



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

**EFFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO Y
LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSITO SUBCUTÁNEO DE LA
REGIÓN ABDOMINAL Y EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES
CON SÍNDROME METABÓLICO**

Patricia Judhit Peña Orihuela



TESIS DOCTORAL - 2014

TITULO: *Efecto de la grasa de la dieta sobre el perfil proteómico y la expresión génica en tejido adiposo subcutáneo de la región abdominal y en células mononucleares de pacientes con síndrome metabólico*

AUTOR: *Patricia Judhit Peña Orihuela*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2014
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
Departamento de Medicina

**EFFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO Y
LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO DE LA
REGIÓN ABDOMINAL Y EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES
CON SÍNDROME METABÓLICO**

Trabajo presentado por
Patricia Judhit Peña Orihuela
Licenciada en Nutrición, para optar al grado de
Doctor

Dirigido por
Prof. Dr. José López Miranda
Dr. Antonio Camargo García



Córdoba - España, 2014

Portada:

“OBESITY, BEYOND THE NEWS”

The Beyond the News campaign

2008

FRANCE 24 - French international news channel



TÍTULO DE LA TESIS: EFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE EL PERFIL PROTEÓMICO Y LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO DE LA REGIÓN ABDOMINAL Y EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO

DOCTORANDA: Patricia Judhit Peña Orihuela

INFORME RAZONADO DEL DIRECTOR DE LA TESIS

El trabajo de tesis realizado por Patricia Judhit Peña Orihuela, bajo nuestra dirección en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba/Universidad de Córdoba, se ha basado en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta postprandial del tejido adiposo y las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Síndrome Metabólico a la cantidad y tipo de grasa ingerida en la dieta, mediante el uso de técnicas tanto genómicas como proteómicas. Los resultados obtenidos responden a los objetivos planteados inicialmente y además, contribuyen a comprender mejor el estado postprandial y los mecanismos de respuesta antioxidante ante estímulos como la grasa de la dieta. En cuanto a la difusión de los resultados de la tesis, la doctoranda ha participado en 8 congresos científicos, presentando ponencias orales y posters; además ha publicado o está en vías de publicación, en colaboración con sus tutores de tesis y otros colaboradores de nuestro grupo de investigación, 3 artículos SCI publicados, 1 artículo en vías de publicación y otro artículo en redacción. Las publicaciones derivadas de ésta tesis doctoral son las siguientes:

Camargo A, Rangel-Zúñiga OA, Peña-Orihuela P, Marín C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Gutierrez-Mariscal FM, Malagón MM, Roche HM, Tinahones FJ, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 2013;24(1):318-24.

Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zúñiga OA, Perez-Martinez P, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Paniagua JA, Tinahones FJ, Malagon MM, Roche HM, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem.* 2013 Oct;24(10):1717-23.

Camargo A, Peña-Orihuela P, Rangel-Zúñiga OA, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Cruz-Teno C, Marín C, Tinahones FJ, Malagón MM, Roche HM, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J. Tissue-specific response to dietary fat in metabolic syndrome patients. (en revisión por la revista *Free Radical Biology and Medicine*).

A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor. Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 12 de Febrero de 2014

Firma de los directores

Fdo.: Prof. Dr. José López Miranda

Fdo.: Dr. Antonio Camargo García

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José López Miranda que ha creído en mí, y ha dirigido mi tesis doctoral de manera impecable, que junto con el Dr. Francisco Pérez Jiménez, me han aceptado en su prestigioso grupo de investigación.

Al Dr. Antonio Camargo, que ha co-dirigido mi tesis doctoral empleando su valioso tiempo para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Oriol Rangel, que me ha ayudado con la mejor de las predisposiciones en la parte experimental de esta tesis doctoral.

Al Ministerio de Educación, que ha valorado mi formación profesional al concederme la beca FPU, con la que se me permitió llevar a cabo la tesis.

A mis compañeros del laboratorio experimental, que me tuvieron tanta paciencia ya que vengo de una carrera con formación clínica, y me enseñaron las técnicas de laboratorio y aportaron mucho a mi formación en investigación básica. Gracias Cristina y María José, ustedes marcaron mis primeros pasos en el grupo, a Quico, Elena, Lore, Charo, Las Cármenes: Marín, Ruiz y Haro, a las de arriba: Puri, Gracia y Vane, Pilar Gómez y Bego. Un especial agradecimiento a Vanessa Hernández por haber sido mi ángel de la guarda e igualmente a Paco Conde, a ambos por ayudarme con los Western Blot.

Especialmente, a mi querido Paraguay, que me dejó partir en busca de nuevos horizontes.

Y por sobre todo a Dios, por su infinita bondad y amor, por haberme permitido llegar hasta el día de hoy y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

DEDICADA A:

A mi esposo Rafa, mi otra mitad. Quien me brinda una sonrisa cada día y me da ánimos, apoyo moral y por sobretodo comprensión en los momentos difíciles. Gracias a ti, puedo superar el mayor de los sacrificios que he hecho jamás: estar lejos de mis padres y mi tierra.

A mi mami adorada, mi mejor amiga. Quien cree en mí y desde pequeña me enseñó valores y me dio ejemplos de amor, respeto, honestidad, tolerancia, lealtad, perseverancia, gratitud y sacrificio.

A mi papá quien me enseñó que si te dedicas 100% a estudiar y a cultivarte, todo tiene sus frutos y tus méritos te ayudan a salir adelante y a conseguir lo que te propongas.

A mi hermano Nelson que nos regaló lo mejor de él: mi ahijado Leo.

Especialmente a mi querida abuela Claudia. Tata, sé que estás velando por mí cada día.

A mi familia política Nati, Rafa, Inma, Guillermo, mama Conchi y tita Anita, quienes me han acogido con mucho cariño como a una hija, hermana y nieta.

A los amigos de toda Latinoamérica que invadieron la UCO y permanecen hasta hoy como amigos de esos entrañables e inolvidables: Eliana, Ire, Rodrigo, Oscar, Maru, Aleyda, Leslie, Vane, Marian, Miguel, Dany, Mara, César, Paloma, Francieli y Natalia.

“Si no conozco una cosa, la investigaré”

Louis Pasteur.

“El camino del progreso no es ni rápido ni fácil”

Marie Curie.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN 1

1. ESTRÉS OXIDATIVO 3

1.1. Definición 3

1.2. Causas del estrés oxidativo 3

1.3. Sistema de defensa antioxidante 10

2. SÍNDROME METABÓLICO 19

2.1. Definición 19

2.2. Criterios diagnósticos 20

2.3. Epidemiología 23

2.4. Etiología y patogénesis 25

2.5. Síndrome Metabólico y disfunción del tejido adiposo, inflamación de bajo grado y estrés oxidativo 29

2.6. Síndrome Metabólico y co-morbilidades asociadas 34

3. DIETA Y ESTADO POSTPRANDIAL 42

3.1. Importancia del estado postprandial 42

3.2. Dieta y estrés oxidativo postprandial 43

III. HIPÓTESIS 47

IV. OBJETIVOS 51

V. DISEÑO Y METODOLOGÍA 55

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO 57

1.1. Cálculo del tamaño muestral 57

1.2. Criterios de inclusión 58

1.3. Criterios de exclusión 58

2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO 59

2.1. Estudio de intervención dietética 59

2.2. Estudio del postprandio 63

3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	65
3.1. Extracciones sanguíneas	65
3.2. Aislamiento del plasma	65
3.3. Análisis lipídico	65
3.4. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)	66
3.5. Obtención de muestras de tejido adiposo	67
3.6. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR semicuantitativa en tiempo real mediante la plataforma OpenArray Real-Time PCR (Applied Biosystems)	69
3.7. Análisis Proteómico Bidimensional (2D-PAGE)	71
3.8. Validación de experimentos por Western Blot	74
3.9. Análisis estadístico	76
VI. RESULTADOS	79
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES	81
2. EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSO. EFECTO DEL CONSUMO A LARGO PLAZO DE CUATRO MODELOS DE DIETAS CON DIFERENTE CANTIDAD Y TIPO DE GRASA	81
2.1. Efecto de la dieta en la expresión génica de las subunidades de la NADPH-oxidasa en tejido adiposo	82
2.2. Efecto de la dieta en la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa antioxidante en tejido adiposo	84
2.3. Expresión génica postprandial de las subunidades de la NADPH-oxidasa en tejido adiposo	87
2.4. Expresión postprandial de genes relacionados con el sistema de defensa antioxidante en tejido adiposo	89
3. EFECTO DEL CONSUMO A LARGO PLAZO DE CUATRO MODELOS DE DIETAS CON DIFERENTE CANTIDAD Y TIPO DE GRASA EVALUADO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELO CELULAR IN VIVO	93

3.1. Efecto de la dieta en la expresión génica de las subunidades de la NADPH-oxidasa en CMSP	94
3.2. Efecto de la dieta en la expresión de genes del sistema de defensa antioxidante en CMSP	96
3.3. Expresión génica postprandial de las subunidades de la NADPH-oxidasa en CMSP	99
3.4. Expresión postprandial de genes del sistema de defensa antioxidante en CMSP	101
3.5. Niveles de la proteína de NFE2L2 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante Western Blot	104
4. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CMSP, TEJIDO ADIPOSO Y LOS PARÁMETROS Y BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICOS EN ESTADO POSTPRANDIAL	106
4.1. Análisis de correlación entre la expresión génica en CMSP con los biomarcadores de estrés oxidativo y los parámetros plasmáticos lipídicos en estado postprandial	106
4.2. Análisis de correlación entre la expresión génica postprandial en CMSP y en Tejido adiposo	109
5. EFECTO DEL TIPO DE GRASA EN EL PROTEOMA POSTPRANDIAL DE CMSP MEDIANTE PROTEÓMICA 2-D	110
5.1. Análisis del efecto de la grasa en la dieta en el proteoma	110
5.2. Validación de los resultados obtenidos por proteómica 2-D, mediante Western blot	115
5.3. Análisis de las rutas afectadas por el tipo de grasa en la comida ingerida	117
VII. DISCUSIÓN	121
VIII. CONCLUSIONES	143
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
X. ANEXOS	169

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

AHA: Asociación Americana del Corazón

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ATGL: Lipasa triglicérido adiposa

ATP: Adenosín trifosfato

ATPIII: Tercer informe del panel de expertos del programa de Educación Nacional sobre colesterol

BAT: Tejido adiposo marrón

CAT: Catalasa

DHA: Ácido docosahexaenoico

DMT2: Diabetes mellitus tipo 2

ECV: Enfermedad Cardiovascular

EDTA: Ácido etilamino-tetracético

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FDA: US Food and Drug Administration

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSR: Glutación reductasa

GSSG: Glutación oxidado

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HMUFA: Alta en ácidos grasos monoinsaturados

HOSO: Cápsula de aceite de girasol alto oleico

HSFA: Alta en ácidos grasos saturados

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IL: Interleuquina

IMC: Índice de masa corporal

KEAP1: Proteína represora-1 asociada a ECH

Abreviaturas

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LFHCC n-3: Baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos y suplementada con ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino

LFHCC: Baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos y suplementada con placebo

LPOs: Lipoperóxidos

LPS: Lipopolisacáridos

Marinol TM C-38: Concentrado natural de aceite de pescado con alto contenido en ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico

MESYAS: Metabolic Syndrome in Active Subjects

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NFE2L2: Factor 2 asociado al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2)

NF-kB: Factor de transcripción nuclear kappa B

NHLBI: Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre. Declaración Científica

NOS: Óxido nítrico sintasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PKA: Proteína quinasa A

PPAR γ : Receptor activado proliferador del peroxisoma

PUFA n-3: ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino

RCS: Especies reactivas de cloro

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SAFA: Ácidos grasos saturados

SMet: Síndrome Metabólico

SOD: Superóxido dismutasa

SREBP1: Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides

TG: Triglicéridos

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TXN: Tiorredoxina

TXNRD1: Tiorredoxina reductasa 1

v/v: volumen/volumen

VCT: Valor calórico total

WAT: Tejido adiposo blanco

I. RESUMEN

Introducción: La etiología del Síndrome Metabólico (SMet) es probablemente consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales. De entre los factores ambientales destaca la dieta y en particular el tipo de grasa. En un estudio previo, se observó que el consumo de una dieta rica en grasas monoinsaturadas reduce el estrés oxidativo postprandial en pacientes con SMet. Por otra parte, se ha propuesto que el estrés oxidativo es generado en el tejido adiposo y se considera el factor más importante relacionado con el desarrollo del SMet, el cual se caracteriza por un estado inflamatorio crónico y elevados niveles de ROS generadas en el tejido adiposo lo que conduce a un estrés oxidativo sistémico, dando lugar al desarrollo de resistencia a la insulina, diabetes y aterosclerosis. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) han sido ampliamente estudiadas ya que modifican su expresión génica en respuesta a estímulos como la dieta y factores metabólicos que reflejan lo que ocurre a nivel sistémico, pero hasta el momento no se ha estudiado el efecto de la dieta sobre el estrés oxidativo en tejido adiposo humano, por lo que es fundamental estudiar los cambios que se producen en la expresión génica y en el proteoma, tras el consumo de cuatro modelos de dieta en ayunas y en estado postprandial.

Hipótesis: Nos planteamos el hecho de que la cantidad y tipo de grasa de la dieta podrían modular el perfil de expresión de genes implicados en la formación de especies reactivas de oxígeno y en la defensa antioxidante en tejido adiposo y en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Síndrome Metabólico, y así influir en el grado de estrés oxidativo a nivel sistémico.

Objetivo principal: Determinar el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta con diferente cantidad y tipo de grasa (HMUFA (20% MUFA), HSFA (16% SFA), LFHCC (6% PUFA) y LFHCC n-3 (6% PUFA y 1.24 g/d de PUFA n-3 de cadena larga y origen marino) tanto en ayunas como en estado postprandial en la expresión génica (niveles de ARNm) de las subunidades que

conforman el complejo generador del anión superóxido, NADPH-oxidasa en tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet.

Objetivos secundarios:

1. Estudiar el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta con diferente cantidad y tipo de grasa en la expresión génica en ayunas y en estado postprandial de enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante: SOD1 y SOD2, CAT, GSR, GPx1, GPx3 y GPx4, TXN, TXNRD1, el factor de transcripción NFE2L2 y KEAP1, en tejido adiposo de pacientes con SMet.

2. Estudiar el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta en la expresión génica de las subunidades del complejo generador del anión superóxido, NADPH-oxidasa y el factor de transcripción PU.1, así como la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa antioxidante: SOD1 y SOD2, CAT, GSR, GPx1, GPx4, TXN, TXNRD1 y el factor de transcripción NFE2L2, tanto en ayunas como en estado postprandial en células mononucleares de sangre periférica con el objetivo de establecer efectos diferenciales en cada tipo celular.

3. Analizar la relación entre la expresión génica tanto en tejido adiposo como en células mononucleares de sangre periférica de los genes relacionados con el estrés oxidativo y los parámetros lipídicos y biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo.

4. Identificar las proteínas de respuesta rápida al tipo de grasa ingerida en la dieta, mediante cambios en el proteoma de CMSP aisladas de pacientes con SMet, en respuesta a la ingesta aguda de cuatro comidas con diferente tipo de grasa.

Población, diseño y metodología: El estudio con diseño aleatorizado se llevó a cabo con un grupo de 75 pacientes con SMet del estudio LIPGENE, los cuales fueron asignados para recibir una de las cuatro dietas durante 12 semanas: **(A)** dieta HSFA, rica en grasas saturadas con 38% de energía a expensas de grasa (de las cuales 16% HSFA); **(B)** dieta HMUFA, rica en grasas monoinsaturadas con 38% de energía a expensas de grasa (de las cuales 20% MUFA); **(C)** dieta

LFHCC, pobre en grasa y rica en hidratos de carbono complejos con 28% de energía a expensas de grasa (de las cuales 6% PUFA) y (D) dieta LFHCC n-3, pobre en grasa y rica en hidratos de carbono complejos y suplementada con 1.24 g/d PUFA n-3 de origen marino y 28% de energía a expensas de grasa (de las cuales 6% PUFA). Al inicio y tras el periodo de intervención dietética, los pacientes consumieron una comida grasa de similar composición que la dieta a la que habían sido asignados. Antes y después de la intervención dietética se les realizaron extracciones sanguíneas en ayunas, a las 2 y las 4 horas de la ingesta de la comida grasa, además se tomaron muestras de tejido adiposo subcutáneo a un subgrupo de 39 pacientes en estado de ayunas y a las 4 horas de la comida grasa. Se determinó la expresión de los genes relacionados con el estrés oxidativo, tales como el factor de transcripción PU.1 y las subunidades de la NADPH-oxidasa (*gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}* y *p40^{phox}*), así como los genes implicados en la defensa antioxidante (*NFE2L2*, *KEAP1*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx3*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* y *TXNRD1*), el análisis se llevó a cabo por PCR a tiempo real en T.A. subcutáneo y CMSP de pacientes con SMet. Además, se llevó a cabo el análisis proteómico comparativo del proteoma de CMSP de pacientes con SMet, mediante electroforesis en geles 2-D de las fracciones nucleares y citoplasmáticas de CMSP en ayunas y a las 4 horas de la ingesta de una comida grasa.

Resultados: En tejido adiposo y en CMSP, se observó un incremento en la expresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa y los genes antioxidantes en ayunas, independientemente de la cantidad y tipo de grasa de la dieta. En tejido adiposo, se observó que la ingesta de la comida HSFA aumentó los niveles postprandiales del ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa *gp91^{phox}* y *p67^{phox}*, así como también de los niveles del ARNm de *CAT*, *GPx*s y *TXNRD1* (todas con valor $P < 0,05$), en comparación con la ingesta de las comidas HMUFA, LFHCC Y LFHCC n-3. Igualmente, los niveles postprandiales del ARNm de *KEAP1* aumentaron tras la ingesta de la comida HSFA, en comparación con la ingesta de las comidas HMUFA ($P = 0,007$) y LFHCC n-3 ($P = 0,001$).

En CMSP, los niveles postprandiales del ARNm de gp91^{phox} (P<0.001), p22^{phox} (P=0.005), p47^{phox} (P=0.001) y p40^{phox} (P<0.001), además de los genes antioxidantes *SOD1*, *SOD2*, *GSR*, *GPX1*, *GPX4*, *TXN*, *TXNRD1* y *NFE2L2* (todas con valor P<0,05), aumentaron a las 2 horas de la ingesta de la comida HSFA. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles de ARNm de estos genes con las demás dietas. En el análisis comparativo del proteoma, la ingesta de la comida HSFA aumentó la respuesta postprandial de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo (HSPA1A, PDIA3 y PSME1) y con el daño al ADN (SMC6), mientras que la ingesta de la comida HMUFA causó la sobreexpresión de las proteínas HSPA1A y PDIA3. La ingesta de la comida LFHCC n-3 redujo la cantidad de proteína relacionada con la beta-oxidación peroxisomal ECH1.

Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren que la ingesta de una dieta rica en grasas saturadas (SFA) produce un aumento del estrés oxidativo, el cual está generado principalmente en el tejido adiposo, lo que aumenta la respuesta antioxidante de las CMSP en comparación con una dieta rica en grasa monoinsaturada (MUFA) y que la sustitución de SFA por MUFA puede ser una estrategia dietética eficaz para reducir el estrés oxidativo en pacientes con SMet y sus consecuencias fisiopatológicas.

II. INTRODUCCIÓN

1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. Definición

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) , y su eliminación por mecanismos de defensa conocidos como sistemas antioxidantes [1]. Las consecuencias del estrés oxidativo incluyen el daño celular, lo que implica daño al ADN, a lípidos, proteínas, carbohidratos, etc. El daño oxidativo, en particular al ADN, puede desencadenar la muerte celular por apoptosis o necrosis. Además, el estrés oxidativo se asocia con mecanismos patológicos de numerosas enfermedades tales como la aterosclerosis, cáncer, diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias, así como también con el proceso de envejecimiento [1, 2].

1.2. Causas del estrés oxidativo

1.2.1. Especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas se clasifican en “radicales libres” y “no radicales”. Entre las especies reactivas se encuentran las de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS), y las especies reactivas de cloro (RCS) [2], (en la **Tabla 1** se presentan algunas de las especies reactivas más conocidas). Las especies reactivas pueden dañar al ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos ocasionando daño ya sea por oxidación o nitración [2, 3].

Las ROS han sido relacionadas con el desarrollo de numerosas enfermedades, tales como cáncer, diabetes, enfermedades inflamatorias, entre otras [1, 2], sin embargo, son necesarias para llevar a cabo ciertas funciones fisiológicas del organismo como la fagocitosis, la proliferación celular, adaptación muscular al ejercicio y la regulación de transducción de señales [4-7].

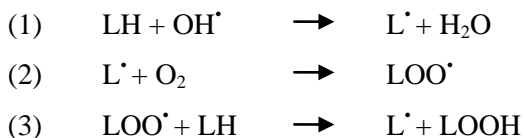
El daño oxidativo no siempre es causado por un aumento en la producción incrementada de ROS, sino que puede deberse también a algún defecto en el proceso de eliminación de las especies reactivas por parte del sistema de defensa antioxidante. Además, el impacto del estrés oxidativo depende del tipo de especie

reactiva, así como del sitio y la intensidad de su producción, del período de acción de la especie reactiva, así como de la actividad de los antioxidantes, y de los sistemas de defensa y reparación celular [1, 2, 6].

