *Chem Senses* 42:211–222. <https://doi.org/10.1093/CHEMSE/BJW124>
248. Sèdes L, Martinot E, Baptissart M, Baron S, Caira F, Beaudoin C, Volle DH (2017) Bile acids and male fertility: From mouse to human? *Mol Aspects Med* 56:101–109. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2017.05.004>
249. Crisóstomo L, Alves MG, Calamita G, Sousa M, Oliveira PF (2017) Glycerol and testicular activity: the good, the bad and the ugly. *Mol Hum Reprod* 23:725–737. <https://doi.org/10.1093/MOLEHR/GAX049>

250. Wei Z, Xi J, Gao S, You X, Li N, Cao Y, Wang L, Luan Y, Dong X (2018) Metabolomics coupled with pathway analysis characterizes metabolic changes in response to BDE-3 induced reproductive toxicity in mice. *Sci Rep* 8:. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-23484-2>
251. Wang M, Ren C, Wang P, Cheng X, Chen Y, Huang Y, Chen J, Sun Z, Wang Q, Zhang Z (2023) Microbiome–Metabolome Reveals the Contribution of the Gut–Testis Axis to Sperm Motility in Sheep (*Ovis aries*). *Animals* 13:996. <https://doi.org/10.3390/ANI13060996/S1>
252. Liu L, Shu A, Zhu Y, Chen Y (2021) Cornuside Alleviates Diabetes Mellitus-Induced Testicular Damage by Modulating the Gut Microbiota. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2021:5301942. <https://doi.org/10.1155/2021/5301942>
253. Azam R, Ghafouri-Fard S, Tabrizi M, Modarressi MH, Ebrahimzadeh-Vesal R, Daneshvar M, Mobasheri MB, Motevaseli E (2014) *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus crispatus* Culture Supernatants Downregulate Expression of Cancer-testis Genes in the MDA-MB-231 Cell Line. *Asian Pacific J Cancer Prev* 15:4255–4259. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.10.4255>
254. Molina NM, Plaza-Díaz J, Vilchez-Vargas R, Sola-Leyva A, Vargas E, Mendoza-Tesarik R, Galán-Lázaro M, Mendoza-Ladrón de Guevara N, Tesarik J, Altmäe S (2021) Assessing the testicular sperm microbiome: a low-biomass site with abundant contamination. *Reprod Biomed Online* 43:523–531. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.06.021>
255. Rodríguez-Moro G, Roldán FN, Baya-Arenas R, Arias-Borrego A, Callejón-Leblic B, Gómez-Ariza JL, García-Barrera T (2020) Metabolic impairments, metal traffic, and dyshomeostasis caused by the antagonistic interaction of cadmium and selenium using organic and inorganic mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res* 27:1762–1775. <https://doi.org/10.1007/S11356-019-06573-1/METRICS>
256. Mattson MR (2007) Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell* 6:337–350. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2007.00275.X>
257. Gromadzka G, Tarnacka B, Flaga A, Adamczyk A (2020) Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases—Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci* 2020, Vol 21, Page 9259 21:9259. <https://doi.org/10.3390/IJMS21239259>
258. Liu G, Huang W, Moir RD, Vanderburg CR, Lai B, Peng Z, Tanzi RE, Rogers JT, Huang

- X (2006) Metal exposure and Alzheimer's pathogenesis. *J Struct Biol* 155:45–51.
<https://doi.org/10.1016/J.JSB.2005.12.011>
259. Sastre M, Ritchie CW, Hajji N (2015) Metal Ions in Alzheimer's Disease Brain. *JSM Alzheimer's Dis Relat Dement* 2:1014
260. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM (2011) Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: A quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol* 94:296–306.
<https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2011.05.001>
261. Akatsu H, Hori A, Yamamoto T, Yoshida M, Mimuro M, Hashizume Y, Tooyama I, Yezdimer EM (2012) Transition metal abnormalities in progressive dementias. *BioMetals* 25:337–350. <https://doi.org/10.1007/S10534-011-9504-8/METRICS>
262. Szabo ST, Jean Harry G, Hayden KM, Szabo DT, Birnbaum L (2016) Comparison of Metal Levels between Postmortem Brain and Ventricular Fluid in Alzheimer's Disease and Nondemented Elderly Controls. *Toxicol Sci* 150:292–300.
<https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFV325>
263. Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A (2014) Iron levels in the human brain: A post-mortem study of anatomical region differences and age-related changes. *J Trace Elem Med Biol* 28:13–17.
<https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2013.08.001>
264. Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A (2015) Anatomical Regional Differences in Selenium Levels in the Human Brain. *Biol Trace Elem Res* 163:89–96. <https://doi.org/10.1007/S12011-014-0160-Z/METRICS>
265. Squitti R, Ventriglia M, Simonelli I, Bonvicini C, Costa A, Perini G, Binetti G, Benussi L, Ghidoni R, Koch G, Borroni B, Albanese A, Sensi SL, Rongioletti M (2021) Copper imbalance in alzheimer's disease: Meta-analysis of serum, plasma, and brain specimens, and replication study evaluating atp7b gene variants. *Biomolecules* 11:960. <https://doi.org/10.3390/BIOM11070960/S1>
266. Scholefield M, Church SJ, Xu J, Kassab S, Gardiner NJ, Roncaroli F, Hooper NM, Unwin RD, Cooper GJS, Cooper GJS (2020) Evidence that levels of nine essential metals in post-mortem human-Alzheimer's-brain and ex vivo rat-brain tissues are unaffected by differences in post-mortem delay, age, disease staging, and brain