Tabla 1. Especies reactivas (adaptación de Halliwell B. et al. [2])

Radicales libres	No radicales
Especies reactivas de oxígeno (ROS)	
Superóxido, $O_2^{\cdot-}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, OH^{\cdot}	Oxígeno singulete, 1O_2
Hidroperoxilo, HO_2^{\cdot}	Peróxido orgánico, $ROOH$
Peroxilo, RO_2^{\cdot}	
Alcoxilo, RO^{\cdot}	
Carbonato, $CO_3^{\cdot-}$	
Dióxido de carbono, $CO_2^{\cdot-}$	
Especies reactivas de cloro (RCS)	
Cloro atómico, Cl^{\cdot}	Ácido hipocloroso $HOCl^{\cdot}$
	Cloruro de nitrilo, NO_2Cl^{\cdot}
Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	
Oxido nítrico, NO^{\cdot}	Ácido nitroso, HNO_2
Dióxido de nitrógeno, NO_2^{\cdot}	Anión nitroxilo, $NO^{\cdot-}$
	Peroxinitrito, $ONOO^{\cdot-d}$
	Ácido Peroxinitroso, $ONOOH^d$

La especie reactiva de oxígeno más reactiva es el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el cual es capaz de reaccionar con casi todo tipo de moléculas biológicas [2, 3]. Un ejemplo de esta reactividad es la peroxidación lipídica, iniciada por un radical OH^{\cdot} en la que se extrae un átomo de hidrógeno de la cadena del ácido graso (LH), quedando un átomo de carbono con hidrógeno *bis-alílico* ($\text{--}^H \times \text{--}^H$) (reacción 1). El radical L^{\cdot} reacciona con el O_2 para generar un radical lipoperóxido (LOO^{\cdot}) (reacción 2), y su vez el LOO^{\cdot} reacciona con otro ácido graso y así genera otro radical L^{\cdot} y un radical lipohidroperóxido ($LOOH$) (reacción 3), de esta manera la cadena se propaga generando más especies reactivas.



Otras especies reactivas no radicales como el ácido peroxinitroso (ONOOH) y ácido hipocloroso (HOCl), parecen reaccionar preferentemente con las proteínas [5]. Varios estudios apuntan hacia la implicación de ROS y RNS en las modificaciones oxidativas de lípidos y proteínas en las diferentes etapas de la lesión aterosclerótica [5, 8, 9]. Cualquier factor que ocasione estrés oxidativo puede promover la oxidación proteica, ya sea por disminución en la eficiencia de los antioxidantes, aumento en la producción de ROS o aumento en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas [10]. No obstante, las proteínas mal plegadas o péptidos incompletos por errores en la traducción, son los blancos más susceptibles para la oxidación [8, 9], de manera tal que sufren modificaciones y forman grupos carbonilo, los cuales se utilizan para evaluar el grado oxidativo en los sistemas biológicos [10, 11]. Dependiendo de las ROS a las que se expongan las proteínas, la oxidación puede ser específica (oxidación catalizada por un metal que reacciona con H_2O_2 , dando como resultado la formación de radical hidroxilo) o inespecífica (por radiación produciendo oxígeno singlete), además la oxidación puede ser reversible (Glutacionilación o S-nitrosilación) o irreversible (carbonilación, formación de enlaces proteína-proteína, ruptura de enlaces peptídicos y nitración). La generación de grupos carbonilo se realiza por oxidación directa de aminoácidos (prolina, lisina, arginina y treonina) con ROS [10, 12]. Una de las principales fuentes generadoras de ROS y por lo tanto desencadenante de estrés oxidativo en muchas células y tejidos es el complejo enzimático NADPH-oxidasa que se activa respondiendo a diversos estímulos generando anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) [5, 13].

1.2.2. Fuentes generadoras de ROS

i) Respiración mitocondrial

La mitocondria es la encargada del metabolismo aerobio, donde la energía que proviene de los alimentos se convierte en energía útil en forma de ATP. Como resultado del flujo de electrones a través de la cadena de transporte mitocondrial, aproximadamente el 1-2% del oxígeno molecular consumido, puede convertirse en $O_2^{\cdot-}$ como subproducto de la respiración aeróbica [14].

El anión superóxido del complejo III es liberado tanto en la matriz mitocondrial, donde la enzima SOD2 cataliza la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a oxígeno molecular y H_2O_2 [15], como en el espacio intermembrana donde de manera similar actúa la SOD1 [14, 16]. El H_2O_2 , a su vez, es eliminado (reducido a H_2O) por la GPxs, CAT o peroxiredoxinas o en su defecto se descompone para generar el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) altamente reactivo, a través de la reacción de Fenton (H_2O_2 con metales de transición como el hierro). De esta manera, a través de la respiración mitocondrial se forman las especies reactivas $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} [3, 17]. La producción de ROS por la mitocondria está relacionada con procesos de envejecimiento y en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas [15], así como en el inicio de la lesión aterosclerótica [5].

ii) NADPH-oxidasa

La NADPH-oxidasa es un complejo enzimático localizado en la membrana plasmática de las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos), de manera que las ROS generadas por esta enzima son utilizadas para eliminar bacterias y microorganismos invasores que representan una amenaza para la célula. No obstante, estudios recientes han demostrado que esta enzima también se encuentra en células no fagocíticas [18, 19]. Este complejo enzimático cataliza la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), de tal manera que, reduce el oxígeno molecular, utilizando NADPH como donador de electrones (reacción 4), y generando anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que a su vez por dismutación

del O_2^- genera productos secundarios que incluyen otras especies reactivas como por ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (reacción 5) [5, 20, 21].



El complejo enzimático NADPH-oxidasa consta de dos subunidades ancladas a la membrana que son la $gp91^{phox}$ y $p22^{phox}$, formando el heterodímero flavocitocromo b_{558} , y las subunidades citoplasmáticas, tales como la $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$, además de una proteína G (**Figura 1**). Este complejo enzimático se activa mediante la fosforilación de $p47^{phox}$, lo que provoca su posterior migración hacia la membrana [5, 20, 21] y su transcripción está regulada por el factor de transcripción PU.1, el cual cumple una función promotora de la subunidad $p47^{phox}$ [22, 23]. La subunidad $p22^{phox}$ se encuentra en membrana, junto con $gp91^{phox}$ que tiene una cola en el citoplasma. Cuando el complejo enzimático NADPH-oxidasa se activa, la subunidad $p47^{phox}$ se fosforila e interacciona con la subunidad $gp91^{phox}$, dando lugar a la producción de O_2^- (reacción 4); proceso involucrado en la defensa y señalización de la célula (**Figura 1**).

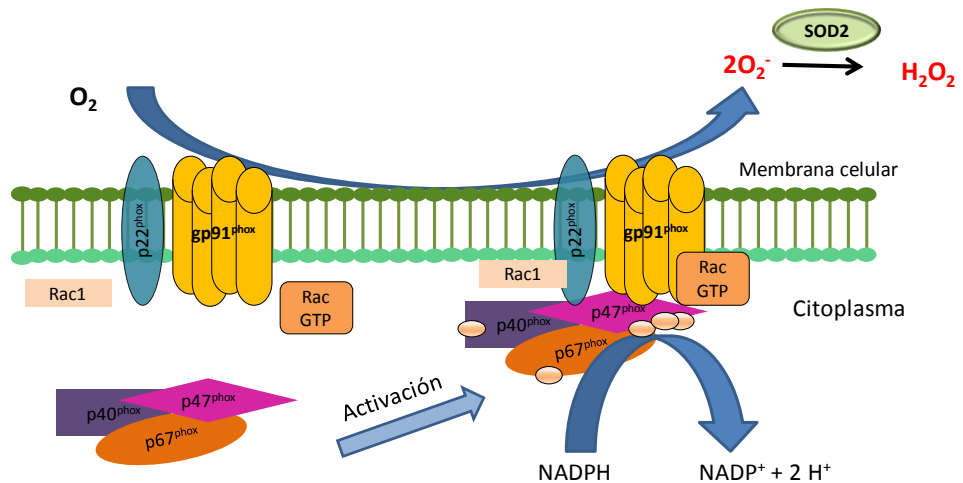


Figura 1. Activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa (Adaptación de Assari T [24]).

En un principio se pensó que la subunidad p67^{phox} era una proteína accesoria, aunque ahora se sabe que es necesaria para el ensamblaje y activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa. A concentraciones suficientemente altas de p67^{phox}, la producción de superóxido tiene lugar en ausencia de p47^{phox} [5, 21].

La NADPH-oxidasa puede ser activada y regulada por agonistas de los receptores acoplados a proteínas G, tales como angiotensina II y endotelina I, además de factores de crecimiento como la trombina y el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF), TNF α , hiperglucemia, hiperinsulinemia, NEFAs elevados, lípidos oxidados, entre otros [25]. En células adiposas, el incremento de ácidos grasos libres activa la NADPH-oxidasa estimulando la producción de ROS, lo mismo ocurre en modelos de ratones obesos diabéticos y no diabéticos [26]. En niños con aterosclerosis prematura, la subunidad gp91^{phox} puede tener un papel patogénico en los cambios funcionales y anatómicos de la pared arterial [27].

iii) **Xantina oxidasa**

La xantina oxidasa es una flavoproteína que contiene molibdeno, hierro y azufre (del inglés iron sulfur molybdenum flavoprotein). Esta enzima existe en dos formas funcionalmente distintas: la xantina deshidrogenasa NAD⁺-dependiente que produce NADPH y urato; y puede ser transformada en xantina oxidasa, oxígeno dependiente que genera O₂⁻ y/o H₂O₂ y urato [5, 28]. La xantina oxidasa está presente en altas concentraciones en las células endoteliales de los capilares y sinusoides, además es una fuente importante de O₂⁻, especialmente en las zonas de las lesiones ateroscleróticas [2]. Tras la oxidación de xantino o hipoxantino a ácido úrico, se genera H₂O₂. A pH fisiológico, el ácido úrico pierde un protón dando lugar a la formación de urato, cuyos niveles elevados provocan la gota [3, 5].

iv) **Óxido nítrico sintasa (NOS)**

Esta enzima cataliza la oxidación de L-arginina a L-citrulina y el NO[•] (potente vasodilatador) [5]. Existen tres isoformas de NOS: la isoforma neuronal (nNOS/NOS1), la inducible (iNOS/NOS2) y la endotelial (eNOS/NOS3). En el sistema cardiovascular, la eNOS es la más relevante ya que está presente en las células endoteliales donde se expresa de manera constitutiva y sintetiza NO[•] durante cortos periodos de tiempo en respuesta a un estímulo [5, 29]. En ciertas circunstancias, eNOS puede desacoplarse debido a la falta de cofactores como la tetrahidrobiopterina y producir O₂^{•-} en vez de NO[•] [29, 30]. Además, la biodisponibilidad reducida de NO[•] como resultado del desacople de NOS, ha sido relacionado con patologías cardiovasculares como disfunción endotelial, cardiomiopatía, aterosclerosis, hipertensión y diabetes [30].

v) **Lipoxigenasa**

Las lipoxigenasas son una familia de dioxigenasas, cuya función es catalizar la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados mediante dioxigenación estéreo-específica dando como resultado la formación de eicosanoides [5, 17]. Estos hidroperóxidos de ácidos grasos biológicamente activos, tales como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos son metabolitos del ácido araquidónico y ácidos grasos similares que actúan como traductores de señales involucrados en la respuesta inflamatoria, permeabilidad vascular, cáncer, enfermedad cardiovascular y renal, desórdenes degenerativos y SMet [5, 17, 31].

En resumen, las ROS cumplen funciones fisiológicas ya sea como traductor de señales, defensa ante agentes que pueden dañar a la célula o simplemente con el fin de eliminar productos de desecho de la célula; sin embargo elevados niveles de ROS producen daño oxidativo.

1.3. Sistema de defensa antioxidante

Una molécula antioxidante, tiene la función de proteger a una célula diana del daño oxidativo. Como se ha descrito en el apartado anterior, el estrés oxidativo puede dañar y alterar a los lípidos, las proteínas, el ADN, etc. El sistema de defensa antioxidante está constituido por enzimas con actividad antioxidante que detoxifican las ROS, y por tanto, reducen el daño oxidativo, y cuyo objetivo fundamental es mantener el equilibrio oxidante/antioxidante.

1.3.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Las superóxido dismutasas son la primera línea de defensa antioxidante contra las ROS, específicamente contra el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Son una familia de enzimas que catalizan la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2) [32] (**Figura 2**). La isoforma SOD1 o CuZn-SOD se localiza en el citosol y su expresión aumenta en respuesta a estímulos tales como H_2O_2 , O_3 , óxido nítrico, ácido araquidónico, metales pesados, rayos UVB y X y choques térmicos, entre otros [32, 33]. La otra isoforma SOD2 o Mn-SOD se localiza en la mitocondria, y su expresión es modulada por citoquinas tales como IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ y por lipopolisacáridos (LPS) [33]. La producción de la enzima superóxido dismutasa aumenta tras la activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa en las células inflamatorias y en respuesta a la producción de xantina oxidasa tras la isquemia [34].

1.3.2. Catalasa (CAT)

Esta enzima se halla en casi todos los organismos vivos expuestos a oxígeno y cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (reacción 7) [5] (**Figura 2**).



La catalasa también elimina los peróxidos orgánicos y utiliza el H_2O_2 para oxidar toxinas incluyendo fenoles, ácido fórmico, formaldehído y alcoholes [35]. Esta enzima además protege a la hemoglobina del H_2O_2 generado en los eritrocitos

y además de sus funciones antioxidantes, está implicada en procesos de inflamación, apoptosis, envejecimiento y cáncer [36].

1.3.3. Glutación peroxidasa (GPx)

Estas peroxidasas son una familia de cuatro isoenzimas que catalizan la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos a agua o a los correspondientes alcoholes, utilizando glutación reducido (GSH) [37, 38] (**Figura 2**). Existen tres isoenzimas GPxs dependientes de selenio, entre las que se incluyen: GPx1, GPx2 y GPx3. El fosfolípido hidroperóxido glutación peroxidasa 4 (PHGPx4), incorpora cisteína en su sitio catalítico en vez de selenio. Estas isoenzimas se distribuyen ampliamente en los compartimientos subcelulares, así como también en los diferentes tejidos; como es el caso de GPx1 que se localiza en el citosol, el núcleo y la mitocondria; además se encuentra en los glóbulos rojos, hígado, pulmón y riñón; la isoenzima GPx2 se localiza en el citosol y núcleo, y está distribuido en el tracto gastrointestinal; mientras que GPx3 es una proteína secretada que se localiza también en el citosol, además está presente en plasma, así como en diferentes tejidos tales como riñón, pulmón, epidídimo, conducto deferente, placenta, vesícula seminal, corazón y músculo [38, 39]; GPx1 y GPx3 se expresan también en tejido adiposo [37]; el GPx4 fosfolipídico (PHGPx4), se localiza en el citosol, el núcleo, la mitocondria, está unido a las membranas y además está presente en el desarrollo de las glándulas mamarias [38]. GPx4 tiene un papel importante en las células de cáncer de mama, ya que cumple la importante función de combatir el estrés oxidativo generado por el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados [40]. Además, GPx4 puede actuar con sustratos lipofílicos tales como fosfolípidos peroxidados y colesterol reduciéndolos a compuestos de hidróxido [38, 39].

1.3.4. Glutación reductasa (GSR)

La glutatión reductasa es una flavoproteína homodimérica que cataliza la reacción que transforma el glutatión oxidado (GSSG) a su forma reducida (GSH), a expensas de la donación de equivalentes reductores por parte de la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) (reacción 8), y de esta manera se mantienen elevados los niveles de GSH para proteger a las células del daño oxidativo y procesos de envejecimiento [41, 42] (**Figura 2**).



1.3.5. Sistema Tiorredoxina

Es un sistema oxidorreductasa ubicuo con función antioxidante y de regulación redox. Este sistema, se compone de las proteínas tiorredoxina (TXN) y tiorredoxina reductasa (TXNRD1), además de la enzima NADPH. La TXN es una proteína que se encuentra en el citoplasma y es responsable de mantener las proteínas en su estado reducido [43]. Para la actividad redox de TXN, son claves los residuos de cisteína en la posición 32 y 35 (Cis32 y Cis35), separados por dos aminoácidos (Gli-Pro). A través de TXNRD1, una oxidorreductasa dependiente de NADPH se transfieren los electrones al sitio activo de la TXN oxidada (disulfuro -S₂) y ésta se reduce (ditiol [-(SH)₂]). Luego se transfieren los equivalentes reductores a los grupos disulfuro de las proteínas diana y la TXN se oxida de nuevo [44, 45] (**Figura 2**). Como parte de la función de defensa antioxidante, el incremento en la expresión de TXN es indicativo de la reducción de proteínas intracelulares y otras biomoléculas. Las proteínas diana sobre las que actúa tiorredoxina son los factores de transcripción p53 y NF-kB, además la ribonucleótido reductasa y la proteína disulfuro isomerasa. El H₂O₂ y los lipoperóxidos pueden ser reducidos directamente por TXNRD1 como vía enzimática alternativa a GPx4 [44].

1.3.6. Mecanismos moleculares de la vía Keap1/NFE2L2. Keap1 como regulador del factor de transcripción NFE2L2.

Keap1 es un regulador negativo de NFE2L2, siendo considerado al complejo Keap1/NFE2L2 como el sensor central de estrés oxidativo en la célula, el cual media las señales de estrés oxidativo e induce la expresión de las proteínas antioxidantes y enzimas de fase II [46]. En condiciones normales (ausencia de estrés), NFE2L2 es retenido y regulado por Keap1 en el citoplasma, donde NFE2L2 es ubiquitinado por el complejo Cul3-Keap1 ubiquitin ligasa, por lo que NFE2L2 es degradado rápidamente por el proteosoma [46-48], ver **Figura 2**. La alteración del estado redox, la presencia de estrés oxidativo o electrofílico, e incluso la presencia de antioxidantes inician el proceso por el que Keap1 libera a NFE2L2, el cual migra al núcleo [46, 48]. Una vez en el núcleo, NFE2L2 se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés) y activa la transcripción de genes que controlan la expresión de proteínas antioxidantes encargadas de la detoxificación y eliminación de ROS y electrolitos [47, 48]. Los genes con función antioxidante, cuya expresión es inducida por la vía transcripcional NFE2L2-ARE incluyen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD1 y SOD2), catalasa [27], glutatión peroxidasa (GPx1, GPx3 y GPx1), tioredoxina (*TXN*) y tioredoxina reductase 1 (*TXNRD1*) [49]. Por lo tanto, la activación de NFE2L2 es esencial para una adecuada respuesta al estrés oxidativo.

El estrés oxidativo produce daño al ADN y neoplasia debido al incremento en la producción de oxígeno reactivo y especies tior que interactúan con moléculas intracelulares [50]. Para contrarrestar la agresión oxidativa, las células también inducen la expresión de enzimas de fase I y fase II, las cuales reducen los electrolitos reactivos y detoxifican de agentes carcinógenos. La regulación de estas enzimas es mediada por el elemento de respuesta antioxidante (ARE), el cual requiere el factor de transcripción NFE2L2 para responder al estrés oxidativo [47, 51]. Las enzimas de fase I están encargadas del metabolismo de fármacos. El fármaco es activado o inactivado por uno de los tres tipos de modificaciones

químicas irreversibles, tales como la oxidación (xantina oxidasa, citocromo P-450, flavina monooxigenasa, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa), reducción (citocromo P-450), o hidrólisis (esterasa y amidasa) [52]. Las enzimas de fase II son la glutatión S-transferasa (GSTP1) que conjuga electrófilos hidrofóbicos con ROS y RNS con GSH; la flavoproteína NADPH: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) que reduce quinonas con dos electrones promoviendo su detoxificación; y hemo oxygenasa 1 que participa en el catabolismo de los grupo hemo [46].

En condiciones normales, la vía transcripcional NFE2L2-ARE son responsables de la expresión constitutiva de genes en estado basal para mantener la homeostasis redox celular debido a la constante generación de ROS por el metabolismo aeróbico [48].

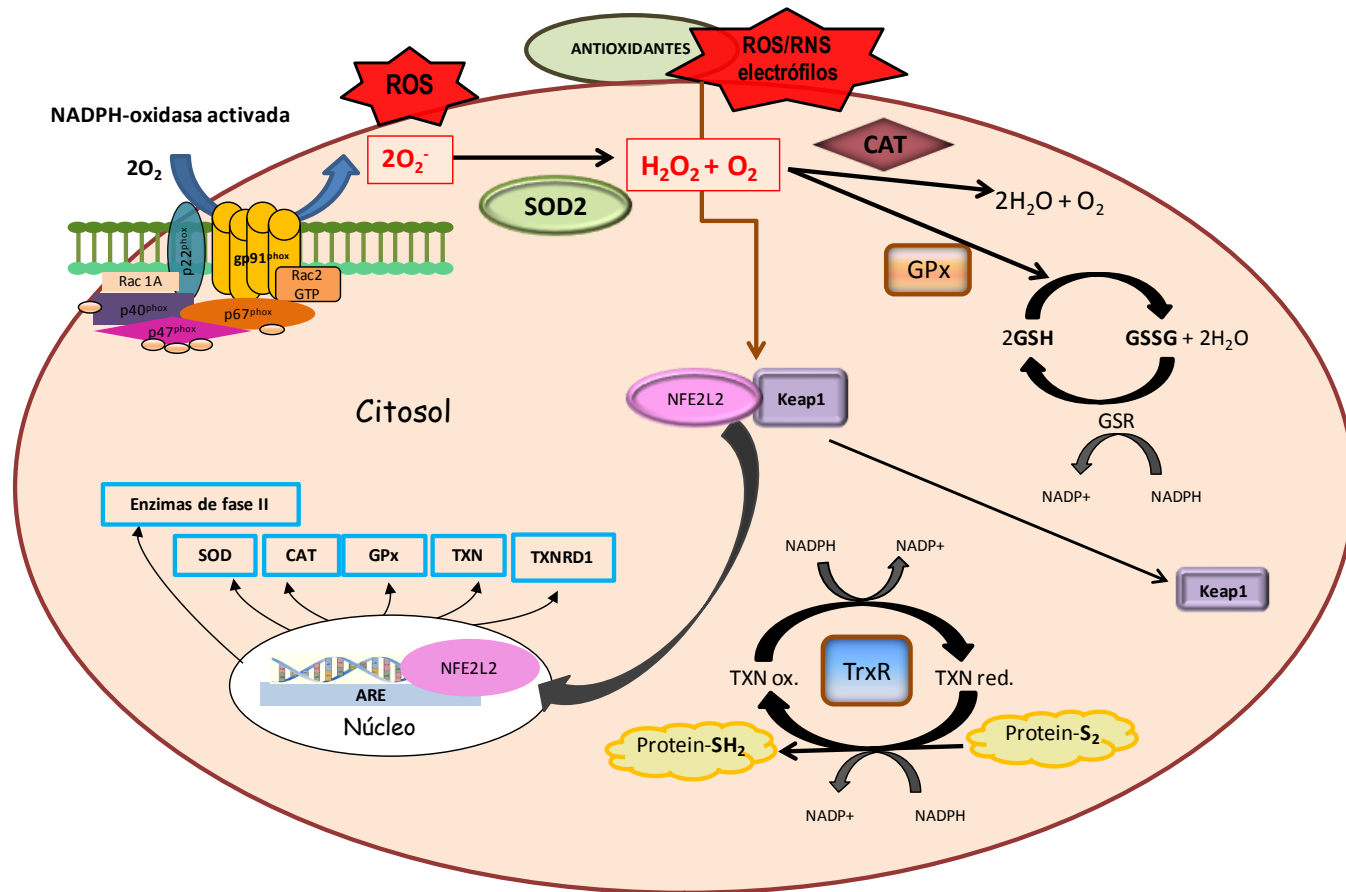


Figura 2. Representación esquemática del sistema de defensa antioxidante de la célula ante un estímulo.

1.3.7. Antioxidantes ingeridos en la dieta

Los antioxidantes exógenos, es decir, los aportados por los nutrientes de la dieta, ayudan a reducir los efectos adversos de las especies reactivas en el organismo. Son clásicamente conocidas las propiedades antioxidantes de las vitaminas E y C, así como también algunos fitoquímicos como los carotenoides, polifenoles y flavonoides, además de los minerales selenio y cinc. En este apartado, nos centraremos en los antioxidantes comúnmente aportados por la dieta mediterránea.

La vitamina E, es un antioxidante liposoluble muy importante en el sistema de defensa antioxidante de la célula, el cual se obtiene de la dieta. Las fuentes de vitamina E son los aceites vegetales, cereales, legumbres, frutos secos y productos de origen animal (pescado, carne, leche y huevo), y además es frecuente encontrarla en alimentos procesados utilizados generalmente para proteger de la oxidación a las grasas insaturadas del alimento. La vitamina E estabiliza la membrana y previene su oxidación, inhibe la peroxidación de lípidos y la oxidación de colesterol-LDL [34]. Su ingesta está implicada en la prevención de enfermedad cardiovascular [34], así como en la preeclampsia, sin embargo se recomienda su consumo controlado durante el embarazo [53].

Otra de las vitaminas con función antioxidante es la vitamina C o ácido ascórbico, la cual es hidrosoluble y actúa como agente reductor (donador de electrones). El ácido ascórbico protege al colesterol-LDL de la oxidación *ex vivo* y se cree que podría funcionar de manera similar en nuestro organismo. La vitamina C promueve la absorción de hierro soluble no-hemo posiblemente por quelación o manteniendo simplemente el hierro en su forma reducida (Fe^{2+}). Las frutas y vegetales son fuente excelente de ácido ascórbico, particularmente las frutas cítricas y los zumos de ellas, además de otras frutas tales como melón, cerezas, kiwi, mango, papaya, fresa, tangelo, sandía y tomate. De entre los vegetales como fuente de vitamina C, podemos citar la col, brócoli, coles de Bruselas, brotes de

soja, coliflor, col rizada, pimientos rojos y verdes, guisantes, tomates y patatas [34].

Los carotenoides son un grupo de antioxidantes liposolubles que también protegen a los lípidos de la peroxidación. Estos carotenoides son el licopeno, α -caroteno, β -caroteno, luteína, etc. Y los podemos encontrar en frutas y vegetales de color rojo y naranja, tales como las zanahorias, albaricoques, ciruelas y vegetales de hojas verdes como la espinaca y la col rizada [34, 54].

Los compuestos fenólicos donan el hidrógeno del grupo hidroxilo (-OH) a las especies reactivas, las cuales se convierten en no reactivas. Donando el hidrógeno, el compuesto fenólico se convierte en un radical libre no reactivo debido al electrón desapareado del átomo de oxígeno trasladado de la estructura de anillo aromático, aumentando así su estabilidad [34, 55]. Los compuestos fenólicos del vino incluyen los ácidos fenólicos, quercetina, catequinas y resveratrol [55], con propiedades antioxidantes. [56]. Por otro lado, los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son hidroxitirosol, tirosol y la oleuropeina. Es importante destacar que el aceite de oliva representa la principal fuente de grasa de la Dieta Mediterránea y aporta importantes beneficios para la salud [57, 58].

Los minerales selenio y cinc están implicados en la protección del organismo contra el estrés oxidativo. El selenio forma parte de enzimas antioxidantes como la TXNRD1 y GPxs. El selenio se distribuye ampliamente en los grupos de alimentos como los pescados de mar y de agua dulce, carne, huevos, cereales, productos lácteos, frutas y vegetales. El cinc forma parte de enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, además se encuentra combinado con cobre o magnesio en la isoforma SOD citoplasmática o mitocondrial, respectivamente encargada de la dismutación de O_2^- . La carne magra, cereales de grano entero y las leguminosas proveen altas concentraciones de cinc [34].

Se han demostrado que la escasa incidencia de arterosclerosis, enfermedad cardiovascular y ciertos tipos de cáncer son posiblemente debido al valor antioxidante de la dieta mediterránea, la cual es rica en vegetales, cereales, frutas, pescado, leche, vino y sobretodo aceite de oliva, que es la principal fuente de grasa de la dieta mediterránea.

La Dieta Mediterránea, por lo tanto reúne todas las características de una “dieta antioxidante”.

2. SÍNDROME METABÓLICO

2.1. Definición

Según la definición de la ATP III (National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III) el Síndrome Metabólico (SMet) es un conjunto de desórdenes metabólicos y vasculares que incrementan la posibilidad de sufrir enfermedad cardiovascular y diabetes mellitus tipo 2 [59-61].

Los componentes del SMet identificados por la ATP III incluyen:

Obesidad abdominal

La grasa abdominal es un tejido heterogéneo que se compone de varios compartimientos que incluyen la grasa subcutánea, intraperitoneal (visceral) y retroperitoneal. La circunferencia de cintura utilizada como marcador de grasa abdominal, se correlaciona con la grasa abdominal total determinada por tomografía computarizada [62]. La obesidad abdominal se define por el aumento del perímetro de cintura. En hombres, se considera obesidad abdominal cuando el perímetro de la cintura supera los 102 cm y en mujeres cuando supera los 88 cm. Las consecuencias fisiopatológicas de la obesidad abdominal radican en el hecho de que la expansión del tejido adiposo y la disfunción del adipocito provocan alteraciones en la secreción de adipocinas y citoquinas, las cuales contribuyen al desarrollo de resistencia a la insulina y SMet [63-66].

Dislipidemia aterogénica

Se manifiesta por los elevados niveles plasmáticos de triglicéridos (≥ 150 mg/dL) y bajas concentraciones de colesterol-HDL (< 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres). Los triglicéridos elevados y las concentraciones bajas de HDL están relacionados de forma independiente con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Además, se considera que los factores genéticos y ambientales son los responsables de las bajas concentraciones de colesterol-HDL y de los triglicéridos aumentados [59-61, 67, 68].

Hipertensión arterial

La hipertensión arterial es la fuerza que la sangre ejerce contra las paredes de las arterias, la cual es lo suficientemente alta, como para llegar a causar problemas de salud, tales como enfermedades cardiovasculares. Según criterios de la ATP III para el diagnóstico del SMet, una presión arterial mayor a 130/85 mm de Hg es considerada hipertensión [59]. La razón por la que la hipertensión arterial está incluida entre los criterios diagnósticos del SMet, es debido a que la reducción de la presión sanguínea por debajo de 130/85 reduce la probabilidad de un evento cardiovascular en pacientes diabéticos o con otros factores de riesgo cardiovascular [59-61, 67, 68].

Niveles de glucosa elevados en sangre

La glucosa medida en ayunas con un valor ≥ 110 mg/dL por lo general es un indicador de resistencia a la insulina, y a menudo está acompañada por otros componentes del SMet. Además, un porcentaje de las personas con glucemia basal alterada desarrollará la diabetes tipo 2 con el tiempo [59-61, 67-69].

Aunque, el panel ATP III no considera adecuada la determinación rutinaria de la resistencia a la insulina y el estado pro-inflamatorio o protrombótico para el diagnóstico del SMet, éstos generalmente son aceptados como características presentes en este síndrome. Por otra parte, ensayos clínicos demuestran que la modificación de tres de los componentes característicos del SMet, tales como dislipidemia aterogénica, hipertensión y estado protrombótico, reduce el riesgo de enfermedad cardiovascular [59].

2.2. Criterios diagnósticos

Los criterios diagnósticos han cambiado durante la última década. En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoció la resistencia a la insulina como la principal causa de SMet [70]. Más tarde, se observó el papel crítico de la obesidad abdominal, la cual es considerada como uno de los más importantes entre los criterios diagnósticos establecidos desde el año 2001 por la

ATP III, los cuales están representados en la **Tabla 2** [59, 69]. Cabe destacar, que en la mayoría de los estudios epidemiológicos se utilizan los criterios de la ATP III. Por otra parte, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) y la declaración científica de la Asociación Americana del Corazón/Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (AHA/NHLBI), no llegaban a un acuerdo respecto a la circunferencia de cintura.

En 2009 fue publicada en una declaración provisional conjunta en el que participaron diferentes organismos tales como la “Federación Internacional de Diabetes. Grupo de Trabajo sobre Epidemiología y Prevención”, el “Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre”, la “Asociación Americana del Corazón”, la “Federación Mundial del Corazón”, la “Sociedad Internacional de Arteriosclerosis” y la “Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad”, donde básicamente el documento armoniza los criterios diagnósticos del SMet de la IDF y se reflejan en la **Tabla 2**. En el documento de la IDF se establecen varios puntos de corte para la circunferencia de cintura según la población de estudio (**Tabla 3**) [60].

La presencia de tres de los cinco componentes del SMet, definidos por la ATPIII constituye un diagnóstico de Síndrome Metabólico [60, 69]. La inactividad física, la obesidad y las dietas hipercalóricas ricas en ácidos grasos saturados y colesterol, así como el tabaquismo le preceden a los factores de riesgo citados anteriormente [61, 68].

Tabla 2. Criterios diagnósticos para el Síndrome Metabólico. La presencia de 3 de los 5 criterios diagnósticos de la ATPIII o IDF constituye un diagnóstico de Síndrome Metabólico.

Medición	WHO (1998)	ATPIII (2001)	IDF (2005)
Clínica			
Resistencia a la Insulina	IG/IGA/DMT2/ sensibilidad a la glucosa disminuida	-	-
Circunferencia de cintura	IMC >30 kg/m ² ICC: hombres >0,90 y mujeres >0,85	CC: hombre ≥102 cm y mujeres ≥88 cm	Específica según la población (Tabla 3)
Lipemia	TG ≥150 mg/dL y/o c-HDL <35 mg/dL en hombres y <39 mg/dL en mujeres	TG ≥150 mg/dL c-HDL <40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres	TG ≥150 mg/dL c-HDL <40 mg/dL en hombres y <50 mg/dL en mujeres (incluye medicación)
Presión arterial	≥140/90 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg (incluye medicación antihipertensiva)
Glucosa	IG/IGA, o DMT2	≥110 mg/d L (incluye diabetes)	≥100 mg/d L (incluye tto. hipoglucemiante)
Otros	Microalbuminuria		

DMT2: Diabetes Mellitus Tipo 2.

IG: Intolerancia a la glucosa.

IGA: Glucosa alterada en ayunas.

IMC: Índice de masa corporal.

ICC, Índice cintura/cadera.

CC: Circunferencia de Cintura.

TG: Triglicéridos.

c-HDL: Lipoproteína de alta densidad.

Tabla 3. Puntos de corte para la circunferencia de cintura según el tipo de población [60].

Población	Circunferencia de cintura. Umbral para la obesidad abdominal	
	Hombres	Mujeres
Origen Europeo	≥94 cm	≥80 cm
Caucásico	≥94 cm (riesgo alto)	≥80 cm (riesgo aumentado)
	≥102 cm (riesgo muy alto)	≥88 cm (riesgo muy alto)
Estados Unidos	≥102 cm	≥88 cm
Canadá	≥102 cm	≥88 cm
Europa	≥102 cm	≥88 cm
Asia (incluyendo Japón)	≥90 cm	≥80 cm
Asiáticos	≥90 cm	≥80 cm
Japoneses	≥85 cm	≥90 cm
China	≥85 cm	≥90 cm
Oriente Medio, Mediterráneo	≥94 cm	≥80 cm
Africanos Sub-Saharianos	≥94 cm	≥80 cm
Centro y Sur de América	≥90 cm	≥80 cm

2.3. Epidemiología

El SMet es un problema de salud pública relacionado estrechamente con el estilo de vida occidental [67].

Los principales factores de riesgo de mortalidad en el mundo son los componentes del SMet, entre los que se incluyen la hipertensión, responsable del 13% de muertes en el mundo, la hiperglucemia responsable del 6%, la inactividad física 6%, y el sobrepeso y la obesidad responsables del 5% de las muertes en el mundo [71]. Cabe destacar, que a nivel mundial, el sobrepeso y la obesidad causan más muertes que la desnutrición [71], lo que puede deberse a los cambios que ha sufrido el estilo de vida respecto a la dieta y a la inactividad física. La OMS estima que en 2005 había más de 1 millón de personas con sobrepeso ($IMC \geq 25$) y más de 300 millones de obesos ($IMC \geq 30$). Según fuentes de la OMS, se espera que para el 2015 tengamos en el mundo 1,5 millones de personas con sobrepeso [71].

Entre los criterios diagnósticos para el desarrollo del SMet, publicado en el documento World Health Statistic 2012 de la OMS, se destaca la alta prevalencia de hipertensión en hombres y mujeres africanos (38,1% y 35,5%, respectivamente), mientras que entre los americanos la prevalencia en hombres es de 26,3% y en mujeres es 19,7% y en los europeos 33,1% y 25,6%, respectivamente. El documento de la OMS también señala una alta prevalencia de hiperglucemia en hombres americanos (11,5%) a diferencia de los hombres africanos (8,3%), europeos (9,6%) y asiáticos (9,9%) [72].

La prevalencia de SMet aumenta con la edad en la población mundial [67]. En Europa, la prevalencia de SMet en hombres de 20-39 años es del 10,7%, 33% entre los 40-59 años y 39,7% en mayores de 60 años, mientras que en mujeres es de 18%, 30,6% y 46,1%, respectivamente [73]. En un estudio comparativo de pacientes con o sin cardiopatía isquémica, el 41,1% de los pacientes que habían sufrido un infarto de miocardio, se les había diagnosticado SMet antes del evento cardiovascular [74].

Datos aportados por la Encuesta Nutricional de Canarias, que incluyó 578 adultos con edades entre 18 y 74 años, demostró que la prevalencia de SMet en hombres y mujeres es del 24,4% [75].

El Registro Nacional de SMet (Registro MESYAS: Metabolic Syndrome in Active Subjects) analizó una amplia muestra española [76], en la cual se incluyeron personas laboralmente activas. En los primeros resultados se observó que, entre los 7.256 trabajadores incluidos en el estudio en aquel momento, la prevalencia de SMet era del 10,2%, superior en varones (8,7%) que en mujeres (3,0%). Además, se concluyó que todos los componentes del SMet son significativamente más prevalentes en los varones, excepto el criterio de valores bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), que es prevalente en las mujeres. La prevalencia del SMet aumenta de forma paralela a la edad; por debajo de los 60 años es más prevalente en los varones, diferencia que no se observa por encima de esta edad [76].

En cuanto a los países en vías de desarrollo, la prevalencia del SMet en China es del 13,3%, en Irán del 30% y en México del 22% [77]. La prevalencia de SMet en países de América Latina es del 24,9%, más frecuente en mujeres (25,3%) que en hombres (23,2%). El grupo de edad más afectado es el de los mayores de 50 años y los componentes del SMet más frecuentes fueron los niveles bajos de colesterol-HDL (62,9%) y la obesidad abdominal (45,8%) [78].

En la era de la globalización, los cambios que se han producido en cuanto al tipo de trabajo, transporte, ocio, alimentación y desarrollo económico han promovido el sedentarismo y por consiguiente el sobrepeso y la obesidad. Es importante, y urgente, establecer estrategias sanitarias que prevengan la emergente epidemia mundial de SMet. Además se deben reducir los riesgos de enfermedad cardiovascular y diabetes con cambios en el estilo de vida, como aumento de la actividad física o pérdida de peso, a fin de reducir los índices de fallecimiento y discapacidad en países en vías de desarrollo como consecuencia del SMet [72, 77].

2.4. Etiología y patogénesis

La etiología del SMet es en gran medida desconocida, aunque probablemente sea la consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales, de entre los cuales, destaca la dieta y sobretodo el tipo de grasa [69, 79]. Algunas personas están genéticamente predispuestas a desarrollar desórdenes metabólicos, y en éstas personas, los factores adquiridos por el ambiente (inactividad física y exceso de grasa corporal) favorecen por consiguiente, el desarrollo de resistencia a la insulina y síndrome metabólico [59].

La obesidad juega un papel central y causal en el síndrome metabólico [80-82]. La interacción entre los genes y el ambiente nos hace pensar que el desarrollo del Síndrome Metabólico es el resultado de un desequilibrio entre la información genética de supervivencia de nuestros antepasados y la influencia del estilo de vida actual caracterizada por la escasa actividad física y una alimentación hipercalórica. Esta interacción genes-ambiente pueden ser aclaradas por dos

hipótesis: la del “*genotipo ahorrador*” y la del “*fenotipo ahorrador*” que se explican a continuación.

La “*hipótesis del genotipo ahorrador*” explica el mecanismo como una rápida y masiva liberación de insulina después de una comida abundante, que minimizaba la hiperglucemia y la glucosuria, permitiendo de ese modo un mayor depósito de energía. De esa manera, aquellos individuos capaces de almacenar más energía estaban mejor preparados para sobrevivir en los períodos de escasez. Por lo tanto, los individuos portadores de estos genes "ahorradores" tenían ventajas selectivas en cuanto a adaptación, y además los transmitían a su descendencia. Actualmente, y dado que los genes no cambian con rapidez, estos genes “ahorradores” representan una desventaja y, de él derivan las enfermedades metabólicas crónicas como la diabetes tipo 2, la obesidad abdominal, las enfermedades cardiovasculares, etc. Todo esto, como consecuencia de la disponibilidad continua y excesiva de todo tipo de alimentos en la actualidad [67, 83].

Por su parte, la “*hipótesis del fenotipo ahorrador*” o teoría de Barker propone que si un feto crece en condiciones de malnutrición, resulta en el desarrollo de adaptaciones que producen cambios estructurales, fisiológicos y metabólicos para maximizar las oportunidades de supervivencia postnatal en condiciones de escasez de alimentos. Si este individuo recibe una alimentación normal o excesiva en el periodo postnatal, esas adaptaciones van en detrimento de la salud del individuo a lo largo de su vida predisponiéndolo a cambios en el metabolismo de la glucosa/insulina desarrollando posteriormente diabetes tipo 2 y Síndrome Metabólico en la edad adulta [67, 84].

Los modelos dietéticos actuales en todo el mundo están dejando de lado la cultura culinaria autóctona y adoptan patrones occidentales con un aumento en el consumo de carnes, productos lácteos enteros y pastelería industrial, que son alimentos ricos en grasas saturadas y azúcares simples. La mayoría de las recomendaciones dietéticas para la prevención y el tratamiento de enfermedades

cardiovasculares, obesidad, y/o diabetes residen en la reducción de la ingesta de ácidos grasos saturados con el objetivo de disminuir los niveles de colesterol-LDL y triglicéridos. En ambas hipótesis, la dieta, como factor ambiental, desempeña un importante papel en la etiología del SMet.

Varios son los componentes de la dieta que se han relacionado con el riesgo de desarrollar SMet, en particular la cantidad y el tipo de grasa de la dieta [85].

De entre los factores que contribuyen al desarrollo del SMet, los hábitos dietéticos juegan un papel primordial. En 2006 la Asociación Americana del Corazón (AHA) publica las “Recomendaciones sobre dieta y estilo de vida” como un guía para reducir el riesgo de SMet, donde recomiendan limitar el consumo de grasa saturada por debajo del 7% del valor calórico total (VCT), las grasas *trans* <1% VCT y el colesterol <300mg/día optando siempre por carne magra, productos lácteos semidesnatados o desnatados, minimizando el consumo de bebidas o alimentos con azúcares añadidos, limitando el consumo de sal, consumo moderado de alcohol, y aconsejando una dieta rica en frutas y vegetales, alimentos ricos en fibra y granos enteros, y consumo de pescado graso al menos dos veces por semana [86]. Básicamente, estas recomendaciones son características de una dieta baja en grasa y alta en hidratos de carbono complejos; recomendaciones que difieren ligeramente del estilo de dieta Mediterránea con respecto la cantidad de grasa recomendada, pero concuerda con la calidad de las demás características.

El principal aporte de grasa en la dieta Mediterránea proviene del aceite de oliva, que es una fuente de ácidos grasos monoinsaturados y compuestos fenólicos por excelencia [87, 88]. El consumo de aceite de oliva mejora los parámetros característicos del SMet, como la reducción en las concentraciones de triglicéridos y aumento en las concentraciones de colesterol-HDL, atribuyendo al aceite de oliva, efectos cardioprotectores [87-90].