- bank location. *Metalomics* 12:952–962. <https://doi.org/10.1039/D0MT00048E>
267. Loeffler DA, LeWitt PA, Juneau PL, Sima AAF, Nguyen HU, DeMaggio AJ, Brickman CM, Brewer GJ, Dick RD, Troyer MD, Kanaley L (1996) Increased regional brain concentrations of ceruloplasmin in neurodegenerative disorders. *Brain Res* 738:265–274. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00782-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00782-2)
268. Zubčić K, Hof PR, Šimić G, Jazvinščak Jembrek M (2020) The Role of Copper in Tau-Related Pathology in Alzheimer’s Disease. *Front Mol Neurosci* 13:572308. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2020.572308/BIBTEX>
269. De Benedictis CA, Vilella A, Grabrucker A (2019) The role of trace metals in Alzheimer’s disease. In: Wisniewski TM. (ed) *Alzheimer’s disease*. Exon Publications, New York, p 255
270. Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL, Sengupta U, Clos AL, Jackson GR, Kaye R (2011) Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 6:1–14. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-39/FIGURES/7>
271. Corrigan FM, Reynolds GP, Ward NI (1993) Hippocampal tin, aluminum and zinc in Alzheimer’s disease. *Biometals* 6:149–154. <https://doi.org/10.1007/BF00205853/METRICS>
272. András E, Farkas É, Gawlik D, Rösick U, Brätter P (2000) Brain Iron and Zinc Contents of German Patients with Alzheimer Disease. *J Alzheimer’s Dis* 2:17–26. <https://doi.org/10.3233/JAD-2000-2103>
273. de Wilde MC, Vellas B, Girault E, Yavuz AC, Sijben JW (2017) Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer’s disease: Results from meta-analyses. *Alzheimer’s Dement Transl Res Clin Interv* 3:416–431. <https://doi.org/10.1016/J.TRCI.2017.06.002>
274. Correia H, Ramos P, Santos A, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A (2014) A post-mortem study of the anatomical region differences and age-related changes on Ca and Mg levels in the human brain. *Microchem J* 113:69–76. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2013.11.012>
275. András E, Páli N, Molnár Z, Kösel S (2005) Brain aluminum, magnesium and phosphorus contents of control and Alzheimer-diseased patients. *J Alzheimer’s Dis* 7:273–284. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-7402>

276. Xu ZP, Li L, Bao J, Wang ZH, Zeng J, Liu EJ, Li XG, Huang RX, Gao D, Li MZ, Zhang Y, Liu GP, Wang JZ (2014) Magnesium Protects Cognitive Functions and Synaptic Plasticity in Streptozotocin-Induced Sporadic Alzheimer's Model. *PLoS One* 9:e108645. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108645>
277. Kieboom BCT, Licher S, Wolters FJ, Ikram MK, Hoorn EJ, Zietse R, Stricker BH, Ikram MA (2017) Serum magnesium is associated with the risk of dementia. *Neurology* 89:1716–1722. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004517>
278. Ozturk S, Cillier AE (2006) Magnesium supplementation in the treatment of dementia patients. *Med Hypotheses* 67:1223–1225. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2006.04.047>
279. SHORE D, WYATT RJED (1983) Aluminum and Alzheimer's Disease. *J Nerv Ment Dis* 171:
280. Perl DP (1985) Relationship of aluminum to Alzheimer's disease. *Environ Health Perspect* 63:149–153. <https://doi.org/10.1289/EHP.8563149>
281. Crapper McLachlan DR (1986) Aluminum and alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 7:525–532. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(86\)90102-8](https://doi.org/10.1016/0197-4580(86)90102-8)
282. Campbell A (2002) The potential role of aluminium in Alzheimer's disease. *Nephrol Dial Transplant* 17:17–20. https://doi.org/10.1093/NDT/17.SUPPL_2.17
283. Walton JR (2009) Brain lesions comprised of aluminum-rich cells that lack microtubules may be associated with the cognitive deficit of Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 30:1059–1069. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2009.06.010>
284. Cai T, Che H, Yao T, Chen Y, Huang C, Zhang W, Du K, Zhang J, Cao Y, Chen J, Luo W (2011) Manganese Induces Tau Hyperphosphorylation through the Activation of ERK MAPK Pathway in PC12 Cells. *Toxicol Sci* 119:169–177. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFQ308>
285. Rolle-McFarland D, Liu Y, Mostafaei F, Zauber SE, Zhou Y, Li Y, Fan Q, Zheng W, Nie LH, Wells EM (2019) The association of bone, fingernail and blood manganese with cognitive and olfactory function in Chinese workers. *Sci Total Environ* 666:1003–1010. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.02.208>
286. Stedman JD, Spyrou NM (1997) Elemental analysis of the frontal lobe of 'normal' brain tissue and that affected by Alzheimer's disease. *J Radioanal Nucl Chem* 217:163–166. <https://doi.org/10.1007/BF02034435/METRICS>