Los efectos provocados tras el consumo de ácidos grasos monoinsaturados y saturados sobre la lipemia postprandial difieren bastante [90, 91]. El consumo de

ácidos grasos saturados supone un factor de riesgo para el desarrollo de SMet [92, 93]. Además, la adherencia a la dieta Mediterránea parece estar disminuyendo en personas con sobrepeso y obesidad, fenómeno que se asocia con un aumento en la prevalencia del SMet [89]. Por otra parte, las evidencias demuestran que el consumo de dietas ricas en grasa monoinsaturada y ricas en hidratos de carbono, mejoran la sensibilidad a la insulina, mientras que el consumo de ácidos grasos saturados induce un deterioro de la misma [94, 95].

La disminución de la sensibilidad a la insulina, es también un factor clave en el desarrollo del SMet [85]. La resistencia a la insulina y la disminución en la secreción de insulina son trastornos metabólicos que generan hiperglucemia y aumento de las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados que pueden causar lesión en las células β y los tejidos periféricos deteriorando su función. A su vez, la resistencia a la insulina se relaciona con el estado inflamatorio de bajo grado y un aumento del estrés oxidativo, ambos característicos del SMet [67].

La reducción en la ingesta de ácidos grasos saturados debe evaluarse en el contexto de la sustitución por otro macronutriente. Por lo tanto, la sustitución de las grasas saturadas por grasas monoinsaturadas en la dieta puede ser una estrategia eficaz para reducir el estrés oxidativo en pacientes con obesidad y síndrome metabólico, así como prevenir la aparición de los factores de riesgo tales como niveles alterados de triglicéridos, LDL-colesterol, glucosa, HDL-colesterol, además obesidad abdominal, procesos inflamatorios y pro-trombóticos.

Se ha considerado reemplazar la grasa saturada por una dieta rica en hidratos de carbono, pero esto depende del tipo de carbohidratos y su índice glucémico. En particular, los carbohidratos refinados aumentan de manera exagerada la dislipidemia aterogénica en asociación con resistencia a la insulina y obesidad, así como también incrementan los triglicéridos y partículas LDL pequeñas, además reducen el colesterol-HDL, por lo tanto se enfatiza limitar el consumo de hidratos de carbono refinados [93]. Por otra parte, una dieta rica en

hidratos de carbono complejos administrados en forma de arroz con contenido de almidón resistente, se asocia con una mejoría en la función endotelial, reducción de glucosa y estrés oxidativo postprandial en pacientes con alteración de la glucosa en ayunas, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2 recién diagnosticada [96].

Por lo tanto, modificar los patrones dietéticos en pro de nuestros genes sería una estrategia eficaz en la prevención y tratamiento del síndrome metabólico, siguiendo lineamientos tales como, limitar la ingesta de grasas saturadas, aumentar la ingesta de alimentos con alto contenido en fibra y bajo índice glucémico. Además, de permitir cantidades moderadas de grasas monoinsaturadas a expensas de aceite de oliva, ya que sus efectos cardioprotectores son más que conocidos, esto siempre y cuando no se exceda su consumo pues puede promoverse el sobrepeso.

2.5. Síndrome Metabólico y disfunción del tejido adiposo, inflamación de bajo grado y estrés oxidativo

El tejido adiposo está compuesto por células adiposas incrustadas en una malla de tejido conectivo laxo que está constituido principalmente por adipocitos, y fracción del estroma vascular que incluye fibroblastos, macrófagos, monocitos, células sanguíneas, células endoteliales y pre-adipocitos [63]. Anteriormente se pensaba que el tejido adiposo sólo tenía la función de almacenar energía en forma de triglicéridos, diacilglicelores, fosfolípidos, ácidos grasos no esterificados y colesterol, los cuales son movilizados y liberados cuando el gasto energético sobrepasaba la ingesta. Actualmente, se sabe que el tejido adiposo es además, un órgano endócrino innervado y vascularizado, que regula el metabolismo energético y que libera moléculas señal llamadas adipocinas.

Los adipocitos se originan por diferenciación a partir de células madre pluripotenciales de origen mesenquimal. Estos adipoblastos originan los pre-adipocitos, los cuales acumulan una importante cantidad de lípidos y además expresan prematuramente marcadores de células adiposas [97, 98]. En la última

etapa embrionaria, los pre-adipocitos se convierten a adipocitos [98], cuyo desarrollo está mediado por una serie de señalizaciones y factores de transcripción, que convergen en la sobreexpresión de C/EBP (proteínas potenciadoras de unión CCAAT) y PPAR γ (receptor activado proliferador del peroxisoma) implicados en la lipogénesis, así como también la hipertrofia del adipocito [65, 98].

La propiedad para almacenar lípidos está determinada por la capacidad de expansión del tejido adiposo, hiperplasia e hipertrofia. En periodos de crecimiento, el tejido adiposo se hiperplasia (aumenta el número de adipocitos), en cambio, en la edad adulta la capacidad de los pre-adipocitos para diferenciarse en adipocitos maduros declina y predomina la hipertrofia (adipocito aumenta de tamaño) [65, 98]. La lipogénesis es la síntesis de ácidos grasos esterificados que forman triglicéridos [83] a partir de carbohidratos u otras fuentes de energía aportadas por la dieta y tiene lugar predominantemente en el hígado y en menor proporción en el tejido adiposo. La síntesis lipídica está aumentada en estado postprandial y tras el consumo de carbohidratos debido a la secreción de insulina, y es inhibida en condiciones de ayuno. Varias son las enzimas involucradas en la lipogénesis que están inducidas por la insulina [65]. La insulina y los glucocorticoides inducen la sobreexpresión tanto de C/EBP como de PPAR γ , mientras que éstos por el contrario son reprimidos por TNF α [65, 97]. SREBP1 es un factor de transcripción involucrado en el metabolismo de ácidos grasos y colesterol, además modula la lipogénesis estimulando la expresión de PPAR γ [65, 98].

Por otra parte, en la lipólisis se hidrolizan los TG almacenados en la gota lipídica mediante la lipasa triglicérido adiposa (ATGL) que libera diacilglicerol y ácidos grasos en caso de demanda de energía. Durante el ayuno, el glucagón y las catecolaminas estimulan la lipólisis mediante la activación de la PKA (proteína quinasa A) lo que resulta en la movilización de ácidos grasos libres desde el adipocito a la circulación, unidos a la albúmina y transportados al músculo, hígado, corazón, y otros tejidos para su oxidación o reesterificación [98]. En la obesidad, la liberación excesiva de ácidos grasos del tejido adiposo incrementa su

acumulación en musculo e hígado contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina [62].

Existen dos tipos de tejido adiposo, en función de su estructura celular, localización, color, vascularización y función. Estos son, el tejido adiposo blanco [99] y el tejido adiposo marrón (WAT y BAT, respectivamente por su siglas en inglés) [62]. El WAT almacena energía en forma de TGs en una gota lipídica del adipocito, mientras que el tejido adiposo marrón los almacena en adipocitos multiloculares (adipocitos con varias gotas lipídicas). El BAT posee una gran cantidad de mitocondrias que expresan grandes cantidades de UCO-1 (proteína de desacoplamiento 1) que es responsable de regular el proceso termogénico mediante la oxidación de ácidos grasos dentro del adipocito [65, 98].

La localización del tejido adiposo explica sus diferentes funciones. El tejido adiposo subcutáneo como su nombre lo indica, se localiza debajo de la piel y tiene la función de aislamiento térmico. Además, cuando existe demanda energética, los ácidos grasos son movilizados principalmente del tejido adiposo subcutáneo, luego mesentérico y peritoneal [65, 98]. Por su parte, el tejido adiposo visceral llena los espacios entre los órganos y los mantiene en la posición apropiada. El exceso de masa grasa visceral, se asocia con la insulinoresistencia periférica y hepática, la dislipidemia, la intolerancia a la glucosa, la hipertensión, el estado hipercoagulable y el riesgo cardiovascular [65, 98].

Los adipocitos hipertrofiados-hiperplásicos muestran menor densidad de receptores de insulina y mayor expresión del receptor β -adrenérgico-3, lo que facilita el paso de los monocitos al estroma adiposo visceral, iniciando un ciclo pro-inflamatorio [64]. En el estado de inflamación crónica de bajo grado característico del SMet, el tejido adiposo se halla infiltrado de macrófagos, los cuales aumentan la producción de adipoquinas pro-inflamatorias [100], contribuyendo a la disfunción de dicho tejido [63, 97]. Por lo tanto, el SMet y sus consecuencias clínicas se relacionan con la secreción anormal de adipoquinas, hipertrofia del adipocito, liberación excesiva de ácidos grasos, la inflamación de

bajo grado y estrés oxidativo a consecuencia de la disfunción del tejido adiposo [64, 101].

Entre las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo, TNF- α e IL-6 tienen propiedades pro-inflamatorias y sus niveles se encuentran elevados en personas obesas. Por su parte, la pérdida de peso reduce la infiltración de macrófagos y por tanto la expresión de marcadores inflamatorios [100-102]. Los factores estimulantes de estas adipoquinas son los lipopolisacáridos (LPS), la insulina, el tamaño de los adipocitos per se y las catecolaminas [102]. Se ha demostrado que el TNF- α induce la resistencia a la insulina, reduciendo la expresión del transportador Glut-4 y la sensibilidad a la insulina, a la vez que estimula la expresión de la lipasa sensible a hormona (HSL) lo que incrementa la lipólisis [100, 102].

El TNF- α modula la enzima NADPH-oxidasa contribuyendo al incremento en la producción de ROS [103], y a su vez el TNF- α es modulado por la grasa de la dieta [104]. La producción de adipoquinas está alterada en la obesidad, la diabetes tipo 2 y el SMet [64]. Individuos con SMet, presentan una respuesta inflamatoria postprandial exacerbada, que parece ser independiente de la cantidad y tipo de grasa proveniente de la dieta [105].

El consumo de dietas con alto contenido en grasas puede alterar el metabolismo del oxígeno, debido a que los depósitos grasos tienden sufrir oxidación [5]. La oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma y la mitocondria, genera ROS [101], por lo tanto, si la producción de ROS excede la capacidad antioxidante, la peroxidación lipídica incrementa el estrés oxidativo, lo que podría contribuir al desarrollo de la aterosclerosis [5, 101].

Como ya se ha dicho en el apartado sobre “estrés oxidativo”, la producción de ROS en condiciones normales es fisiológica, pero también está involucrado en procesos fisiopatológicos como la obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular y procesos aterogénicos, en los que los niveles de ROS se incrementan [26, 105]. En modelos de ratones obesos-diabéticos y obesos-no

diabéticos, la actividad antioxidante se vio reducida, posiblemente debido a la obesidad per se [26].

Varios marcadores de daño oxidativo tales como malonaldeído (MDA), F-2 isoprostanos y la proteína C reactiva (PCR), se incrementan en personas obesas y se correlacionan directamente con el índice de masa corporal (IMC), el porcentaje de grasa corporal, la oxidación de las LDL y los niveles de TG [101].

Actualmente, la atención está centrada en el exceso de adiposidad abdominal, siendo éste uno de los componentes más importantes en el SMet [59]. De hecho, Furukawa y cols., señalan a la grasa acumulada como un importante mecanismo patogénico de la obesidad asociada al SMet, cuyo esquema se explica en la **Figura 3** [26]. En esta hipótesis, Furukawa propone que el incremento del estrés oxidativo generado en la grasa acumulada es consecuencia de la obesidad per se; debido al incremento de la NADPH-oxidasa y la disminución de los antioxidantes, y que como consecuencia, provocan la producción alterada de adipocinas, lo que conduce a un estrés oxidativo sistémico que ocasiona daños a otros órganos tales como, el hígado, el músculo esquelético y la aorta, lo que desencadena el desarrollo del SMet [26].

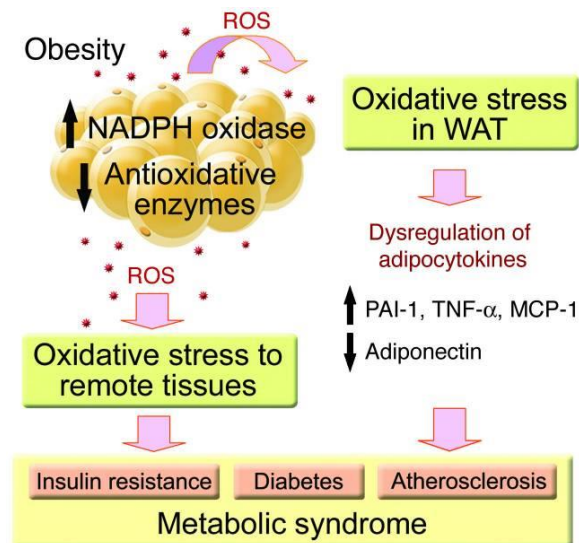


Figura 3. Esquema de la hipótesis de Furukawa sobre la función de las ROS en el SMet [26].

La dieta, en particular la cantidad y el tipo de grasa proveniente de ella, tiene la capacidad de modular la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con SMet [11, 104-106]. Ciertas modificaciones en la composición de la dieta, sumado a ejercicio regular mejoran notablemente la hipertensión, estrés oxidativo, la biodisponibilidad de NO y el perfil metabólico, mitigando de esta manera la progresión de la aterosclerosis [107].

Por lo tanto, las evidencias sugieren que una dieta saludable, reduce el estrés oxidativo en el SMet y sus manifestaciones clínicas (hipertensión, enfermedad cardiovascular y diabetes).

2.6. Síndrome Metabólico y co-morbilidades asociadas

Las complicaciones del SMet, van más allá de los componentes relacionados con el desarrollo del mismo. Las co-morbilidades que acompañan este síndrome conducen a desórdenes metabólicos en algunos casos irreversibles, así como también al deterioro de la calidad de vida del paciente que los padece.

2.6.1. Disfunción endotelial y aterosclerosis

El endotelio vascular, está compuesto por una capa unicelular que cubre la superficie interna de los vasos sanguíneos y conforma la pared de los capilares. Tiene funciones autócrinas/parácrinas que regulan la adhesión plaquetaria, la coagulación, el sistema fibrinolítico, el tono vascular y la interacción de la pared vascular con las células sanguíneas y macromoléculas circulantes. Estas funciones le confieren al endotelio la propiedad de mantener la homeostasis vascular [67, 108]. Cuando el endotelio pierde sus propiedades fisiológicas (vasodilatación, fibrinólisis y antiagregación), se vuelve vulnerable a la inflamación, vasoconstricción, e incrementos de la permeabilidad vascular, resultando en disfunción endotelial, condición en la que se promueve el crecimiento vascular anormal como desencadenante de la aterosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis [67, 108, 109] (**Figura 4**).

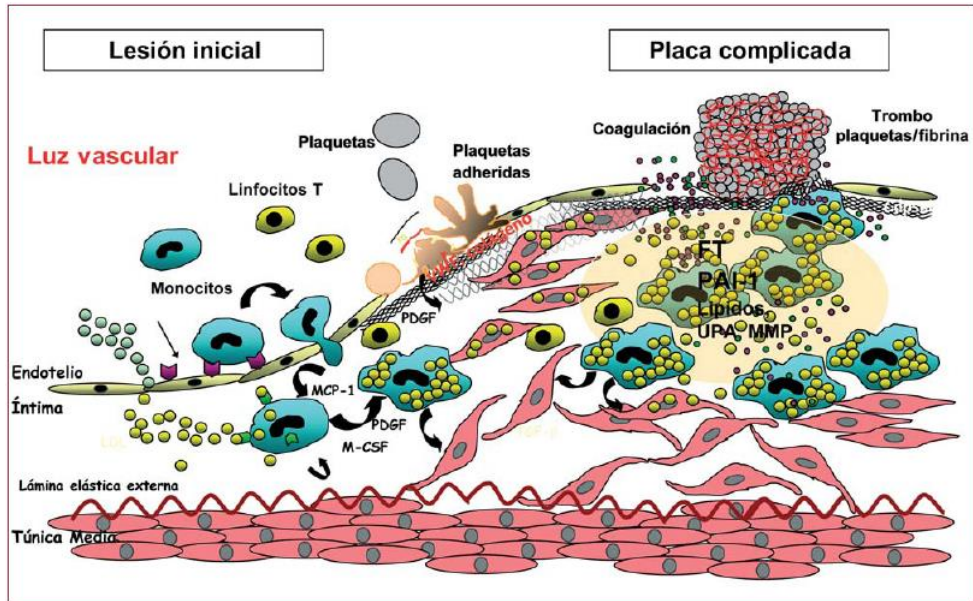


Figura 4. Representación esquemática del desarrollo de la aterosclerosis desde etapas iniciales de la disfunción endotelial a la formación de la placa de ateroma. MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos; PDGF: factor de crecimiento plaquetario; M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos; FT: factor tisular; PAI-1: inhibidor del plasminógeno tipo-1 activado; UPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; MMP: metaloproteinasas. Adaptado de Badimón L. et al. [110].

El óxido nítrico (NO) se sintetiza en el endotelio, y se le atribuye una propiedad ateroprotectora con funciones como vasodilatador, antiagregante plaquetario y antioxidante, entre otros. La alteración de la biodisponibilidad de NO en este proceso, podría deberse a su inadecuada producción, a su degradación y/o respuesta relacionada con la hipercolesterolemia, concentraciones elevadas de LDL y LDL-oxidada, condición que perturba la homeostasis vascular y potencia el desarrollo de la aterosclerosis [5, 108]. Existen evidencias sobre la inactivación del NO, por el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y otras ROS; en el caso de que NO reaccione con $O_2^{\cdot-}$ se forma el compuesto peroxinitrito (ONOO⁻) disminuyendo de esta forma la biodisponibilidad del NO, contribuyendo a la disfunción endotelial [111]. Pero, no sólo la falta de biodisponibilidad del NO altera la función endotelial, sino que todos los factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia, la diabetes, la hipertensión arterial, el tabaquismo, además de otros factores de riesgo

tales como ROS, homocisteína, infecciones, déficit de estrógeno, alteran la función endotelial [108].

En pacientes diabéticos, la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, la hipercolesterolemia y los ácidos grasos no esterificados (NEFAs) elevados, activan la NADPH-oxidasa [25] y se acelera el desarrollo de la aterosclerosis incrementando la producción de ROS y la permeabilidad endotelial a lipoproteínas aterogénicas [109].

Las ROS generadas por la NADPH-oxidasa son las encargadas de regular el tono vascular y la función endotelial de manera fisiológica, pero también de manera patológica, ya que esta enzima puede generar estrés oxidativo debido al aumento excesivo de ROS y consecuentemente provoca disfunción endotelial [25, 67]. La NADPH-oxidasa puede ser activada y regulada por agonistas de los receptores acoplados a proteínas G, tales como angiotensina II y endotelina I, además de factores de crecimiento como la trombina y el factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF), $\text{TNF}\alpha$, hiperglucemia, hiperinsulinemia, NEFAs elevados, lípidos oxidados, entre otros [25]. Por lo tanto, los niveles del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) generados por la NADPH-oxidasa que contribuyen a la disfunción vascular, están elevados en los vasos sanguíneos en condiciones fisiopatológicas tales como, hipertensión, aterosclerosis, diabetes, hiperhomocisteinemia, insuficiencia cardíaca, sepsis, hemorragia subaracnoidea, envejecimiento y Alzheimer [111].

La disfunción endotelial es suficiente para iniciar el proceso de aterosclerosis a través del incremento de la permeabilidad endotelial a las lipoproteínas aterogénicas (LDL modificada, LDL-oxidada, etc.) [5]. Los niveles elevados de colesterol-LDL, conocido factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular, estimulan la generación del anión superóxido por la NADPH-oxidasa, lo que contribuye a su vez a la oxidación de dichas lipoproteínas [25], acrecentando el poder aterogénico de éstas y promoviendo la adhesión celular de los monocitos a la pared vascular [112]. En el proceso de iniciación de la

aterosclerosis, las LDL pueden entrar y salir de la íntima, quedando atrapadas en la matriz mediante la unión a proteoglicanos (**Figura 5**). Una cantidad insuficiente de antioxidantes, hace que los lípidos y las LDL sean propensos a la oxidación mediante productos oxidantes derivados de células que residen en la pared del vaso. Así mismo, las LDL están sujetas también a los procesos de glicación, para formar las LDL-mínimamente modificadas (MM-LDL), que tras la posterior oxidación, con el tiempo se convierten en LDL oxidadas [113] (**Figura 5**).

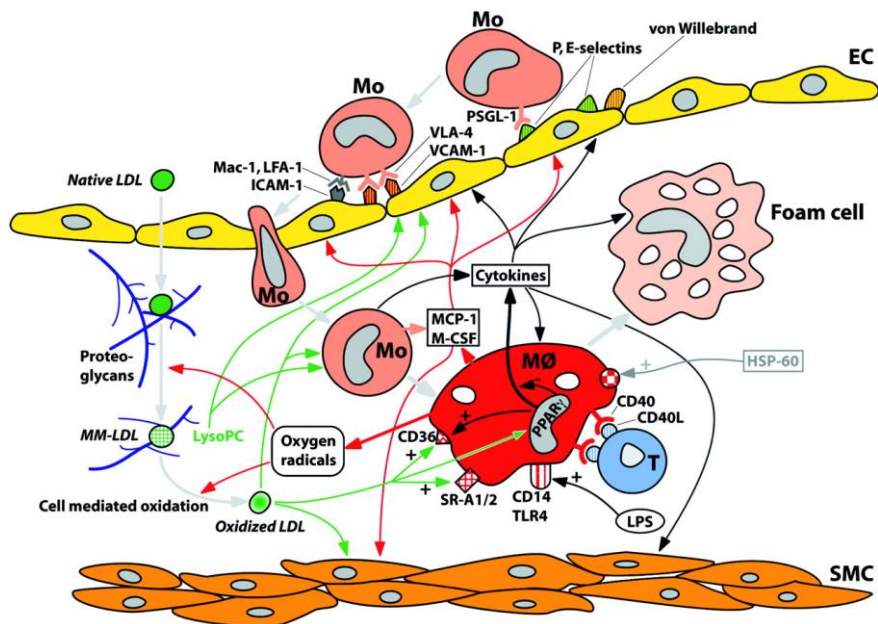


Figura 5. Esquema representativo de la formación de células espumosas en la íntima. Adaptado de Osterud y Bjorklid [113]. LDL: lipoproteínas de baja densidad; MM-LDL: LDL mínimamente modificadas; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular; MCP-1: proteína monocito quimioatrayente-1; M-CSF: factor estimulante de colonias; TLR4: receptor Toll-like 4; HSP-60: proteína de choque térmico; LPS: lipopolisacáridos; PSGL-1: ligando de glicoproteína-1 P-selectina; LFA-1: función de los linfocitos antígeno-1; EC: células endoteliales; SMC: células musculares lisas.

Las modificaciones que sufren las LDL pueden ser químicas y/o estructurales cuando interactúan con oxidantes (ROS, lipo-oxigenasas, etc.), enzimas proteolíticas (trombina, metaloproteinasas, etc.) y enzimas lipolíticas

(fosfolipasa A y C), además interaccionan con componentes de la matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno y elastina) (**Figura 5**) [110].

El reclutamiento de las células mononucleares (monocitos y linfocitos T) como respuesta inflamatoria especializada para la exposición de LDL-mínimamente modificadas (MM-LDL), caracteriza la fase de iniciación de la formación de la lesión aterosclerótica [113]. Las LDL-modificadas inducen la expresión de MCP-1 e IL-8, además de un aumento en la expresión de moléculas de la adhesión como integrinas y selectinas a través de la activación de NF-Kb, que favorecen el reclutamiento, la adhesión y la trans migración leucocitaria (monocitos, linfocitos T) (**Figuras 5 y 6**) [110]. Una vez adheridas, las células mononucleares entran a la pared arterial dirigidas por la proteína monocito quimioatrayente-1 (MCP-1). Las partículas de LDL atrapadas en la íntima son propensas a la oxidación progresiva, haciéndolos reconocibles por los receptores scavenger de macrófagos. Tras una amplia captación de LDL-modificadas por los receptores scavenger (CD36 y SR-A), los macrófagos son finalmente convertidos en células espumosas [113], ver **Figuras 5 y 6**.

La oxidación e inflamación continúan, y la lesión se amplía invadiendo el lumen arterial con la adherencia y agregación plaquetaria. La migración de las células musculares lisas a la íntima y finalmente la formación de una cápsula fibrosa (comprende componentes de la matriz extracelular, células musculares lisas y colágeno) y necrótica en el núcleo de la lesión, deterioran el flujo de sangre (**Figura 6**) [5].

La acumulación de LDL oxidada en la íntima y los productos de activación celulares resultantes tales como, factores quimiotácticos, factores de crecimiento y citoquinas, también promueven la proliferación de células del músculo liso, la captación de LDL oxidada y finalmente, la conversión a células espumosas cargadas de lípidos [113].

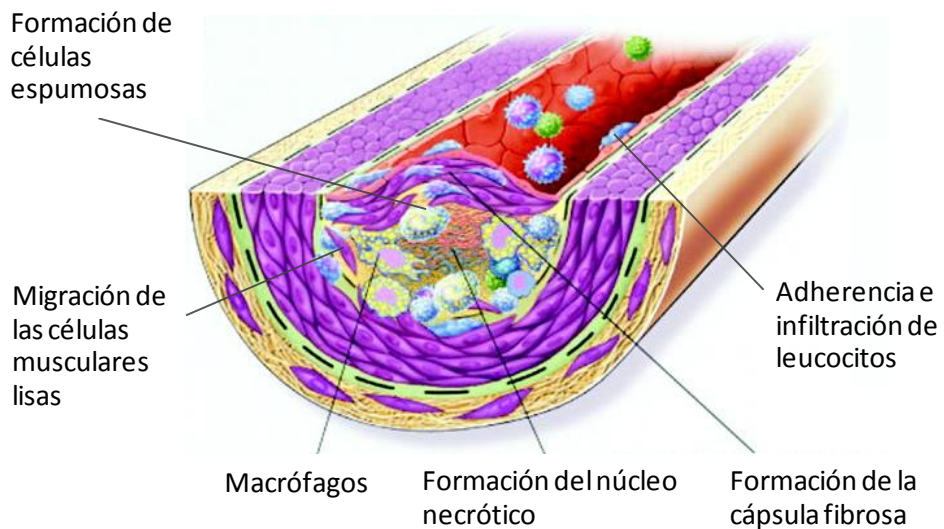


Figura 6. Esquema representativo de la formación de la placa de ateroma. Adaptado de Stocker [5].

Una complicación de la aterosclerosis avanzada es la trombosis, resultado de la ruptura de la placa de ateroma y la exposición de sus componentes trombogénicos a la circulación sanguínea, ocluyendo completamente el lumen [5] y consecuentemente, se desatan los eventos cardiovasculares como el infarto al miocardio o accidentes cerebrovasculares.

En resumen, las LDL-oxidadas desempeñan un papel clave en la patogenia del proceso aterotrombótico. Por lo tanto, las estrategias para disminuir la oxidación de los ácidos grasos y en particular de las LDL, así como los niveles plasmáticos de esta lipoproteína, son puntos claves para evitar o reducir el desarrollo de la aterosclerosis.

2.6.2. Resistencia a la insulina y DMT2 en el Síndrome Metabólico

La insulinorresistencia puede ser definida como la capacidad disminuida de la célula para responder a la acción de la insulina, siendo la característica más importante en el estado “pre-diabético” [114] y el primer deterioro detectable en DMT2. A menudo la resistencia a la insulina es compensada por una hiperinsulinemia [114]. La insulinorresistencia es consecuencia de los efectos de

factores inflamatorios, hormonales, así como de estrés de retículo endoplásmico sobre tejidos insulino-sensibles tales como adipocitos, hepatocitos, musculo esquelético y células β pancreáticas, además constituye uno de los factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DMT2) y SMet [114].

Los factores genéticos y ambientales, como la falta de ejercicio físico y el tipo de dieta subyacen a las anomalías metabólicas del SMet y pueden ser la causa de la insulinoresistencia [67]. El consumo de dietas hipercalóricas y con alto contenido en grasas saturadas se relacionan con aumento de la grasa corporal, y por consiguiente deterioro de la sensibilidad a la insulina, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados mejoran la sensibilidad a la insulina [115]. La obesidad y el exceso de adiposidad abdominal son factores determinantes en la resistencia a la insulina y representa el factor de riesgo más importante para la DMT2 y SMet [63, 115]. La adiponectina es una proteína secretada por el tejido adiposo cuyas funciones metabólicas son la supresión de la gluconeogénesis hepática, estimulación de la oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo esquelético, secreción de insulina, captación de glucosa por el músculo esquelético, así como modulación de la ingesta y el gasto energético. Los niveles de esta adipoquina se ven reducidos en presencia de obesidad, exceso de adiposidad y resistencia a la insulina [63] y por consiguiente, sus funciones metabólicas se ven deterioradas. Sin embargo, la pérdida de peso mejora notablemente la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos, disminuye la incidencia de diabetes y mejora las anormalidades metabólicas [115].

La secreción de insulina a niveles fisiológicos activa un sistema generador de H_2O_2 por la NADPH-oxidasa en las membranas plasmáticas de adipocitos humanos [116]. Cuando el receptor de insulina es estimulado, éste se fosforila a sí mismo y también a varios sustratos como el sustrato del receptor de insulina (IRS-1, del inglés insulin receptor substrate) [117], requisito para iniciar la cascada de señalización cuya inhibición es uno de los primeros pasos a través del cual la señal inflamatoria conduce a la resistencia a la insulina [118, 119]. El aumento del

metabolismo de la glucosa genera una producción incrementada de ROS, más elevada aún en la obesidad, provocando una mayor activación de las vías inflamatorias [26]. La fosforilación de IRS-1 se inhibe cuando la célula está expuesta a marcadores inflamatorios como el TNF- α o elevados niveles de ácidos grasos libres, característicos en la obesidad [118, 119].

El desarrollo de la DMT2 se caracteriza por la hiperglucemia e hiperinsulinemia como consecuencia de la resistencia a la insulina de diferentes tejidos tales como el tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. La secreción fisiológica de insulina genera H_2O_2 [116], por lo que la constante secreción de insulina en el caso de la hiperinsulinemia por consiguiente, produce un aumento de ROS, desencadenando estrés oxidativo en varios tipos celulares incluyendo las células β pancreáticas. Los efectos de la hiperinsulinemia sumado a la producción elevada de H_2O_2 , deteriora las funciones de las células β pancreáticas conduciéndolas hacia la muerte [120]. En modelos animales, se observó que la hiperglucemia induce la disfunción de las células β pancreáticas, debido al aumento de ROS, en particular del anión superóxido y que el tratamiento de éstas células con TPO (tempol), un mimético del antioxidante superóxido dismutasa (SOD) impide el aumento del anión superóxido total y mitocondrial, así como la disfunción de las células β pancreáticas inducida por hiperglucemia [121].

La acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno ha sido vinculada con la obesidad [97], la aterosclerosis [110], así como en la insuficiencia de células beta en la diabetes tipo 2 [121]. El vínculo de unión entre la el SMet y la DMT2, es el estrés oxidativo, implicado tanto en la obesidad abdominal como en la resistencia a la insulina, respectivamente [122].

3. DIETA Y ESTADO POSTPRANDIAL

3.1. Importancia del estado postprandial

En la actualidad, los patrones de alimentación establecen la ingesta de tres o más comidas al día, de las cuales cada una contiene aproximadamente entre 20-70 g de grasa [123, 124], de manera que cada comida es ingerida antes de que los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) resultantes de la ingesta anterior, retornen a sus niveles basales (a excepción del desayuno) [124]. Por lo tanto, el estado postprandial es una situación en la que los humanos pasamos la mayor parte del tiempo, a raíz de las sucesivas ingestas durante el día siguiendo los hábitos alimentarios actuales [124].

La lipemia postprandial representa una respuesta metabólica aguda a una comida o nutrientes, y es una condición dinámica que comprende una rápida remodelación de las lipoproteínas en comparación con el estado de ayuno en el que estas lipoproteínas se mantienen estables. En la lipemia postprandial, los niveles de triglicéridos aumentan dentro de la primera hora tras la ingesta de alimentos con alto contenido graso y pueden mantenerse elevados de 5 a 8 horas. La capacidad de los individuos para regular el aclaramiento de los TGs es el reflejo de la eficiencia metabólica [123, 125], y el retraso en este aclaramiento representa una respuesta alterada a la ingesta de alimentos que podría reflejar la existencia de insulinoresistencia [126].

Los triglicéridos son rutinariamente medidos en ayunas, y exceptuando las primeras horas de la mañana, la mayoría de los individuos permanecen en estado postprandial gran parte del día [124, 126]. Frecuentemente, los factores de riesgo cardiovascular han sido determinados y medidos en estado de ayuno, aunque la importancia del estudio de la lipemia postprandial radica en evidencias que la asocian con la aterosclerosis [125-127].

La hipertrigliceridemia postprandial se ha asociado con el riesgo incrementado de infarto de miocardio y cardiopatía isquémica y muerte [125]. Las lipoproteínas ricas en TGs (remanentes de quilomicrones) pueden penetrar la capa

de células endoteliales y residir en el espacio sub-endotelial, donde contribuyen a la formación de células espumosas, caracterizando a la aterosclerosis temprana, como parte de un fenómeno postprandial [110, 126, 128]. El valor del ratio TGs/apoB proporciona una estimación del tamaño medio de las partículas, lo cual es importante, ya que refleja la tasa de aclaramiento de los TGs [123]. En cuanto a las LDL, su tamaño se ha relacionado con riesgo cardiovascular [123], de hecho las LDL desempeñan un papel importante en el desarrollo de aterosclerosis, principalmente las LDL-oxidadas ya que son mucho más aterogénicas [113], y los antioxidantes en la dieta por su parte, ejercen cierto efecto beneficioso evitando la oxidación de las mismas [129, 130].

El tejido adiposo capta lípidos ingeridos en la dieta, durante al menos las 5 horas siguientes a la ingesta de los alimentos y, por tanto ocurre durante todo el día dentro de un patrón de alimentación de 3 comidas al día. El aumento de adiposidad en los individuos obesos, plantea la disminución de la capacidad del tejido adiposo para almacenar más TG en los adipocitos, por lo tanto, los lípidos tienden a acumularse en otros tejidos u órganos [131]. El estrés oxidativo que se genera en el tejido adiposo, consecuencia de la obesidad per se; debido al incremento de la NADPH-oxidasa y la disminución de genes antioxidantes, provoca una producción alterada de adipocinas pro-inflamatorias [26].

3.2. Dieta y estrés oxidativo postprandial

El estado postprandial se asocia con el estrés oxidativo y la inflamación, característicos de enfermedades cardiovasculares, SMet y diabetes [132]. La dieta parece modular estos procesos, de manera que se han realizado estudios aplicando diferentes modelos dietéticos que puedan utilizarse como prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas [7, 11, 104, 133-137]. De hecho, varios estudios han demostrado que los alimentos que componen una dieta mediterránea, en particular aquellos ricos en MUFA (ácidos grasos monoinsaturados), disminuyen la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés

oxidativo en células mononucleares de sangre periférica, tanto en personas con SMet como en personas de edad avanzada [7, 11, 104, 136, 137].

Por el contrario, el consumo de una dieta rica en grasas saturadas aumenta la expresión de genes implicados en procesos de inflamación en el tejido adiposo, y sin embargo, una dieta MUFA induce un perfil de expresión génica antiinflamatorio en estado de ayunas [92], mientras que en estado postprandial, el incremento de citoquinas pro-inflamatorias en tejido adiposo de personas con SMet, parece ser independiente de la calidad y la cantidad de grasa en la dieta [105]. La disfunción del tejido adiposo y las patologías metabólicas y vasculares presentes en la obesidad, tienen como un punto de unión la inflamación sistémica de bajo grado, siendo ésta un factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares [138].

Por otra parte, el consumo de aceite de oliva, cuya fuente de ácidos grasos monoinsaturados y compuestos fenólicos caracterizan a la dieta Mediterránea, modulan los genes involucrados en la señalización del receptor de las células β -pancreáticas y endocitosis [139], así como también reduce la expresión de los genes que inducen el estrés oxidativo [137] y la respuesta inflamatoria [140] en estado postprandial en CMSP de personas de edad avanzada. Así pues, el postprandio generalmente asociado tanto a niveles elevados de TGs y glucosa, como también al aumento en la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo, resultan en daño celular, daño al ADN, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. Se ha demostrado que el incremento del estrés oxidativo postprandial es un factor importante en la disfunción endotelial y la aterosclerosis [5, 108, 110].

Las comidas con alto contenido en grasas y en carbohidratos inducen un mayor y más prolongado estrés oxidativo e inflamatorio postprandial en obesos, en comparación con sujetos normopeso, lo que puede contribuir al aumento del riesgo aterogénico en la obesidad [141]. En contrapartida, añadir nueces a una comida con alto contenido en grasas saturadas mejora la dilatación mediada por flujo

independientemente de los cambios en la oxidación, inflamación o dimetilarginina asimétrica plasmática. Además, las nueces y el aceite de oliva conservan el fenotipo protector de las células endoteliales [142]. Por lo tanto, el tipo de grasa en las comidas puede afectar diferencialmente a la inflamación, a la activación endotelial y al estrés oxidativo en estado postprandial [117, 137].

Las personas con SMet presentan marcadores de estrés oxidativo incrementados en ayunas, escenario que se agrava en estado postprandial tras la ingesta de una sobrecarga grasa en comparación con personas sanas [143]. Las evidencias respaldan el hecho de que el estrés oxidativo postprandial puede ser modulado por la cantidad y el tipo de grasa de la dieta, en particular el tipo de grasa de la dieta, por tanto se han estudiado sus efectos en estado postprandial [11, 94, 104-106, 136, 137, 142], y los resultados sugieren que los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) del aceite de oliva tienen posibles efectos cardioprotectores [11], juntos con sus componentes minoritarios tales como los compuestos fenólicos, los cuales se ha demostrado que reprimen la expresión de genes pro-inflamatorios [106] en personas con síndrome metabólico, y mejora la función endotelial en hombres hipercolesterolémicos [129].

El efecto antioxidante de una dieta Mediterránea rica en MUFA suplementada con CoQ exógeno, reduce la expresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa, y por consiguiente se reduce la expresión postprandial de los genes antioxidantes en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), en personas mayores, mientras que una dieta rica en ácidos grasos saturados (SFA) aumenta la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo [137]. Igualmente en pacientes con SMet, el consumo de una dieta rica en grasa monoinsaturada mejora los niveles plasmáticos postprandiales de GSH (glutatión reducido) y la relación GSH/GSSG, así como también disminuye los niveles de lipoperóxidos, proteínas carboniladas, H₂O₂ y la actividad SOD, en comparación con una dieta rica en grasa saturada, mientras que las dietas bajas en grasa y altas

en hidratos de carbono complejos, ejercen un efecto intermedio en relación con las dietas HMUFA y HSFA [11].

El aceite de oliva como fuente de compuestos fenólicos y ácidos grasos monoinsaturados, así como los aceites de semilla con agregado de antioxidantes artificiales (dimetilpolisiloxano) o provenientes de la aceituna como el alperujo, podrían reducir el estrés oxidativo postprandial en comparación con aceite de girasol refinado [136].

Por lo tanto, la sustitución de las grasas saturadas por grasas monoinsaturadas en la dieta puede ser una estrategia eficaz para reducir el estrés oxidativo en pacientes con obesidad y síndrome metabólico, así como sus consecuencias fisiopatológicas.

III. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El tejido adiposo disfuncional, se caracteriza por el aumento en la infiltración de monocitos y macrófagos; incrementando la producción de adipoquinas pro-inflamatorias.

Furukawa y cols., propusieron que la obesidad per se, podría inducir estrés oxidativo sistémico, debido al incremento en la expresión de la NADPH-oxidasa y la disminución de la expresión de los genes antioxidantes en tejido adiposo, lo que, al menos en parte, causa la alteración en la liberación de adipoquinas y está asociado con el desarrollo del SMet.

Estudios previos de intervención dietética, han demostrado que la modificación de la calidad de la grasa de la dieta puede reducir significativamente el estrés oxidativo. De hecho, se ha demostrado que el consumo de una dieta rica en grasas monoinsaturadas (MUFA) induce una reducción del daño oxidativo mejorando los niveles de sustratos antioxidantes plasmáticos de GSH (glutación reducido) y la relación GSH/GSSG, así como también las biomoléculas plasmáticas (lipoperóxidos, proteínas carboniladas, H₂O₂ y la actividad SOD) en la misma población de pacientes con SMet del presente estudio.

Así, teniendo en cuenta que la etiología del síndrome metabólico es consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales, de entre los que destaca la dieta, y en particular el tipo de grasa; el desarrollo del síndrome metabólico podría estar relacionado con la cantidad y tipo de grasa de la dieta, a través de la modulación que ejerce ésta sobre el estrés oxidativo sistémico asociado a una producción alterada de adipoquinas.

Sobre la base de estos hallazgos anteriores, nos planteamos el hecho de que la cantidad y tipo de grasa de la dieta podrían modular el perfil de expresión de genes implicados en la formación de especies reactivas de oxígeno y en la defensa antioxidante en tejido adiposo y en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Síndrome Metabólico, y así influir en el grado de estrés oxidativo a nivel sistémico.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta con diferente cantidad y tipo de grasa [**A.** Dieta rica en ácidos grasos saturados (HSFA), 38 % de energía proveniente de la grasa; **B.** Dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados (HMUFA), 38 % de energía proveniente de la grasa; **C.** Dieta baja en grasa (28 % de energía), rica en hidratos de carbono complejos (LFHCC); **D.** Dieta baja en grasa, rica en hidratos de carbono complejos, suplementada con PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino (LFHCC n-3)], tanto en ayunas como en estado postprandial en la expresión génica (niveles de ARNm) de las subunidades que conforman el complejo generador del anión superóxido, NADPH-oxidasa en tejido adiposo subcutáneo de pacientes con SMet.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Estudiar el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta con diferente cantidad y tipo de grasa en la expresión génica en ayunas y en estado postprandial de enzimas relacionadas con el sistema de defensa antioxidante: SOD1 y SOD2, CAT, GSR, GPx1, GPx3 y GPx4, TXN, TXNRD1, el factor de transcripción NFE2L2 y KEAP1, en tejido adiposo de pacientes con SMet.

2. Estudiar el efecto del consumo a largo plazo de cuatro modelos de dieta en la expresión génica de las subunidades del complejo generador del anión superóxido, NADPH-oxidasa y el factor de transcripción PU.1, así como la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa antioxidante: SOD1 y SOD2, CAT, GSR, GPx1, GPx4, TXN, TXNRD1 y el factor de transcripción NFE2L2, tanto en ayunas como en estado postprandial en células mononucleares de sangre periférica con el objetivo de establecer efectos diferenciales en cada tipo celular.

3. Analizar la relación entre la expresión génica tanto en tejido adiposo como en células mononucleares de sangre periférica de los genes relacionados con

el estrés oxidativo y los parámetros lipídicos y biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo.

4. Identificar las proteínas de respuesta rápida al tipo de grasa ingerida en la dieta, mediante cambios en el proteoma de CMSP aisladas de pacientes con SMet, en respuesta a la ingesta aguda de cuatro comidas con diferente tipo de grasa.

V. DISEÑO Y METODOLOGÍA

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en el marco del estudio LIPGENE “*Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis*”, (NCT00429195). Un subgrupo de 75 pacientes (28 hombres y 47 mujeres) con Síndrome Metabólico (SMet) completó el estudio de lipemia postprandial de las fases pre- y post-intervención. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito y se les realizó una historia clínica detallada completa junto con un examen físico y una analítica previos a la inclusión en el estudio. El SMet se definió según los criterios del ATP III [61, 144], cuando los pacientes presentaron tres o más de las siguientes características:

- Concentración de glucosa en ayunas: $\geq 5,5$ mmol/L (≥ 100 mg/dL).
- Niveles de triglicéridos en plasma: $\geq 1,7$ mmol/L (≥ 150 mg/dL).
- Concentración de c-HDL en plasma: $< 1,0$ mmol/L (< 40 mg/dL) en hombres y $< 1,3$ mmol/L (< 50 mg/dL) en mujeres.
- Presión sanguínea: $\geq 130/85$ mmHg.
- Perímetro de cintura: > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres.