287. Cutts DA, Maguire RP, Stedman JD, Leenders KL, Spyrou NM (1999) A comparative study in Alzheimer's and normal brains of trace element distribution using PIXE and INA analyses and glucose metabolism by positron emission tomography. *Biol Trace Elem Res* 71–72:541–549. <https://doi.org/10.1007/BF02784242/METRICS>
288. Leite REP, Jacob-Filho W, Saiki M, Grinberg LT, Ferretti REL (2008) Determination of trace elements in human brain tissues using neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem* 278:581–584. <https://doi.org/10.1007/S10967-008-1009-8/METRICS>
289. Solovyev ND (2015) Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *J Inorg Biochem* 153:1–12. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2015.09.003>
290. Pillai R, Uyehara-Lock JH, Bellinger FP (2014) Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 66:229–239. <https://doi.org/10.1002/IUB.1262>
291. Li C, Zhang Y, Liang J, Wu C, Zou X (2022) Assessing the Association Between Lead Pollution and Risk of Alzheimer's Disease by Integrating Multigenomics. *Front Neurosci* 16:880105. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.880105/BIBTEX>
292. del Pino J, Zeballos G, Anadón MJ, Moyano P, Díaz MJ, García JM, Frejo MT (2016) Cadmium-induced cell death of basal forebrain cholinergic neurons mediated by muscarinic M1 receptor blockade, increase in GSK-3 β enzyme, β -amyloid and tau protein levels. *Arch Toxicol* 90:1081–1092. <https://doi.org/10.1007/S00204-015-1540-7/METRICS>
293. Min JY, Min KB (2016) Blood cadmium levels and Alzheimer's disease mortality risk in older US adults. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* 15:1–6. <https://doi.org/10.1186/S12940-016-0155-7/FIGURES/1>
294. Zheng F, Li Y, Zhang F, Sun Y, Zheng C, Luo Z, Wang YL, Aschner M, Zheng H, Lin L, Cai P, Shao W, Guo Z, Zheng M, Zhou XZ, Lu KP, Wu S, Li H (2021) Cobalt induces neurodegenerative damages through Pin1 inactivation in mice and human neuroglioma cells. *J Hazard Mater* 419:126378. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126378>
295. Schroeder HA, Balassa JJ, Tipton IH (1963) Abnormal trace metals in man—Vanadium. *J Chronic Dis* 16:1047–1071. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(63\)90041-9](https://doi.org/10.1016/0021-9681(63)90041-9)

296. Galván-Arzate S, Santamaría A (1998) Thallium toxicity. *Toxicol Lett* 99:1–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00126-X)
297. Mizuno D, Kawahara M, Konoha-Mizuno K, Ogawara T, Hama R, Yamazaki K (2023) Toxic Effects of Two Redox States of Thallium on Immortalised Hypothalamic GT1-7 Neuronal Cells. *Int J Mol Sci* 24:11583. <https://doi.org/10.3390/IJMS241411583/S1>
298. Gerhardsson L, Lundh T, Londos E, Minthon L (2011) Cerebrospinal fluid/plasma quotients of essential and non-essential metals in patients with Alzheimer’s disease. *J Neural Transm* 118:957–962. <https://doi.org/10.1007/S00702-011-0605-X/METRICS>
299. Guan C, Dang R, Cui Y, Liu L, Chen X, Wang X, Zhu J, Li D, Li J, Wang D (2017) Characterization of plasma metal profiles in Alzheimer’s disease using multivariate statistical analysis. *PLoS One* 12:e0178271. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0178271>
300. Alimonti A, Ristori G, Giubilei F, Stazi MA, Pino A, Visconti A, Brescianini S, Monti MS, Forte G, Stanzione P, Bocca B, Bomboi G, D’Ippolito C, Annibali V, Salvetti M, Sancesario G (2007) Serum chemical elements and oxidative status in Alzheimer’s disease, Parkinson disease and multiple sclerosis. *Neurotoxicology* 28:450–456. <https://doi.org/10.1016/J.NEURO.2006.12.001>
301. Paglia G, Miedico O, Cristofano A, Vitale M, Angiolillo A, Chiaravalle AE, Corso G, Di Costanzo A (2016) Distinctive Pattern of Serum Elements During the Progression of Alzheimer’s Disease. *Sci Reports* 2016 6:1–12. <https://doi.org/10.1038/srep22769>
302. Bocca B, Forte G, Petrucci F, Pino A, Marchione F, Bomboi G, Senofonte O, Giubilei F, Alimonti A (2005) Monitoring of chemical elements and oxidative damage in patients affected by Alzheimer’s disease. *Ann Ist Super Sanita* 41:197–203
303. Coelho FC, Cerchiaro G, Araújo SES, Daher JPL, Cardoso SA, Coelho GF, Guimarães AG (2022) Is There a Connection between the Metabolism of Copper, Sulfur, and Molybdenum in Alzheimer’s Disease? New Insights on Disease Etiology. *Int J Mol Sci* 2022, Vol 23, Page 7935 23:7935. <https://doi.org/10.3390/IJMS23147935>
304. Ramos P, Santos A, Pinto E, Pinto NR, Mendes R, Magalhães T, Almeida A (2016) Alkali metals levels in the human brain tissue: Anatomical region differences and