Este ensayo clínico se realizó en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía, de febrero de 2005 a abril de 2006. Durante estos 2 años aproximadamente, se dividió a los pacientes en 2 subgrupos. Los pacientes de la subcohorte I (N = 36) pertenecen al primer año del estudio, y los pacientes de la subcohorte II (N = 39) pertenecen al segundo año del estudio de intervención.

El protocolo experimental fue aprobado por el comité ético del centro de intervención, de acuerdo con la declaración de Helsinki.

1.1. Cálculo del tamaño muestral

El cálculo del tamaño de la muestra se llevó a cabo utilizando la calculadora de tamaño muestral GRANMO (Versión 7.12 abril 2012).

El cálculo se ha realizado en base a las siguientes premisas:

Variable principal del estudio: Expresión de NADPH-oxidasa gp91^{phox} (niveles de ARNm)

Diferencia mínima esperada: $H_0 = 2$ $H_1 = 1,4$ (Diferencia mínima esperada 30% en la variación en la expresión de NADPH oxidasa gp91^{phox} = 0,6).

Error alfa = 0,05 (Nivel de confianza= 95%)

Error beta = 0,10 (Potencia= 90%)

Pérdidas estimadas: 10%

Contraste de Hipótesis: Bilateral

En base a estas premisas se precisaron un total de 9 pacientes por grupo.

1.2. Criterios de inclusión

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión de acuerdo a los establecidos en la realización del estudio LIPGENE:

- Síndrome metabólico según los criterios de ATP-III
- Hombres y mujeres entre 35-70 años
- IMC entre 20-40 kg/m²
- Colesterol total <8,0 mmol/l (144 mg/dl)
- Medicación/suplementos nutricionales permitidos: antihipertensivos (incluyendo beta-bloqueantes), terapias hormonales, polivitamínicos y antioxidantes.
- Fumadores y no fumadores.
- Consumo de alcohol de forma no excesiva sin elevación de las enzimas hepáticas (AST y ALT).
- Europeos de raza blanca.

1.3. Criterios de exclusión

Del mismo modo, se establecieron los siguientes criterios de exclusión, de acuerdo a los establecidos en el estudio LIPGENE:

- Edad inferior a 35 o superior a 70 años.
- Diabetes u otros desórdenes endocrinos.

- Enfermedades inflamatorias crónicas.
- Disfunción renal o hepática.
- Anemia (hemoglobina <12 g/dl en hombres o <11 g/dl en mujeres).
- Medicación hipolipemiente y antiinflamatoria concomitante.
- Consumo de suplementos de ácidos grasos incluyendo aceites de pescado, etc.
- Alto consumo de pescado (>2 piezas de pescado a la semana de arenques, caballa, sardinas, salmón, trucha, atún).
- Consumo de altas dosis de vitaminas antioxidantes (A, C, E, β -caroteno).
- Realización de un ejercicio físico intenso más de 3 veces a la semana.
- Inicio de una dieta especial durante los 3 meses de duración del estudio.
- Modificaciones del peso corporal en 3 o más kg durante los 3 meses de duración del estudio.
- Abuso de alcohol o de drogas.
- Mujeres embarazadas o lactantes o mujeres que deseen quedarse embarazadas en los próximos 12 meses al estudio. Las mujeres que se queden embarazadas durante el estudio deberán abandonar el mismo.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

2.1. Estudio de intervención dietética

Los voluntarios fueron aleatorizados para recibir una de las cuatro dietas durante 12 semanas (**Figura 7**). Esta aleatorización se realizó según edad, género y concentración de glucosa plasmática en ayunas utilizando el programa de aleatorización MINIM (*Minimisation Programme for Allocating patients to 8 Clinical Trials, Dept of Clinical Epidemiology, the London Hospital Medical College, UK*). El diseño del estudio de intervención dietética se describió previamente en el artículo publicado por Shaw y cols. [145] que aporta información detallada acerca del control del consumo de los alimentos durante el periodo de intervención dietética, la adherencia de los voluntarios a la dieta y

detalles de la composición de los alimentos durante las fases de pre- y post-intervención del estudio.

La composición de las cuatro dietas del estudio fue la siguiente:

A. Dieta Occidental, rica en ácidos grasos saturados (HSFA)

Compuesta por un 15% de proteína en relación al contenido calórico total (CCT), 47% de HC del CCT y 38 % de grasa del CCT [de los cuales, 16% grasa saturada (SFA), 12 % grasa monoinsaturada (MUFA) y 6% grasa poliinsaturada (PUFA)].

B. Dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados (HMUFA)

Con un 15% de proteína del CCT, 47% de HC del CCT y 38 % de grasa del CCT (de los cuales, 8% SFA, 20% MUFA y 6% PUFA).

C. Dieta baja en grasa y rica en HC complejos (LFHCC)

Compuesta por un 15% de proteína del CCT, 57% de HC del CCT y 28 % de grasa del CCT (de los cuales, 8% SFA, 11% MUFA y 6% PUFA). Además, esta dieta se suplementó con un 1 g/d de aceite de girasol alto en ácido oleico (HOSO) en forma de cápsula.

D. Dieta baja en grasa, alta en HC complejos y suplementada con PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino (LFHCC n-3)

Con un 15% de proteína del CCT, 57% de HC del CCT y 28% de grasa del CCT (de los cuales, 8% SFA, 11% MUFA y 6% PUFA). Esta dieta fue suplementada con 1,24 g/d de PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino, en forma de cápsula (Marinol TM C-38, un concentrado natural de aceite de pescado con alto contenido en EPA y DHA).

Las cápsulas que contenían ácidos grasos de cadena larga PUFA fueron utilizadas en vez del consumo de pescado por varias razones. Las cápsulas proveían de una cantidad ajustada y composición estable de ácidos grasos, las cuales eran más convenientes que el incremento en el consumo de pescado, porque éstas pueden ser administradas fácilmente como suplemento dietético. Además los suplementos que contienen aceite de pescado proveen cantidades equivalentes de EPA y DHA tanto como el pescado graso, el cual es igualmente efectivo al

enriquecer los lípidos sanguíneos como los ácidos grasos de cadena larga PUFA [146]. La composición de cada cápsula de placebo (HOSO) y de MarinolTM C-38 de las dos dietas bajas en grasa del estudio se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Composición de las cápsulas de las dos dietas bajas en grasa del estudio.

Descripción	MarinolTM C-38	Placebo HOSO
Ácidos grasos	g/100 g	g/100 g
C14:0	5,0	-
C16:0	10,5	3,5
C16:1	4,5	-
C17:0	0,2	-
C18:0	2,5	3,4
C18:1	8,0	79,2
C18:2	1,0	11,8
C18:3	0,5	0,2
C20:0	0,2	0,3
C20:1	1,1	0,3
C22:0	0,2	0,9
C24:0	0,2	0,3
C20:5	24,0	-
C22:6	17,5	-
Tocoferol natural	3,0 mg	3,0 mg

Antes de iniciar el periodo de intervención dietética (Pre-intervención), en el punto medio del estudio (semana 6) y al finalizar el mismo (semana 12), todos los voluntarios completaron un diario de consumo de alimentos durante 3 días consecutivos en los que había que incluir pesos específicos de cada alimento ingerido y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, que permitía la identificación de posibles errores en la ingesta, lo que permitía su corrección. Al inicio del periodo de intervención dietética, se les facilitó a los pacientes un manual con los diferentes alimentos que podrían consumir según la dieta a la que habían sido asignados. Además, la especialista en nutrición les asesoró sobre los alimentos que podían consumir fuera del hogar, los cuales debían ser registrados en el manual proporcionado con el fin de detectar incidencias en la alimentación. Se les proporcionó alimentos a los voluntarios cada dos semanas a lo largo de todo

el estudio. Durante la visita para la recogida de alimentos, se les pidió que hicieran un recordatorio de 24 horas (de los alimentos que habían consumido el día anterior), que fue evaluado con un sistema de puntos según los alimentos consumidos. Además, dicha visita también sirvió para motivar a los voluntarios y así detectar posibles errores en el cumplimiento de las pautas de alimentación. Con el fin de analizar los alimentos consumidos durante las 12 semanas de duración del estudio de intervención dietética se utilizó el programa informático “Dietsource”, version 2.0.

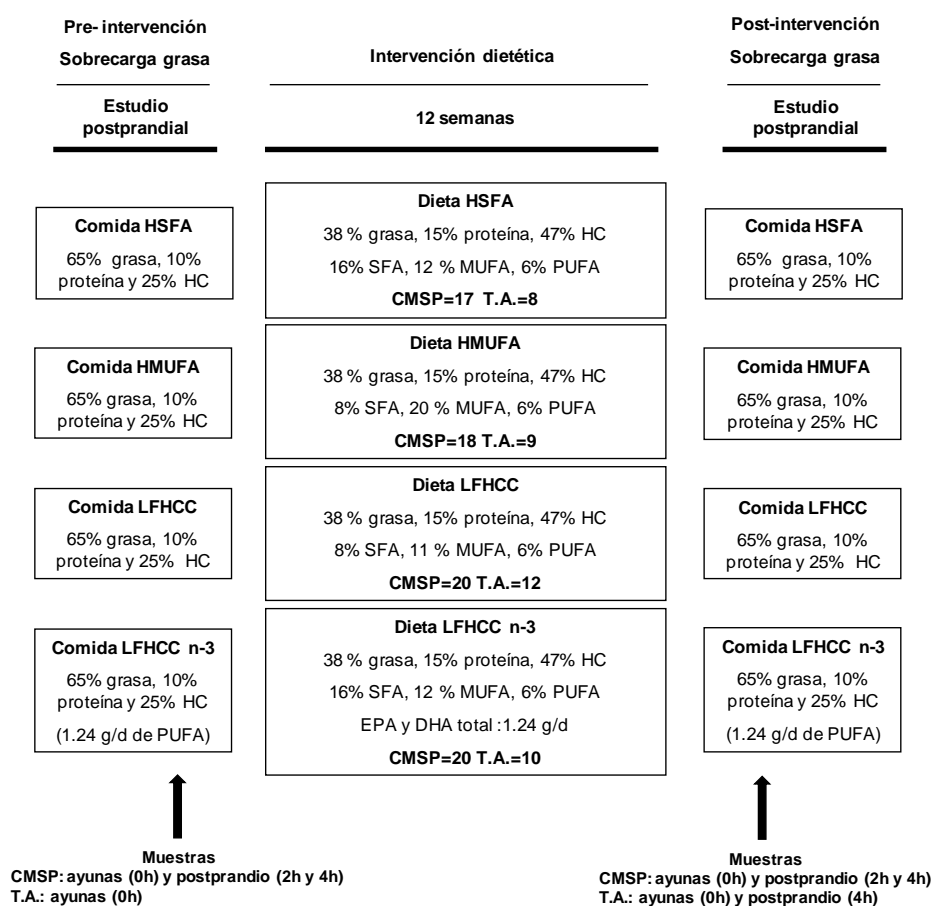


Figura 7. Diseño del estudio Lipgene

2.2. Estudio del postprandio

El estudio postprandial se llevó a cabo al inicio del estudio (Pre-intervención) y una vez finalizadas 12 semanas de intervención dietética (Post-intervención) (**Figura 7**). Los pacientes consumieron una sobrecarga grasa en forma de comida que reflejaba la misma composición que la dieta a la que cada individuo fue asignado en el periodo de intervención dietética, y que estaba compuesto por 0,7 g de grasa/kg de peso, 5 mg de colesterol/kg de peso y 60.000 IU/m² por área de superficie corporal de Vitamina A, con la siguiente distribución calórica: 65% de grasa, 10% de proteína y 25% de hidratos de carbono. Los pacientes acudieron a nuestra Unidad a las 8:00 horas de la mañana, en ayunas, en el caso de fumadores, sin haber fumado desde el día anterior y con una abstinencia alcohólica de al menos 7 días antes de la toma de muestras. Las extracciones sanguíneas y obtención de las muestras de tejido adiposo subcutáneo en el tiempo basal, se realizaron tras 12 horas de ayuno y antes de tomar el desayuno. Después de la sobrecarga grasa se realizaron extracciones de sangre a las 2 y 4 horas y obtención de muestra de tejido adiposo de la región abdominal a las 4 horas del postprandio. Las muestras de tejido adiposo subcutáneo en estado postprandial fueron obtenidas de un subgrupo de 39 voluntarios. Durante el periodo postprandial los participantes no consumieron más alimentos, aunque sí pudieron tomar agua. En la **Figura 7** se muestra un esquema que resume el diseño del estudio LIPGENE.

La composición en grasa para el estudio de lipemia postprandial fue la siguiente:

A. Comida rica en SFA (HSFA): 38% SFA, 21% MUFA y 6% PUFA, a expensas de mantequilla, leche entera, pan blanco y huevos.

B. Comida rica en MUFA (HMUFA): 12% SFA, 43% MUFA y 10% PUFA, a expensas de aceite de oliva, leche desnatada, pan blanco, huevos, yema de huevos y tomates.

C. Comida baja en grasa y alta en HC complejos con placebo (LFHCC): 21% SFA, 28% MUFA y 16% PUFA (con 1 g de aceite de girasol alto en ácido oleico), a expensas de mantequilla, aceite de oliva, leche desnatada, pan blanco, huevos, yema de huevos y nueces.

D. Comida baja en grasa y alta en HC complejos, suplementado con Marinol™ C-38 (LFHCC n-3): 21% SFA, 28% MUFA y 16% PUFA (con 1,24 g de PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino), a expensas de mantequilla, aceite de oliva, leche desnatada, pan blanco, huevos, yema de huevos y nueces.

3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.1. Extracciones sanguíneas

Fueron extraídas muestras de sangre de los 75 voluntarios antes del inicio del periodo de intervención dietética (Pre-intervención), en ayunas, a las 2 y a las 4 horas después de la administración de la sobrecarga grasa. Para el estudio de lipemia postprandial, se recogieron muestras después de las 12 semanas de intervención dietética en ayunas, a las 2 y a las 4 horas después de la administración de la sobrecarga grasa. Las muestras fueron recogidas en tubos que contenían 1 mg/dL de ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) para evitar la oxidación de las lipoproteínas y como anticoagulante, fueron depositadas en contenedores con hielo y mantenidas en oscuridad.

3.2. Aislamiento del plasma

Inmediatamente después de la extracción sanguínea se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación (1500 g por 15 min a 4 °C). Las muestras de plasma se alicuotaron y fueron guardadas a -80 °C hasta la realización de las determinaciones, para evitar las variaciones inter-ensayo.

3.3. Análisis lipídico

La concentración de las diferentes variables lipídicas fue determinada utilizando un autoanalizador modular (*DDPPII Hitachi; Roche®, Basel, Switzerland*), con reactivos específicos suministrados por *Boehringer-Mannheim®*. El colesterol total, los TG y las fracciones lipoproteicas fueron determinados mediante procedimientos enzimáticos [147, 148]. El c-HDL se determinó analizando el sobrenadante obtenido tras la precipitación de una alícuota con dextrano sulfato-Mg²⁺ [149]. Los niveles de c-LDL se determinaron mediante la fórmula de Friedewald [150] basada en las concentraciones de colesterol total, TG y c-HDL.

Los métodos de determinación de biomarcadores de estrés oxidativo tales como H₂O₂, hidroperóxidos totales, LPOs (lipoperóxidos) y proteínas carboniladas en plasma fueron descritas previamente por Pérez-Martínez et al [11].

3.4. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Muestras sanguíneas de 15 mL fueron diluidas 1:2 (v/v) en tampón fosfato salino (PBS) y fueron separadas en un gradiente de Ficoll (solución de aislamiento de CMNs, Rafer) por centrifugación a 2000 g por 30 min. La capa de células mononucleares fue recogida y lavada dos veces en PBS a 1800 rpm, 10 min a 4 °C. Seguidamente, las células se resuspendieron en “Buffer A” (10 mM ácido N-2 hidroxietil-piperazin-N’-2-etanosulfónico (HEPES) [pH=7.8], 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ditioneitol (DTT) y 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)) para la posterior extracción de las proteínas y en TRIZOL (Tri® Reagent, Sigma, St Louis, MO) para el aislamiento del ARN. Una vez finalizados estos pasos, todas las muestras se guardaron congeladas a -80 °C.

3.4.1. Extracción de ARN de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Se extrajo ARN total de células mononucleares obtenidas de las muestras de sangre en ayunas, a las 2 y 4 horas pre- y post-intervención utilizando el kit *TRI Reagent* (Sigma, St Louis, Mo, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se cuantificó usando Nanodrop ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (*Nanodrop Technology®*, Cambridge, UK). La integridad del ARN se midió en geles de agarosa.

3.4.2. Eliminación del ADN de interferencia y digestión de ADN

Para eliminar la posible contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico, se utilizó el kit *AMP-DI* (Sigma, St Louis, Mo, USA), el cual consiste en el uso de una endonucleasa que digiere ADN de cadena sencilla y doble. A 1 µg de ARN diluido en H₂O libre de ARNsas se le añadió 1 µL del *Reaction Buffer* al 10X (0,2 M Tris-HCl a pH=8,3; 0,020 M MgCl₂) y 1 µL de la enzima *DNAsa I*

(1 unidad/ μ L en 50 % glicerol, 0,010 M Tris-HCl a pH 7,5; 0,010 M CaCl_2 y 0,010 M MgCl_2). Se incubó durante 45 min a 30 °C y luego se añadió 1 μ L de *Stop solution* (0,050 M EDTA) para inactivar la enzima DNAsa I. Las muestras se calentaron 10 min a 70 °C para inactivar la DNAsa I y se pusieron en hielo para, a continuación, realizar la transcripción inversa.

3.4.3. Transcripción inversa

Para obtener ADNc a partir de la muestra de ARN de CMSP se utilizó el kit de retrotranscripción (RT) *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor (Applied Biosystems)*, siguiendo las instrucciones del fabricante para la preparación de las mezclas de reacción a un volumen final de 20 μ L y partiendo de 2 μ g de ARN total por muestra. Cada una de las mezclas se preparó en tubos estériles libres de RNAsas, DNAsa y DNA exógeno. La reacción de RT se llevó a cabo utilizando el termociclador *iQ5 iCycler (Bio-Rad)* con el siguiente protocolo:

25 °C por 10 min.

37 °C por 120 min.

85 °C por 5 min.

Se guardaron las muestras con el ADN copia (cDNA) a -80 °C, hasta llevar a cabo la PCR a tiempo real.

3.5. Obtención de muestras de tejido adiposo

Las muestras de tejido adiposo subcutáneo de un subgrupo de 39 voluntarios (14 hombre y 25 mujeres) se obtuvieron desde la región abdominal lateral superficial hasta el ombligo con el instrumento *Bard® Magnum (MG1522)*, agujas *Bard Magnum® Core (MN1410) (Sales M & I Medical, Inc., Miami, Florida, EE.UU.)*. Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron en ayunas antes del inicio del periodo de intervención dietética (Pre-intervención). Para el estudio de la función postprandial adipositaria, se recogieron muestras en ayunas al inicio del estudio y después de 12 semanas de la intervención dietética, así como

a las 4 horas después de la administración de la sobrecarga grasa administrada después de las 12 semanas de intervención dietética y se almacenaron a -80 °C.

3.5.1. Extracción del ARN de tejido adiposo

El tejido adiposo se homogeneizó mediante Ultra-Turrax T25 (*IKA Labortechnik*). Tras la retirada de los lípidos de la parte superior del tubo, se aisló el ARN con el kit comercial *RiboPure kit* (*Ambion*) que está diseñado para una purificación de ARN rápida y de alta calidad. El ARN se recogió de la fase acuosa mediante unión a un filtro de fibra de vidrio. La cuantificación del ARN se realizó usando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (*Nanodrop Technology®*, *Cambridge, UK*).

3.5.2. Transcripción inversa

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) tras la amplificación y retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Message BOOSTER cDNA Synthesis Kit* para qPCR (*Epicentre, EE.UU.*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se amplificó 500 pg de ARN total que luego se convirtió en ADNc. Se ajustó la cantidad de reacción a 20 µl. Las condiciones de incubación utilizados en el termociclador *MJ Thermal Cycler Personal mini™ closure* (*BioRad Inc., Hercules, CA, EE.UU.*) fueron:

25 °C por 5 min.

42 °C por 30 min.

85 °C por 5 min.

Se guardaron las muestras con el ADN copia (cDNA) a -80 °C, hasta llevar a cabo la PCR a tiempo real.

3.6. Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR semicuantitativa en tiempo real mediante la plataforma OpenArray Real-Time PCR (Applied Biosystems).

La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando la plataforma *OpenArray™ NT Cyclor System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)*. Este sistema de análisis de expresión génica utiliza como método para cuantificación las sondas TaqMan. Por otra parte se basa en la característica de multireacción (2088 reacciones por array) y multiarray (2 arrays por carrera). Esto permite estudiar una mayor cantidad de genes en una mayor cantidad de muestras, en un menor tiempo y menor consumo de reactivos.

Se utilizó el formato de array *TaqMan® OpenArray® RT PCR Inventoried Format 56*, el cual permite el análisis de 53 genes de interés, más 3 genes constitutivos en grupos de 24 muestras por duplicado. Considerando que cada array se configura en un formato 12 X 4, para un total de 48 subarrays. En cada subarray se encuentran 64 pocillos para un total de 3.072 pocillos de reacción y en los que se encontrarían los cebadores específicos para cada uno de los genes de interés. Los cebadores que amplificarían los genes de interés fueron seleccionados de la base de datos *TaqMan Gene expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)*:

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>, en la ficha assays search teniendo como criterios de búsqueda: selección en homo sapiens y gene expression assays para cada uno de los genes de interés que se detallan a continuación:

CMSP

La expresión relativa para cada gen, fue calculada utilizando el gen constitutivo *GADPH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Los genes analizados fueron: *NFE2L2* (nuclear factor erythroid-derived 2-like 2), *SOD1* (superoxide dismutase 1), *SOD2* (superoxide dismutase 2), *CAT* (catalase), *GPx1* (glutathione peroxidase 1), *GPx4* (glutathione peroxidase 4), *GSR* (glutathione

reductase), *TXN* (thioredoxin) and *TXNRD1* (thioredoxin reductase 1), las subunidades de la *NADPH oxidasa* (*gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* and *p40^{phox}*) y el factor de transcripción *PU.1*.

Tejido adiposo

La expresión relativa para cada gen, fue calculada utilizando el gen constitutive *RPLP0* (ribosomal protein, large, P0). Los genes analizados fueron: *NFE2L2* (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), *KEAPI* (kelch-like ECH-associated protein 1), *SOD1* (superoxide dismutase 1), *SOD2* (superoxide dismutase 2), *CAT* (catalase), *GPx1* (glutathione peroxidase 1), *GPx3* (glutathione peroxidase 3), *GPx4* (glutathione peroxidase 4), *GSR* (glutathione reductase), *TXN* (thioredoxin), *TXNRD1* (thioredoxin reductase 1) y las subunidades de la *NADPH oxidasa* (*gp91^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* and *p40^{phox}*) y el factor de transcripción *PU.1*.

Cada reacción constaba de 1,2 µL de cDNA 1:2 (v/v) mezclado con 3,8 µL de *GeneAmp Fast PCR Master mix* (2,5 µL *ABI Gene Amp Master Mix*, 1 µL *Remix*, 0,30 µL de Agua MQ). Las muestras fueron cargadas en el array utilizando el *OpenArray™ NT Autoloader* siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada subarray se cargó con aproximadamente 5 µL de mezcla de reacción, es decir cada uno de los pocillos del subarray contendría 33 nL de volumen total.

3.6.1. Análisis de la expresión génica

Los valores de CT obtenidos para cada uno de los genes y en cada una de las muestras se obtuvieron mediante el software *OpenArray® Real-Time qPCR Analysis Software* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA*) para obtener los datos de expresión relativa. Este mismo programa permitió la selección del gen constitutivo con menor variabilidad entre las muestras procesadas para posteriormente utilizarlo en la normalización de la expresión de los genes estudiados.

3.7. Análisis Proteómico Bidimensional (2D-PAGE)

3.7.1. Extracción de proteínas de CMSP

Los extractos proteicos de las fracciones nucleares y citoplasmáticas de CMSP, fueron obtenidas siguiendo el procedimiento descrito previamente por Hernández-Presa et al [151]. Las muestras se descongelaron en hielo durante 15 minutos, se agitaron en vórtex durante 20 minutos y se centrifugaron a 15.000 x g durante 5 min a 4 °C, la fracción citoplasmática se recogió del sobrenadante y se almacenaron a -80 °C. El pellet se resuspendió en 100 µl de tampón de lisis C (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 mg/ml CLAP) y se incubó en hielo durante 20 minutos. Las muestras se agitaron en vórtex cada 5 minutos durante 30 segundos a lo largo del período de incubación. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g, durante 5 min a 4 °C. Se recogieron las proteínas nucleares del sobrenadante obtenido y se almacenaron a -80 °C. Las proteínas extraídas se cuantificaron por el método de Bradford utilizando *Dye Reagent Protein* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) según las instrucciones del fabricante.

3.7.2. Electroforesis Bidimensional

Se seleccionaron 6 sujetos por dieta en cada fracción (citoplasma y núcleo) para realizar la electroforesis bidimensional (2D-PAGE) en geles de poliacrilamida, se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Görg, et al [152]. Para eliminar sales y restos celulares contaminantes que pudieran existir tras el aislamiento, las muestras de proteínas se purificaron con el kit *Ready Prep 2-D Cleanup Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. El Isoelectroenfoco (IEF) se realizó en tiras de 11cm pH 3-10 con gradiente de pH lineal inmovilizado (IPG). Cada tira se rehidrató durante la noche con 200 µg de proteína en 200 µL de tampón de rehidratación (urea 8 M, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0,2% *Bio-Lyte 3/10* anfólito y 0,002% azul de bromofenol). El IEF se realizó en un *Protean IEF Cell* (Bio-Rad Laboratories) bajo las siguientes condiciones: Rampa Lenta, 250 V (15 min), 8000 V (5 h, de gradiente lineal), 8000 V hasta 26.000 Vh, para un total

de 40.000 Vh. Después de IEF, las tiras se incubaron 10 min en tampón de equilibrio I [6 M de urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 2% SDS, 20% de glicerol, 2% (w / v) TDT] y luego por otros 20 minutos en tampón de equilibrio II [6 M de urea, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8; 2% de glicerol, 2,5% (w / v) yodoacetamida]. Antes de la SDS-PAGE los Geles *Criterion XT Precast Bis-Tris* al 12% de 1 mm de espesor se montaron en una *Criterion Dodeca Cell* y se ejecutó la separación de proteínas en tampón MOPS al 1X a 180V.

Los geles fueron teñidos durante la noche en la oscuridad con *SYPRO Ruby* y la fijación de las proteínas se llevó a cabo en metanol al 40% y ácido acético al 10% durante 2 h. Antes de la adquisición de imágenes, los geles se lavaron en metanol al 40% y ácido acético al 10%, 2 veces durante 1 h y una vez en agua destilada durante 30 minutos.

3.7.3. Adquisición de imágenes y detección de spots

Los geles teñidos con *SYPRO Ruby* se visualizaron con luz UV a través del sistema *ChemiDocs XRS (Bio-Rad Laboratories)*. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software *Quantity One 16.0 (Bio-Rad Laboratories)*. Los spots se detectaron con el software *PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories)*. Los parámetros de detección de spots fueron los siguientes: Sensibilidad de detección = 6,0, Tamaño de la escala = 5, Promedio máximo = 2000, Sensibilidad de filtro para speakles = 70,0, Suavidad: tipo de filtro = medio, tamaño = 3x3, método Floating ball y radio de fondo = 67, radio de líneas verticales y horizontales = 111. El método de normalización elegido fue la cantidad total de spots válidos. Las imágenes de los geles de 6 sujetos por cada dieta del tiempo Pre 0 (en ayunas antes del inicio de periodo de intervención dietética) se compararon con las imágenes correspondientes al tiempo Pre 4 (en estado postprandial antes del inicio de periodo de intervención dietética).

3.7.4. Recorte de proteínas del gel, digestión enzimática e identificación por Espectrometría de Masas MALDI-TOF-TOF

Los spots se picaron automáticamente en una estación *Pro-Pic* (Genomic Solutions, Huntingdon, UK) y sometidos a análisis de espectrometría de masas (MS). Para el análisis MALDI-TOF-MS, los geles fueron desteñidos 2 veces (30 min a 37 °C) con 200 mM de bicarbonato de amonio/acetoneitrilo al 40%. Los fragmentos de gel deshidratados durante 5 min con acetoneitrilo puro y secados durante 4 h, fueron automáticamente digeridos con tripsina de acuerdo con los protocolos estándar en una estación *ProGest* (Gnomic Solutions). El análisis MS y MS/MS de los péptidos obtenidos se llevaron a cabo en una Proteomics Station 4700 (Applied Biosystems, CA, USA). La espectrometría de masas *MALDI TOF / TOF* de las proteínas seleccionadas se realizó en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, el cual pertenece al Nodo 6 del Consorcio ProteoRed financiado por Genoma España y forma parte de la Plataforma Andaluza de Genómica, Proteómica y Bioinformática.

3.7.5. Análisis de las rutas metabólicas afectadas por el tipo de grasa en la comida ingerida

Con el fin de investigar las relaciones funcionales en el conjunto de proteínas expresadas diferencialmente, se utilizó el software Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA.) [153], que emplea una base de conocimiento predefinido, la cual contiene más de 10.000 genes humanos. El análisis de redes dio como resultado 15 subredes diferentes. De las 10 proteínas expresadas diferencialmente que se observaron tras la ingesta de la comida HSFA, 2 proteínas (PSME1, ZFP2) fueron descartadas para el análisis de redes, el cual proporcionó 6 subredes. Respecto a la comida HMUFA, de las seis proteínas, dos de ellas (CCDC150, Serpin B1) fueron descartadas para el análisis de redes que proporcionó 4 subredes. Para la comida LFHCC, de las cinco proteínas, dos de ellas (HSPA6, MYL12A) fueron descartadas y se obtuvieron 3 subredes. Para la comida LFHCC n-3, de las cinco proteínas, tres proteínas (ALDH2, CAPZB y

ECH1) fueron descartadas y el análisis proporcionó 2 subredes. Posteriormente, construimos dos redes fusionando aquellas subredes que compartían una o más proteínas.

3.8. Validación de experimentos por Western Blot

3.8.1. Validación de los resultados de la proteómica

Los anticuerpos comerciales utilizados para la validación de los experimentos de Western blot fueron suministrados por *Santa Cruz Biotechnology, Inc* (*Santa Cruz, CA, USA.*). Se cargaron 40 µg de proteína tanto de la fracción citoplasmática como de la nuclear de cada sujeto (8 pacientes que consumieron la comida HSFA, 9 pacientes que consumieron la HMUFA, 12 pacientes que consumieron la comida LFHCC y 10 pacientes que consumieron la comida LFHCC n-3) en geles de SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron bloqueadas con solución trisbuffered salino al 1X y Tween 20 (TBS-T) que contiene 2% de albúmina de suero bovino, seguido de incubación con los anticuerpos primarios diluido en TBS-T en las concentraciones indicadas por el fabricante: Trombospondin 1/2 (H-300: rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), NAP1L1 ((2609C3a): mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), HSP706 (C-17: goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), Ezrin (H-276: rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), Plectin 1 (H-80: rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), Septin 2 (N-12: goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), Myosin (MRCL3/MRLC2/MYL9) (E-4: mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.). Después del lavado, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario IgG-HRP conjugado apropiado. Las membranas se incubaron durante 2 min con *SuperSignal West Pico sustrato ECL* (*Thermo Scientific*) para la detección de la proteína. Las imágenes fueron adquiridas en un *Molecular Imager ChemyDoc XRS* (*Bio-Rad Laboratories*), y el análisis de la densidad de banda se llevó a cabo con *QuantityOne* software V (*Bio-Rad*

Laboratories). La intensidad de la señal de las bandas se normalizó por la proteína total en las membranas, que se midió por el método de tinción de Ponceau S.

3.8.2. Determinación de niveles de proteínas NFE2L2 Y KEAP1 en CMSP mediante Western Blot

Se seleccionaron 10 sujetos por dieta, a excepción de los sujetos de la dieta HSFA, de los cuales utilizamos muestras de 6 sujetos pertenecientes al grupo de la dieta HSFA, debido a la mala calidad de las muestras. Para el Western Blot se utilizaron tanto extractos citosólicos como nucleares. Se cargaron 40 µg de proteína tanto de la fracción citoplasmática como de la nuclear. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida (14% poliacrilamida) para conseguir una mejor separación de las proteínas citoplasmáticas y geles prediseñados Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gels (10% poliacrilamida) de BioRad para proteínas nucleares. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT Membrane; PALL Gelman Laboratory) mediante transferencia semi-seca. Las membranas se tiñeron con Ponceau-S para verificar la correcta transferencia de las proteínas y fueron escaneadas con el fin de cuantificar la proteína total cargada. Posteriormente, las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS durante 15 min cada uno y bloqueadas con BSA al 3%. Se incubaron en agitación a 4 °C durante la noche con los siguientes anticuerpos primarios: diluido en TTBS solamente (para eliminar mejor restos de BSA) en concentraciones indicadas por el fabricante: NFE2L2 (C-20: rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), Keap1 (H-190: rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.), TFIIB (C-18: rabbit polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.) y β-actina (C-2: mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, inc.). Posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios IgG-HRP conjugado apropiado, en TTBS solamente. Las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta incubación se procedió al lavado de la membrana: tres veces con TTBS durante 15 min cada uno. Para el revelado se usó un kit de quimioluminiscencia (Immun-Star™ WesternC™) con el cual se

incubaron las membranas durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se revelaron con el *CHEMI DOC XRS* (BIORAD, Barcelona, España), que realiza fotografías a las membranas a distintos tiempos de incubación. Los niveles de proteínas fueron cuantificados mediante el programa *Image Lab*™ versión 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

3.9. Análisis estadístico

El programa estadístico utilizado fue el PASW Statistics, Versión 18 (Chicago, IL, USA). La distribución normal de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, siendo transformadas logarítmicamente todas aquellas variables que no cumplieran los criterios de normalidad. Con el fin de detectar variaciones significativas entre grupos se realizó un test de t de Student y un análisis de la varianza para medidas repetidas (ANOVA) seguido de la corrección de Bonferroni para las comparaciones múltiples. En este último análisis, estudiamos el efecto de la dieta o la sobrecarga grasa en el estudio postprandial administrada independientemente del tiempo (representado como *P1 dieta*); el efecto del tiempo y también los cambios de esta variable después del periodo de intervención dietética y la sobrecarga grasa del estudio sobre el periodo postprandial (representado como *P2 tiempo*). Además, se estudió el efecto de la interacción entre las distintas dietas consumidas y el tiempo, lo cual es indicativo de la magnitud de la respuesta postprandial de cada sobrecarga grasa (representado como *P3 interacción dieta-tiempo*). El contraste estadístico usado cuando el criterio de esfericidad no se cumplía fue el de *Greenhouse Geisser*. Además, para determinar la correlación existente de los biomarcadores de estrés oxidativo, lípidos plasmáticos y datos de expresión génica se usó el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Las variables tales como las características antropométricas y los parámetros lipídicos basales y niveles postprandiales de las proteínas NFE2L2 y KEAP1 (citoplasma y núcleo) fueron analizadas mediante ANOVA de un factor para determinar el efecto de la dieta. Se consideraron

significativos los valores de $P < 0,05$. Los datos en el texto, las tablas y las figuras están expresados como $\text{media} \pm \text{error estándar de la media}$. El análisis en geles 2-D se llevó a cabo por el software de *PDQuest (Bio-Rad Laboratories)*, versión 8.0. Se llevaron a cabo correcciones manuales para validar los emparejamientos generados automáticamente por el software. Los valores del volumen de los spots se normalizaron en cada gel, dividiendo la cantidad en bruto de cada spot por el volumen total de todos los spots incluidos en el mismo gel. Otras normalizaciones proporcionadas por el software *PDQuest* también se llevaron a cabo con resultados similares. Las variaciones de todos los spots identificados fueron finalmente confirmadas y cuantificadas mediante medidas de densidad utilizando el software *ImageJ 1,40 g*.

VI. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Las características antropométricas y los parámetros lipídicos basales de los pacientes que participaron en el estudio se muestran en la **Tabla 5**. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los 4 grupos asignados a las distintas dietas.

Tabla 5. Características basales de los pacientes con SMet que completaron el estudio. Los valores están expresados como media±error estándar de la media. Los valores de P corresponden al análisis ANOVA de un factor.

	HSFA (n=17)	HMUFA (n=18)	LFHCC (n=20)	LFHCC n-3 (n=20)	P
Edad	58,6±1,9	54,6±1,9	56,4±1,9	55,3±1,5	0,435
IMC (kg/m ²)	35,3±0,9	34,5±0,9	35,4±0,7	35,0±0,8	0,856
PC (cm)	110,9±2,1	106,4±1,9	107,9±2,3	108,9±1,9	0,507
CT (mg/dL)	200,0±9,9	189,1±7,0	207,2±10,4	189,5±8,0	0,405
TG total (mg/dL)	171,1±33,3	143,7±13,4	144,5±13,0	138,4±14,3	0,654
LDL-c (mg/dL)	136,1±7,7	131,6±5,7	147,6±8,6	131,5±7,7	0,374
HDL-c (mg/dL)	43,2±2,5	44,6±2,4	44,6±2,3	42,1±1,9	0,834
Glucosa (mg/dL)	109,9±3,9	112,3±4,5	102,8±2,3	117,8±7,2	0,173

IMC: índice de masa corporal

PC: perímetro de cintura

CT: colesterol total

TG: triglicéridos

LDL-c: colesterol vehiculizado por lipoproteínas de baja densidad

HDL-c: colesterol vehiculizado por lipoproteínas de alta densidad.

2. EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO ADIPOSO. EFECTO DEL CONSUMO A LARGO PLAZO DE CUATRO MODELOS DE DIETAS CON DIFERENTE CANTIDAD Y TIPO DE GRASA

En este estudio hemos analizado el efecto del consumo a largo plazo de cuatro dietas con diferente cantidad y tipo de grasa (HSFA, HMUFA, LFHCC y LFHCC n3) administradas durante 12 semanas en la expresión, tanto en ayunas como en estado postprandial, de genes involucrados en el estrés oxidativo en el tejido adiposo de un subgrupo de 39 pacientes con SMet. Para llevar a cabo el estudio postprandial, tras el periodo de intervención dietética, se administró una

sobrecarga grasa en forma de una comida con la misma composición grasa que la dieta a la que cada individuo fue asignado.

2.1. Efecto de la dieta en la expresión génica de las subunidades de la NADPH-oxidasa en tejido adiposo.

En primer lugar, se analizó la expresión génica del factor de transcripción *PU.1* y las subunidades de la NADPH-oxidasa (*gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}* y *p40^{phox}*), un complejo enzimático que cataliza la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y está localizado en la membrana plasmática de células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos), aunque también se encuentra en las células no fagocíticas del tejido adiposo [18, 19].

El consumo a largo plazo de la dieta HSFA aumentó los niveles en ayunas del ARNm de las subunidades *gp91^{phox}*, *p67^{phox}* y *p47^{phox}* (P=0,042, P=0,011 y P=0,019, respectivamente). El consumo a largo plazo de la dieta HMUFA aumentó los niveles en ayunas del ARNm de *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, y *p47^{phox}* (P<0,001, P<0,001 y P=0,009, respectivamente), mientras que la ingesta de la dieta LFHCC incrementó los niveles en ayunas del ARNm de *p22^{phox}* (P=0,021), y la dieta LFHCC n-3 aumentó los niveles en ayunas del ARNm de *p67^{phox}* (P<0,001).

El análisis post hoc mostró que tras el periodo de intervención dietética, los niveles en ayunas del ARNm de *p22^{phox}* tras el consumo de las dietas HMUFA (P=0,027) y LFHCC (P=0,008) eran mayores que tras el consumo de la dieta HSFA. Además, los niveles en ayunas del ARNm de *p67^{phox}* fueron mayores tras la dieta LFHCC n-3 que tras la dieta LFHCC (P=0,020). Los resultados se detallan en la **Tabla 6**.

Los niveles en ayunas del ARNm del factor de transcripción *PU.1*, no fueron detectables.

Tabla 6. Niveles en ayunas de ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox} en tejido adiposo de pacientes con Síndrome Metabólico. Los valores representan la media \pm error estándar (SE), de los niveles de ARNm en estado de ayunas al inicio y tras finalizar el periodo de intervención dietética.

	Dietas	gp91 ^{phox}	p22 ^{phox}	p67 ^{phox}	p47 ^{phox}	p40 ^{phox}
Pre-intervención Ayunas (0h)	HSFA	0,032 \pm 0,007	0,034 \pm 0,006	0,018 \pm 0,004	0,008 \pm 0,002	0,063 \pm 0,010
	HMUFA	0,067 \pm 0,014	0,051 \pm 0,008	0,007 \pm 0,001	0,008 \pm 0,002	0,064 \pm 0,012
	LFHCC	0,108 \pm 0,010	0,073 \pm 0,007	0,030 \pm 0,008	0,016 \pm 0,004	0,071 \pm 0,007
	LFHCC-n-3	0,136 \pm 0,025	0,057 \pm 0,009	0,016 \pm 0,003	0,022 \pm 0,005	0,094 \pm 0,017
Post-intervención Ayunas (0h)	HSFA	0,120 \pm 0,020 [*]	0,047 \pm 0,009	0,059 \pm 0,008 ^{ab*}	0,022 \pm 0,004 [*]	0,075 \pm 0,019
	HMUFA	0,132 \pm 0,024	0,123 \pm 0,025 ^{&*}	0,064 \pm 0,017 ^{ab*}	0,020 \pm 0,003 [*]	0,073 \pm 0,016
	LFHCC	0,169 \pm 0,046	0,108 \pm 0,014 ^{&*}	0,032 \pm 0,005 ^a	0,026 \pm 0,004	0,066 \pm 0,007
	LFHCC-n-3	0,131 \pm 0,034	0,066 \pm 0,016	0,088 \pm 0,020 ^{b*}	0,027 \pm 0,006	0,077 \pm 0,010
Valores P						
	Efecto Dieta	0,131	0,005	0,112	0,072	0,486
	Efecto Tiempo	0,011	0,001	<0,001	<0,001	0,980
	Interacción dieta-tiempo	0,398	0,055	0,006	0,476	0,622

HSFA: dieta rica en grasa saturada; HMUFA: dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCCn-3: dieta baja en grasa y alta en hidratos de carbono complejos con 1,24 g / día PUFAn-3.

Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 39). Símbolos de las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni: los superíndices con distintas letras difieren significativamente, P<0,05. ^{*} significa efecto significativo del tiempo (P<0,05) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno previo a la intervención. [&] significa P<0,05 entre la dieta HSFA y la dieta indicada, las dos determinaciones en ayunas en conjunto.

2.2. Efecto de la dieta en la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa antioxidante en tejido adiposo.

En este estudio hemos analizado la expresión de los genes implicados en la defensa antioxidante *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx3*, *GPx4*, *GSR*, *TXN*, *TXNRD1*, así como de los genes reguladores *NFE2L2* y *KEAP1*. En ausencia de estrés, *NFE2L2* se encuentra retenido por *KEAP1* en el citoplasma [46-48], no obstante en condiciones de estrés oxidativo, inicia el proceso por el que *NFE2L2* se libera de *KEAP1* y se transloca al núcleo [46], donde *NFE2L2* se une a *ARE* y activa la transcripción de genes antioxidantes encargados de la detoxificación y eliminación de ROS [47, 48].