age-related changes. J Trace Elem Med Biol 38:174–182.

<https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2016.03.018>

ANEXOS

Anexo 1

Tabla 3. Metabolitos cerebrales alterados

Masa Experimental (Da)	Masa Teórica (Da)	RT (min)	Compuesto	CC vs C		CC-Se vs C		CC-Se vs CC		Modo	Aducción	Clase	Sub Clase
				p	FC	p	FC	p	FC				
98	98	4.07	Ácido fosfórico	0	1.91	0	2.81	0.001	1.47	GC-MS	-	Ácido anhídrido	Anhídrido de ácido acílico
175	175	7.95	Ácido N-acetil aspártico	0.001	3.21	N.S	1.64	0.017	0.51	GC-MS	-	Aminoácido	Aminoácidos excitatorios
558.1162	558.1162	3.22	Desoxirribicina	0.048	0.55	N.S	1.06	0.001	1.94	ESI-	[M-H]-	Antracenos	Antraquinonas
122	122	7.08	Ácido benzoico	0	71.44	0	65.68	N.S	0.92	GC-MS	-	Benceno y derivados sustitutos	Ácidos benzoicos y derivados
133	133	6.8	Ácido aspártico	0	16.18	0	15.01	N.S	0.93	GC-MS	-	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos
146	146	7.6	Glutamina	0.002	2.7	N.S	1.99	N.S	0.74	GC-MS	-	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos
75	75	5.12	Glicina	0	11.96	0	10.83	N.S	0.91	GC-MS	-	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos
119	119	5.72	Treonina	0	43.73	0	39.98	N.S	0.91	GC-MS	-	Ácidos carboxílicos y derivados	Aminoácidos, péptidos y análogos
621.5983	621.606	14.16	Cer(d16:1/24:0)	0.001	0.46	0	1.24	0.012	2.7	ESI+	[M+H]+	Ceramidas	N-acilfosfoginas
371.2854	371.2824	3.19	Anandamina (22:6, n-3)	0	*	0	*	N.S	1.2	ESI-	[M-H]-	Etanolaminas	N-acilfosfoginas
178.1546	178.18	2.02	Ácido 9-oxo-2,4,5,7-decatetraenoico	N.S	3.06	0	8.47	0.002	2.77	ESI+	[M+H]+	Ácido graso	Ácidos grasos de cadena media
256.2244	256.2402	2.19	Ácido 2,4-dimetil-2E-tetradecenoico	0.002	0.82	N.S	0.74	0.013	0.91	ESI-	[M-H]-	Ácido graso	Ácidos grasos de cadena larga
122.0640	122.0732	1.97	2,4,6-octatrienal	0	*	0	*	N.S	4.02	ESI+	[M+H]+	Acilos grasos	Aldehidos
268.1972	268.2038	1.5	Ácido 3-oxo-2-pentil-ciclopentanohexanoico	N.S	1.89	0.035	2.36	N.S	1.25	ESI+	[M+H]+	Acilos grasos	Octadecanoídes
160.1103	160.1099	0.88	Ácido 3-hidroxi-isoheptanoico	0.047	0.65	0.013	0.24	N.S	0.36	ESI-	[M-H]-	Acilos grasos	Ácidos grasos y conjugados
242.2245	242.2246	2.21	isobutirato de undecilo	0.003	0.21	N.S	0.82	0.001	3.9	ESI-	[M-H]-	Acilos grasos	Ésteres grasos
226.1927	226.1933	1.71	gamma-tetradecalactona	0	0	0	0	N.S	*	ESI-	[M-H]-	Acilos grasos	Ésteres grasos
171.1634	171.1623	1.22	decanamida	N.S	1.34	0.012	4.77	N.S	3.57	ESI+	[M+H]+	Acilos grasos [fa]	Amidas grasas [fa08]
284	284	14.63	ácido octadecanoico / ácido esteárico	0	0.06	0	0.08	N.S	1.26	GC-MS	-	Acilos grasos	Ácidos grasos y conjugados

330	330	13.68	monopalmitina / ácido hexadecanoico	0	0.07	0	0.16	N.S	2.18	GC-MS	-	Glicerolípidos	Monoradiglicerol
257.1038	257.1028	0.86	glicerofosfolina	0.03	0.65	N.S	0.64	N.S	0.98	ESI+	[M+H] ⁺	Glicerofosfolípidos	Glicerofosfolinas
853.5531	853.5622	9.68	PS(20:4/22:6)	N.S	0.25	0.014	0.19	N.S	0.77	ESI-	[M-H] ⁻	Glicerofosfolípidos	Glicerofosfolinas
789.6369	789.6248	1.48	PS(14:0/22:0)	N.S	0.48	0.037	0.51	N.S	1.07	ESI+	[M-H] ⁻	Glicerofosfolípidos	Glicerofosfolinas
675.5190	675.5203	13.36	PE(14:0/p-18:0)	N.S	0.65	0.002	0.02	N.S	0.03	ESI-	[M-H] ⁻	Glicerofosfolípidos	Glicerofosfoetanolaminas
135	134	6.53	ácido málico	N.S0	1	0.003	0.63	0.007	0.64	GC-MS	-	Hidroxiácidos y derivados	Betahidroxiácidos y derivados
586.3198	586.3142	2.09	5-oxoavermectina "2a" aglicona	N.S	2.19	0.001	2.88	N.S	1.31	ESI+	[M+H] ⁺	Macrólidos y análogos	Milbemicinas
621.0677	621.0608	1.22	Ácido UDP-N-acetil-D-galactosaminurónico	0.014	0.94	0.002	0.82	N.S	0.88	ESI-	[M-H] ⁻	Nucleótido-azúcar	Nucleótido-azúcar de pirimidina
514.071	514.0754	7.5	dTDP-4-oxo-2,3,6-tridesoxi-D-glucosa	N.S	0.54	N.S	1.73	0.001	3.22	ESI-	[M-H] ⁻	Nucleótido-azúcar	Nucleótido-azúcar de pirimidina
60	60	4.62	urea	0	14.48	0	12.01	N.S	0.83	GC-MS	-	Ácidos carbónicos orgánicos y derivados	Ureas
842.5041	842.514	7.35	espiramicina 1/formacidina	0	0.16	N.S	0	N.S	0	ESI+	[M+H] ⁺	Compuestos organooxigenados	Carbohidratos y conjugados de carbohidratos
180	180	12.78	mioinositol	0	0.3	0	0.29	N.S	0.96	GC-MS	-	Compuestos organooxigenados	Alcoholes y polioles
793.5464	793.5622	14.45	PC(15:0/22:5)	0.037	0.02	N.S	0.38	N.S	15.99	ESI+	[M+H] ⁺	Fosfolinas	Glicerofosfolina
809.5700	809.5782	6.4	PI-cer(d20:0/16:0)	0.03	*	0	*	N.S	1.96	ESI+	[M+H] ⁺	Fosfingolípidos	Fosfoinositoles de ceramida
837.6012	837.6095	8.45	PI-cer(d20:0/18:0)	0	*	0	*	0.043	1.62	ESI+	[M+H] ⁺	Fosfingolípidos	Fosfoinositoles de ceramida
528.326	528.324	1.96	neolinderatona	0	*	0	*	0.019	1.55	ESI+	[M+H] ⁺	Policétidos	Flavononas
208.1726	208.1827	1.64	6,10-dimetil-9-metilen-undec-5E-en-2-ona	N.S	0.63	N.S	1.32	0.001	2.08	ESI+	[M+H] ⁺	Lípidos prenólicos	Isoprenoides
150.094	150.1045	1.97	sabinona	0	*	0	*	N.S	0.98	ESI+	[M+H] ⁺	Lípidos prenólicos	Monoterpenoides
267	267	14.02	adenosina	0	0.18	0	0.11	N.S	0.58	GC-MS	-	Nucleósidos de purina	
136.0405	136.0385	0.88	alopurinol	N.S	*	0	*	0	4	ESI+	[M+H] ⁺	Pirazolopirimidinas	Pirazolo [3,4-d]pirimidinas
261.0817	261.0801	1.01	flumequina	0	*	0	*	0.025	1.27	ESI+	[M+H] ⁺	Quinolinas y derivados	Ácidos carboxílicos de quinolina
514.0712	514.0549	3.2	nafato de cefamandol	N.S	0.68	N.S	1.33	0.001	1.95	ESI-	-	Entidad molecular del bloque S	Entidad molecular de metal alcalino

418.3111	418.3083	5.16	1,20,25-trihidroxi-24-norvitamina D3	N.S	0.32	N.S	1.55	0.001	4.86	ESI+	[M+H] ⁺	Secosteroides [ST03]	Vitamina D3 y derivados
299.2724	299.2824	14.23	(d18:1) esfingosina	0.009	0.02	N.S	0.88	N.S	35.32	ESI+	[M+H] ⁺	Esfingolípidos	Bases esfingoides
541.3066	541.2921	1.6	sulfato de psicოსina	0	0	0	0	N.S	*	ESI+	[M+H] ⁺	Esfingolípidos	Glicoesfingolípidos
285.2941	285.3032	4.72	spisulosina	N.S	2.15	0.002	2.98	N.S	1.39	ESI+	[M+H] ⁺	Esfingolípidos, compuestos organonitrógenos	Aminas
229.2419	229.2406	1.57	xestoaminol C	N.S	0.92	0.05	1.06	N.S	1.16	ESI+	[M+H] ⁺	Esfingolípidos, compuestos organonitrógenos	Aminas
738.4212	738.419	3.91	isonuatigenina 3-[ramnosil-(1-2)-glucósido]	0	*	0	*	N.S	1.63	ESI-	[M-H] ⁻	Esteroides y derivados de esteroides	Glicósidos esteroideos
490.3145	490.3294	5.27	9,11epoxi-6-acetoxi-colest-7-en-3,5,19-triol	0	7.96	0	10.6	N.S	1.33	ESI+	[M+H] ⁺	Esteroles	Colesterol y derivados / colestanoide
522.2489	522.2569	2.47	26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihidroxi-23,24-didehidrovitamina D3	0	*	0	*	N.S	0.85	ESI+	[M+H] ⁺	Vitamina A y D, incluidas combinaciones de las dos	Vitamina D y derivados

RT: Tiempo de retención, FC: Cambio de pliegue, N.S.: No significativo, fosfatidiletanolamina (PE); fosfatidilcolina (PC); fosfatidilserina (PS); ceramida (cer); fosfatidilinositol (PI); valor *p* obtenido a partir de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tuckey y corregido mediante corrección posterior múltiple de Benjamini-Hochberg. *Metabolitos detectados solo en un grupo para el que no se puede calcular FC debido a su ausencia en el denominador de la fracción.

Anexo 2

Tabla 5. Metabolitos testiculares de ratones anotados después del análisis mediante la multiplataforma analítica combinando GC-MS (c), UHPLC-(⁺ESI)-QTOF (a) y UHPLC-(⁻ESI)-QTOF (b). El color rojo indicó una regulación positiva significativa de los metabolitos en comparación con el grupo de control (FC >1.5), mientras que el color verde indicó una regulación negativa (FC <0.75). RT: tiempo de retención, FC: cambio de pliegue, N.S.: no significativo, fosfatidiletanolamina (PE); fosfatidilcolina (PC); fosfatidilserina (PS); ceramida (cer); fosfatidilinositol (PI); fosfatidilglicerol (PG); valor *p* obtenido a partir de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tuckey y corregido mediante corrección posterior múltiple de Benjamini-Hochberg. NC: Metabolitos detectados solo en un grupo para los cuales no se puede calcular la FC debido a su ausencia en el grupo en el denominador de la fracción. NS: estadísticamente no significativo.

Masa Experimental (Da)	Masa Teórica (Da)	RT (min)	Compuesto	CC vs C		CC-Se vs C		CC-Se vs CC		Modo	Clase	RSD en el QC
				<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC	<i>p</i>	FC			
353.3302	353.3294	12.5	Anandamida (20:1, n-9)	<0.001	0.54	NS	0.74	<0.001	1.36	a	Compuestos organonitrogenados	24.9
261.0798	261.0801	2.3	Flumequina	<0.001	NC	<0.001	NC	NS	2.36	a	Quinolinas y derivados	10.6
497.2761	497.2754	9.7	PS(16:0)	<0.001	4.64	<0.001	3.79	NS	0.82	a	Glicerofosfolípidos	8.3
310.1784	310.178	7.7	3-Hidroxi-6,8-dimetoxi-7(11)-eremophilin-12,8-olida	<0.001	0.13	<0.001	0.14	NS	1.11	b	Lípidos prenólicos	4.9
408.2872	408.2876	7.8	Ácido 3a,7a,12b-Trihidroxi-5b-colaico	NS	NC	<0.001	30.71	<0.001	NC	b	Compuestos organooxigenados	23.1
785.1567	785.1571	2.2	Flavina adenina dinucleótido (FAD)	0.001	2.73	0.001	2.76	NS	1.01	b	Nucleótidos de flavina	7.9
420.3111	420.3114	8.3	Estearidionil carnitina	<0.001	47.05	0.000	42.48	NS	0.90	a	Acilios grasos	6.1
297.09	297.0896	1.3	5'-Desoxi-5'-(metil)adenosina	NS	1.39	0.001	1.59	NS	1.15	a	5'-desoxirribonucleósidos	5.0
503.3006	503.3012	9.7	LisoPE(20:3)	NS	1.30	<0.001	1.63	NS	1.25	b	Glicerofosfolípidos	18.3
339.3505	339.3501	15.0	Docosanamida	<0.001	6.02	<0.001	6.20	NS	1.03	a	Acilios grasos	59.9
419.3039	419.3036	11.7	Mixalamida S	NS	0.18	<0.001	0.16	NS	0.88	b	Acilios grasos	3.7
501.2864	501.2855	9.3	LisoPE(20:4)	NS	1.22	0.009	1.52	NS	1.24	a	Glicerofosfolípidos	12.5
545.2759	545.2754	9.2	PS(20:4)	NS	1.52	0.033	1.59	NS	1.04	a	Glicerofosfolípidos	33.1
453.2859	453.2855	8.8	LisoPE(16:0)	<0.001	2.87	<0.001	3.35	NS	1.17	b	Glicerofosfolípidos	9.6
612.1521	612.152	0.5	Glutación oxidado	<0.001	2.81	0.014	2.08	NS	0.74	a	Ácidos carboxílicos y derivados	141.4
551.3223	551.3223	10.4	PS(20:1)	<0.001	7.25	0.009	7.14	NS	0.99	a	Glicerofosfolípidos	24.1
326.2087	326.2093	7.8	2,3-Dinor-11b-PGF2a	<0.001	0.12	NS	0.34	<0.001	2.87	b	Acilios grasos	88.6

326.1923	326.1916	12.3	Ácido 2-dodecibencenosulfónico	NS	0.48	NS	0.59	0.034	1.22	b	Benceno y derivados sustituidos	89.9
332.2717	332.2715	13.1	Salfa-Androstan-17beta-ol propionato	<0.001	NC	<0.001	NC	NS	1.04	b	Esteroides	34.7
447.3356	447.3349	9.6	N-estearoil tirosina	NS	1.59	0.008	2.27	NS	1.43	a	Ácidos carboxílicos y derivados	5.4
335.3192	335.3188	13.5	Pipericina	<0.001	0.27	<0.001	0.26	NS	0.97	a	Acilios grasos	40.7
210.0927	210.0926	5.9	2-Etil-1-hexanol sulfato	<0.001	4.01	<0.001	10.72	NS	2.67	b	Ácidos sulfúricos orgánicos y derivados	13.3
350.1734	350.1729	11.8	Calonectrina	NS	1.41	<0.001	3.11	0.006	2.21	a	Lípidos prenólicos	47.2
323.3187	323.3188	10.7	N-(14-Metilhexadecanoil)pirrolidina	<0.001	NC	NS	1.00	<0.001	0.00	a	Pirrolidinas	32.3
722.5106	722.5098	13.0	PG(16:0/16:0)	0.039	1.57	NS	2.14	0.001	1.36	b	Glicerofosfolípidos	50.2
294.1839	294.1831	7.9	7-metil-octanoato de 4-hidroxi-3-metoxibencilo	<0.001	NC	<0.001	NC	NS	1.69	b	Fenoles	26.1
328.2615	328.2614	12.1	MG(16:1)	NS	0.13	0.002	0.04	NS	0.34	b	Glicerolípidos	3.1
312.1763	312.1759	12.3	Ácido N-undecibencenosulfónico	<0.001	0.46	NS	0.76	0.006	1.67	b	Benceno y derivados sustituidos	7.8
272.2357	272.2351	11.2	Ácido 16-Hidroxi hexadecanoico	NS	0.96	0.021	1.38	0.014	1.43	b	Acilios grasos	6.3
515.2917	515.2917	5.5	Ácido tauralocólico	0.014	0.37	NS	NC	0.001	NC	b	Esteroides y derivados de esteroides	18.7
60.03236276	60	4.6	Urea	0.015	0.30	0.014	0.36	NS	1.21	c	Ácidos carbónicos orgánicos y derivados	78.3
92.04734412	92	4.7	Glicerol	0.010	7.80	0.045	5.63	NS	0.72	c	Compuestos organooxigenados	43.3
94.95507	95	4.8	Fosfato	NS	1.59	NS	2.50	NS	1.57	c	Compuestos oxoaniónicos no metálicos	59.7
57.02146	57	5.1	Glicina	NS	4.94	NS	3.87	NS	0.78	c	Ácidos carboxílicos y derivados	100.4
97.05276	97	7.0	Prolina	NS	1.58	0.003	2.69	NS	1.71	c	Ácidos carboxílicos y derivados	68.8
194.0942943	194	7.1	Etil 4-etoxibenzoato	NS	0.85	NS	0.86	NS	1.01	c	Benceno y derivados sustituidos	70.3
140.0238458	140	8.6	Ácido fosfórico, éster monopropílico	NS	0.58	NS	0.71	NS	1.23	c	Ácidos fosfóricos orgánicos y derivados	79.7
256.2402303	256	10.7	Ácido palmítico	<0.001	0.21	<0.001	0.27	NS	1.29	c	Acilios grasos	35.6
180.0633881	180	10.9	Escilo-inositol	0.021	0.34	NS	0.476	NS	1.38	c	Compuestos organooxigenados	70.4
260.0297185	260	12.7	Fosfato de D-mio-inositol	<0.001	0.02	<0.001	0.02	NS	0.72	c	Compuestos organooxigenados	63.3
283.0916686	283	14.7	Guanosina	<0.001	0.02	<0.001	0.01	NS	0.42	C	Imidazopirimidinas	66.5

Anexo 3

Tabla 7. Concentración promedio y SEM (ng g⁻¹) de elementos en diferentes regiones del cerebro humano: Control (C), Alzheimer en Estadios Braak I-II (I-II), Alzheimer en Estadios Braak III-IV (III-IV) y Alzheimer en Estadios Braak V-VI (V-VI).

		Concentración (ng g ⁻¹)															
Braak	Región cerebral	Mg	Al	V	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Mo	Se	Cd	Sb	Tl	Pb
C	Caudado	141579.99	1091.66	0.967	32.49	384.08	108643.28	4.024	3978.26	15113.64	2.625	75.412	221.069	17.414	0.913	0.161	9.499
	Putamen	148846.15	445.99	0.927	25.41	529.87	192063.21	4.185	5566.23	16273.14	1.923	121.566	273.470	16.281	0.946	0.103	21.493
	Ganglios Basales	149169.79	836.00	2.713	21.65	473.51	155429.55	5.690	5083.64	13285.12	5.946	50.556	211.649	14.457	0.002	0.130	11.129
	Amígdala	114201.60	4817.60	3.161	59.60	224.23	57575.02	4.824	3925.94	22363.89	10.580	41.658	196.765	6.320	1.982	0.312	20.212
	Corteza frontal	141579.99	1091.66	0.967	32.49	384.08	108643.28	4.024	3978.26	15113.64	2.625	75.412	221.069	17.414	0.913	0.161	9.499
	Caudado	157646.23	585.15	0.553	27.53	540.82	173660.77	3.791	6402.41	15479.10	1.882	108.985	264.850	20.468	0.678	0.096	17.490
I-II	Putamen	163066.12	367.70	0.221	32.27	592.46	159714.03	3.695	6781.56	14670.20	1.613	109.605	263.061	15.263	0.380	0.108	9.181
	Ganglios Basales	153913.30	602.72	1.265	12.04	401.47	134710.29	5.413	5023.12	15168.36	4.605	52.859	226.015	11.259	0.000	0.045	8.078
	Amígdala	153417.70	2970.24	3.411	68.07	249.63	65093.80	5.276	4552.37	26798.74	6.733	31.045	207.815	8.564	1.889	0.384	19.557
	Corteza frontal	157646.23	585.15	0.553	27.53	540.82	173660.77	3.791	6402.41	15479.10	1.882	108.985	264.850	20.468	0.678	0.096	17.490
	Caudado	131870.13	967.89	1.836	31.15	424.61	135721.72	2.589	4887.51	14033.73	3.566	72.921	248.364	20.500	1.491	0.084	16.123
	Putamen	127623.95	608.19	1.513	24.96	375.77	103364.14	3.065	4564.48	13321.52	3.302	61.905	246.294	17.964	1.240	0.070	17.785
III-IV	Ganglios Basales	152613.51	1953.88	1.874	38.36	467.22	195047.14	5.801	6216.60	13804.97	7.711	67.510	242.793	15.089	0.807	0.397	16.800
	Amígdala	136352.52	3975.86	3.159	53.65	258.45	56350.52	6.340	4731.21	25737.83	12.680	31.953	200.352	6.671	1.817	0.399	17.814
	Corteza frontal	131870.13	967.89	1.836	31.15	424.61	135721.72	2.589	4887.51	14033.73	3.566	72.921	248.364	20.500	1.491	0.084	16.123
	Caudado	135588.59	1192.39	1.594	36.93	447.56	125154.63	3.994	4760.85	11845.53	4.739	63.149	194.345	15.033	0.239	0.116	11.799
V-VI	Putamen	135406.42	564.86	2.052	34.77	461.75	160147.67	1.984	5215.98	14637.56	3.919	80.063	261.544	19.878	1.558	0.096	20.146
	Ganglios Basales	157092.29	1509.45	1.226	34.84	285.56	102733.97	4.284	4706.26	12886.09	10.546	43.299	218.571	15.687	0.482	0.234	10.853
	Corteza Frontal	135588.59	1192.39	1.594	36.93	447.56	125154.63	3.994	4760.85	11845.53	4.739	63.149	194.345	15.033	0.239	0.116	11.799