El consumo a largo plazo de las dietas HSFA (P=0,014), HMUFA (P=0,006) y LFHCC (P=0,013) aumentaron los niveles en ayunas del ARNm de la *SOD1*, mientras que los niveles en ayunas del ARNm de la enzima *SOD2* tras el consumo de la dieta HSFA eran mayores que tras el consumo de las demás dietas administradas (HMUFA P<0,001, LFHCC P=0,013, y LFHCC P<0,001) (**Tabla 7**).

El consumo a largo plazo de la dieta LFHCC n-3 disminuyó los niveles en ayunas del ARNm de *CAT* (P=0,007), mientras que el consumo de la dieta HSFA provocó su aumento (P<0,001), de manera que el incremento tras el consumo de la dieta HSFA, fue mayor que tras el consumo de las dietas HMUFA (P<0,001), LFHCC (P=0,004) y LFHCC n-3 (P<0,001). Además, el análisis post hoc mostró que tras la administración de la dieta HSFA, el aumento de los niveles en ayunas del ARNm de *CAT* fueron mayores que tras las dietas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 (todas P<0,001) (**Tabla 7**).

El consumo a largo plazo de las cuatro dietas aumentó los niveles del ARNm en ayunas de la glutatión peroxidasa 1 (*GPx1*) (todas P<0,001). Sin embargo, el aumento de los niveles en ayunas del ARNm de *GPx1* fue mayor tras el consumo de la dieta HSFA que tras el consumo de la dietas HMUFA (P=0,006), LFHCC (P=0,006) y LFHCC n-3 (P=0,039). Los niveles en ayunas del ARNm de

GPx3, una isoforma extracelular de la glutatión peroxidasa, aumentaron tras el consumo a largo plazo de la dieta HSFA ($P<0,001$), de manera que este incremento fue mayor que tras el consumo de las dietas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 (todas $P<0,001$). El análisis post hoc mostró que tras el periodo de intervención dietética, los niveles en ayunas del ARNm de *GPx3* eran mayores tras el consumo de la dieta HSFA que tras el consumo de las dietas HMUFA ($P=0,002$), LFHCC y LFHCC n-3 (ambas, $P<0,001$). El consumo a largo plazo de la dieta HSFA disminuyó los niveles en ayunas del ARNm de *GPx4*, una peroxidasa lipídica ($P<0,001$), mientras que se mantuvo sin cambios tras el consumo de las demás dietas (**Tabla 7**).

El consumo a largo plazo de la dieta HSFA aumentó los niveles en ayunas del ARNm de *TXNRD1* ($P<0,001$), de manera que éstos fueron mayores que los observados tras el consumo de las dietas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 (todas, $P<0,001$) (**Tabla 7**). No se encontraron diferencias significativas en los niveles en ayunas del ARNm de los genes *TXN*, *NFE2L2* y *KEAP1* tras el consumo de ninguna de las cuatro dietas (**Tabla 7**).

Los niveles en ayunas del ARNm de GSR, no fueron detectables.

Tabla 7. Niveles en ayunas de ARNm de NFE2L2, Keap1, SOD1, SOD2, CAT, GPx1, GPx3, GPx4, TXN, and TXNRD1 en tejido adiposo de pacientes con Síndrome Metabólico. Los valores representan la media \pm error estándar (SE), de los niveles de ARNm en estado de ayunas al inicio y tras finalizar el periodo de intervención dietética.

		DIETA				valores P		
Genes		HSFA	HMUFA	LFHCC	LFHCC-n-3	Efecto dieta	Efecto tiempo	Efecto dieta-tiempo
Keap1	Pre	0,12 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,15 \pm 0,04	0,539	0,209	0,108
	Post	0,16 \pm 0,04*	0,16 \pm 0,05*	0,10 \pm 0,01*	0,13 \pm 0,03			
NFE2L2	Pre	3,04 \pm 0,38	2,68 \pm 0,38	2,92 \pm 0,53	3,82 \pm 0,46	0,188	0,721	0,727
	Post	2,34 \pm 0,49*	3,18 \pm 0,63*	2,86 \pm 0,32*	3,55 \pm 0,59			
SOD1	Pre	0,60 \pm 0,18	0,70 \pm 0,13	0,85 \pm 0,16	1,09 \pm 0,21	0,959	<0,001	0,657
	Post	1,74 \pm 0,54*	1,93 \pm 0,43*	1,79 \pm 0,34*	1,63 \pm 0,41			
SOD2	Pre	1,75 \pm 0,36	0,89 \pm 0,17	1,21 \pm 0,21	1,16 \pm 0,30	<0,001	0,120	0,072
	Post	3,17 \pm 0,74 ^a	0,95 \pm 0,12 ^b	1,80 \pm 0,29 ^b	0,66 \pm 0,08 ^b			
CAT	Pre	3,54 \pm 0,71	2,48 \pm 0,34	3,88 \pm 0,55	3,75 \pm 0,45	<0,001	0,032	<0,001
	Post	7,82 \pm 0,58 ^{a*}	3,20 \pm 0,38 ^{b&}	3,23 \pm 0,35 ^{b&}	2,03 \pm 0,58 ^{b&*}			
GPx1	Pre	7,43 \pm 1,04	0,19 \pm 0,08	0,94 \pm 0,36	0,06 \pm 0,02	0,003	<0,001	0,087
	Post	83,66 \pm 8,41 ^{a*}	49,20 \pm 8,08 ^{b*}	51,20 \pm 5,11 ^{b*}	45,10 \pm 5,63 ^{b*}			
GPx3	Pre	0,032 \pm 0,006	0,019 \pm 0,004	0,021 \pm 0,002	0,017 \pm 0,001	<0,001	<0,001	0,001
	Post	0,118 \pm 0,026 ^{a*}	0,043 \pm 0,011 ^{b&}	0,036 \pm 0,004 ^{b&}	0,022 \pm 0,003 ^{b&}			
GPx4	Pre	7,18 \pm 0,75	4,03 \pm 0,68	4,64 \pm 0,63	3,05 \pm 0,70	0,075	0,582	0,001
	Post	3,41 \pm 0,73*	5,33 \pm 0,45	5,26 \pm 0,55	3,95 \pm 0,58			
TXN	Pre	0,30 \pm 0,08	0,28 \pm 0,04	0,34 \pm 0,04	0,39 \pm 0,05	0,331	0,401	0,597
	Post	0,28 \pm 0,07	0,41 \pm 0,09	0,31 \pm 0,07	0,49 \pm 0,14			
TXNRD1	Pre	0,052 \pm 0,007	0,034 \pm 0,007	0,036 \pm 0,009	0,037 \pm 0,009	<0,001	<0,001	<0,001
	Post	0,504 \pm 0,071 ^{a*}	0,094 \pm 0,035 ^{b&}	0,047 \pm 0,016 ^{b&}	0,089 \pm 0,023 ^{b&}			

Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 39). Pre: Pre-intervención; Post: Post-intervención. Símbolos de las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni: los superíndices con distintas letras difieren significativamente, P <0,05; * significa efecto significativo del tiempo (P <0,05) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno previo a la intervención; & significa P <0,05 entre la dieta HSFA y la dieta indicada, las dos determinaciones en ayunas en conjunto.

2.3. Expresión génica postprandial de las subunidades de la NADPH-oxidasa en tejido adiposo.

Nuestro estudio mostró que la ingesta de la comida HSFA aumentó los niveles postprandiales del ARNm de *gp91^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}* y *p40^{phox}* ($P < 0,001$, $P < 0,001$, $P = 0,001$ y $P < 0,001$, respectivamente) (**Tabla 8**). Así mismo, se observó un incremento postprandial en los niveles del ARNm de *p47^{phox}* tras la ingesta de las comidas HMUFA y LFHCC ($P < 0,001$ y $P = 0,010$), mientras que los niveles del ARNm de *p40^{phox}* aumentaron tras la ingesta de las comidas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 ($P < 0,001$, $P = 0,002$ y $P = 0,034$, respectivamente).

La ingesta de la comida HSFA aumentó los niveles del ARNm de *gp91^{phox}*, en comparación con la ingesta de la comida LFHCC n-3 ($P = 0,048$). Así mismo, el aumento en los niveles del ARNm de *p67^{phox}* tras la ingesta de la comida HSFA fue mayor que tras el consumo de en MUFA ($P = 0,045$), LFHCC ($P = 0,005$) y LFHCC n-3 ($P = 0,012$) (**Tabla 8**). Por el contrario, se observó un descenso postprandial en los niveles del ARNm de *p22^{phox}* tras la ingesta de la comida HSFA, en comparación con la ingesta de las comidas LFHCC ($P < 0,001$) y LFHCC n-3 ($P = 0,010$). Además, observamos que los niveles del ARNm de *p22^{phox}* tras la ingesta de la comida HSFA eran mayores que tras la ingesta de la comida HMUFA ($P = 0,006$) (**Tabla 8**).

El análisis post hoc mostró que la ingesta de la comida HSFA produjo un aumento postprandial de los niveles del ARNm de *gp91^{phox}* y *p67^{phox}* en comparación con la ingesta de las comidas HMUFA ($P = 0,003$ y $P = 0,039$), LFHCC ($P = 0,007$ y $P = 0,009$) y LFHCC n-3 ($P = 0,001$ y $P = 0,006$).

Los niveles postprandiales del ARNm del factor de transcripción PU.1, no fueron detectables.

Tabla 8. Expresión génica postprandial de la expresión génica de las subunidades de la NADPH-oxidasa (gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}) en tejido adiposo de pacientes con Síndrome Metabólico. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). Diferencia postprandial post-intervención entre los niveles de ARNm de los tiempos 0 y 4. Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 39).

Genes	DIETA				valores P		
	HSFA	HMUFA	LFHCC	LFHCC-n-3	Efecto dieta	Efecto tiempo	Efecto dieta-tiempo
gp91 ^{phox}	0,231 \pm 0,044 ^{a*}	0,034 \pm 0,035 ^{ab‡}	0,020 \pm 0,062 ^{ab‡}	0,013 \pm 0,044 ^{b‡}	0,038	0,007	0,021
p22 ^{phox}	-0,004 \pm 0,010	-0,026 \pm 0,037 [‡]	0,035 \pm 0,040 [‡]	0,082 \pm 0,033 [‡]	<0,001	0,229	0,183
p67 ^{phox}	0,527 \pm 0,153 ^{a*}	0,137 \pm 0,093 ^{b‡}	0,125 \pm 0,052 ^{b‡}	0,022 \pm 0,066 ^{b‡}	0,004	<0,001	0,004
p47 ^{phox}	0,558 \pm 0,200 [*]	0,600 \pm 0,104 [*]	0,342 \pm 0,148 [*]	0,250 \pm 0,079	0,867	<0,001	0,266
p40 ^{phox}	0,320 \pm 0,055 [*]	0,218 \pm 0,041 [*]	0,162 \pm 0,063 [*]	0,121 \pm 0,039 [*]	0,071	<0,001	0,090

P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. Símbolos de las pruebas de comparaciones múltiples de Bonferroni: los superíndices con distintas letras difieren significativamente, P<0,05; * Significa que el efecto del tiempo significativo (P<0,05) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno posterior a la intervención. ‡ significa P<0,05 entre la dieta HSFA y la dieta indicada, las dos mediciones post-intervención en conjunto.

2.4. Expresión postprandial de genes relacionados con el sistema de defensa antioxidante en tejido adiposo.

Nuestro estudio mostró un aumento postprandial en los niveles del ARNm de la isoforma mitocondrial de la *SOD2*, independientemente de la comida administrada a los pacientes (todas, $P < 0,05$) (**Figura 8B**). El aumento postprandial de la *SOD2* fue mayor tras la ingesta de la comida HSFA que tras la ingesta de las comidas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 (todas, $P < 0,001$). No obstante, no se encontraron cambios significativos en la expresión de la isoforma citoplasmática (*SOD1*) (**Figura 8A**). La ingesta de las comidas HSFA y LFHCC redujeron los niveles postprandiales del ARNm de *CAT* ($P < 0,001$ y $P = 0,030$, respectivamente) (**Figura 8C**). No obstante, el incremento postprandial que observamos en los niveles del ARNm de *CAT* después de la ingesta de la comida HMUFA fue estadísticamente significativo comparado con el descenso postprandial de los niveles del ARNm de *CAT* tras la ingesta de las comidas HSFA ($P = 0,002$) y LFHCC ($P = 0,013$). Además, el descenso postprandial en los niveles del ARNm de *CAT* tras el consumo de la comida HSFA fue mayor comparado con el que se observó tras el consumo de las comidas LFHCC y LFHCC n-3 ($P = 0,037$ y $P = 0,014$, respectivamente). Los niveles postprandiales del ARNm de *GPx1* disminuyeron tras la ingesta de la comida HSFA ($P = 0,001$) y aumentaron tras la ingesta de la comida HMUFA ($P = 0,018$), de manera que este aumento en los niveles del ARNm de *GPx1* fue mayor tras la ingesta de la comida HMUFA que tras el consumo de las comidas HSFA ($P = 0,004$), LFHCC ($P = 0,005$) y LFHCC n-3 ($P = 0,002$) (**Figura 8D**). La ingesta de la comida HSFA redujo los niveles postprandiales del ARNm de *GPx3* en comparación con el consumo de las comidas HMUFA ($P = 0,037$), LFHCC ($P = 0,001$) y LFHCC n-3 ($P = 0,003$) (**Figura 8E**). Por el contrario, el aumento postprandial en los niveles del ARNm de *GPx4* tras la ingesta de la comida HSFA fue mayor que tras la ingesta de las comidas HMUFA ($P = 0,049$), LFHCC ($P = 0,025$) y LFHCC n-3 ($P < 0,001$) (**Figura 8F**).

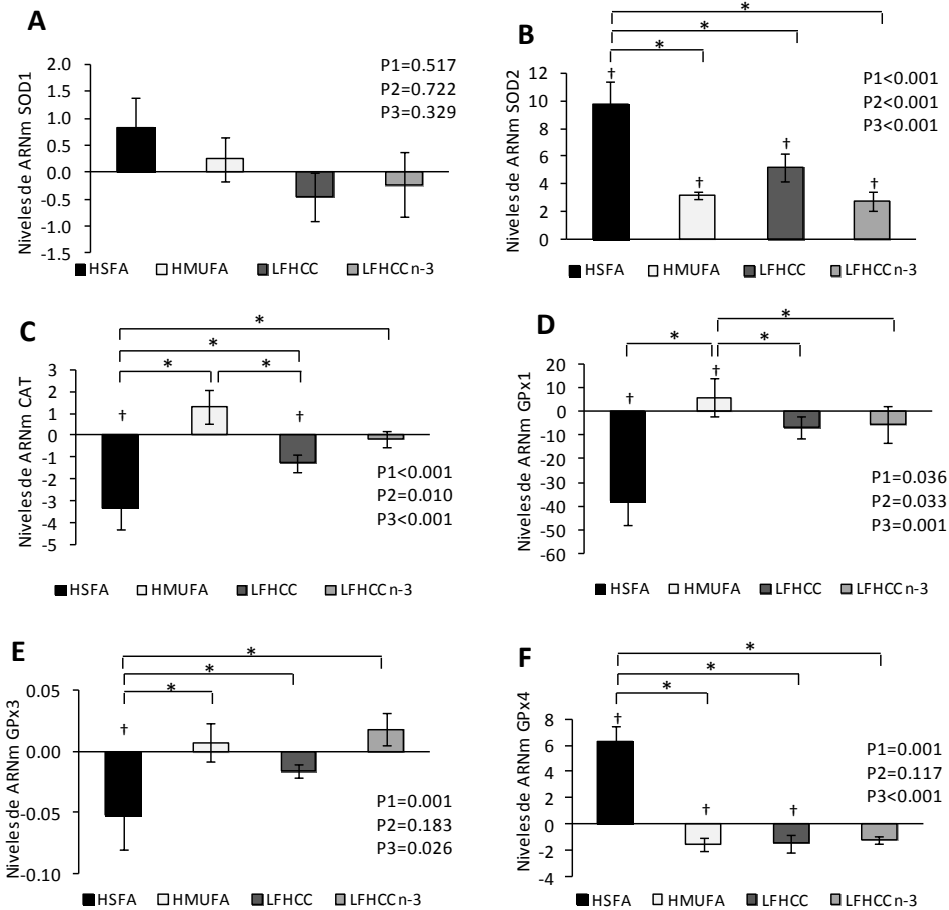


Figura 8. Cambios en la expresión génica postprandial de las enzimas antioxidantes en tejido adiposo de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). Cambios de expresión génica en (A) superóxido dismutasa 1, (B) superóxido dismutasa 2, (C) catalasa, (D) glutatión peroxidasa 1, (E) glutatión peroxidasa 3 y (F) glutatión peroxidasa 4, tras la sobrecarga de un desayuno que con la misma composición de ácidos grasos de las dietas administradas durante la intervención dietética. Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 39). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. Análisis estadístico Post hoc mediante la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, * P<0,05 diferencia significativa entre dietas, † P<0,05 efecto del tiempo significativo.

También hemos estudiado la expresión génica de la tioredoxina (*TXN*), una proteína con función redox involucrada en la eliminación de ROS, y *TXNRD1*, la enzima que reduce la tioredoxina oxidada a la forma reducida y activa.

Los niveles del ARNm de *TXN* aumentaron tras la ingesta de las comidas HSFA ($P < 0,001$), MUFA ($P = 0,006$) y LFHCC ($P < 0,001$), siendo este incremento postprandial mayor tras la ingesta de la comida HSFA que tras la ingesta de las comidas HMUFA y LFHCC n-3 (ambas, $P = 0,001$) (**Figura 9A**). Por otra parte, observamos que los niveles del ARNm de *TXNRDI* disminuyeron tras la ingesta de la comida HSFA ($P < 0,001$), siendo este descenso significativamente mayor que el observado tras la ingesta de las comidas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3 (todas, $P < 0,001$) (**Figura 9B**).

Cuando analizamos el efecto postprandial de las diferentes dietas administradas a los pacientes, observamos que los niveles del ARNm del factor de transcripción *NFE2L2*, regulador positivo de la respuesta antioxidante, aumenta tras la ingesta de la comida HSFA ($P = 0,028$), LFHCC ($P < 0,001$) y LFHCC n-3 ($P = 0,008$), y tiende a aumentar tras la ingesta de la comida HMUFA ($P = 0,052$) (**Figura 9C**). No obstante, cuando analizamos los niveles del ARNm de KEAP1, una proteína que regula negativamente la actividad de *NFE2L2*, la cual es degradada por el proteosoma, observamos un incremento postprandial en los niveles del ARNm de KEAP1 tras la ingesta de la comida HSFA ($P = 0,001$) (**Figura 9D**), siendo este aumento significativamente mayor que el observado tras la ingesta de la comida HMUFA ($P = 0,013$) y LFHCC n-3 ($P = 0,035$).

Los niveles postprandiales del ARNm de GSR, no fueron detectables.

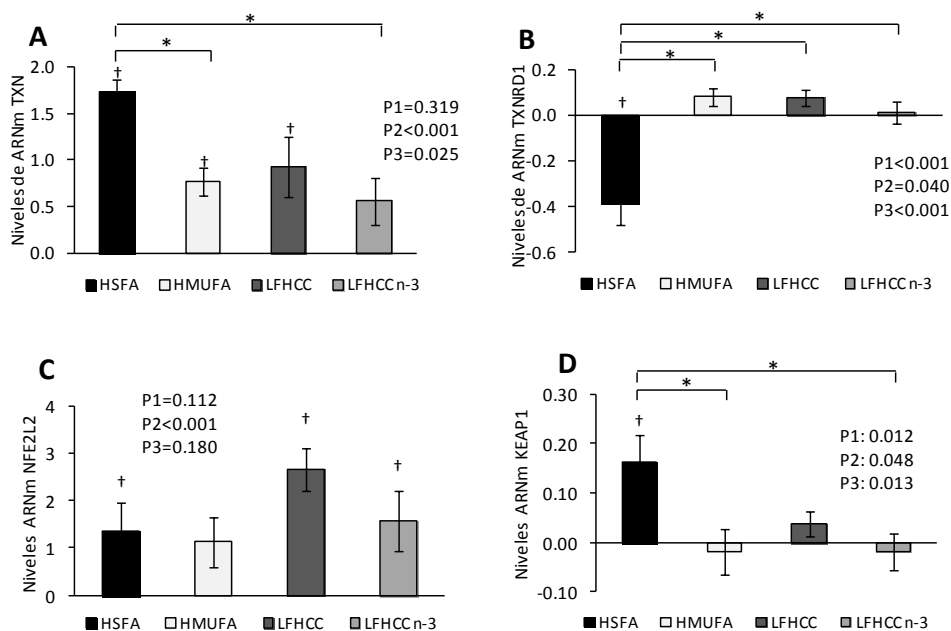


Figura 9. Expresión génica postprandial de proteínas antioxidantes y del complejo regulador de la respuesta antioxidante en tejido adiposo de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). Cambios de expresión génica en (A) tiorredoxina, (B) tiorredoxina reductasa1, (C) NFE2L2 y (D) KEAP1 tras la sobrecarga de un desayuno que con la misma composición de ácidos grasos de las dietas administradas durante la intervención dietética. Los datos se analizaron mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 39). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. Análisis estadístico Post hoc mediante la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, * P<0,05 diferencia significativa entre dietas, † P<0,05 efecto del tiempo significativo.

3. EFECTO DEL CONSUMO A LARGO PLAZO DE CUATRO MODELOS DE DIETAS CON DIFERENTE CANTIDAD Y TIPO DE GRASA EVALUADO MEDIANTE EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELO CELULAR *IN VIVO*.

En estudios previos realizados en el grupo se ha demostrado que la dieta HMUFA mejora los parámetros plasmáticos de estrés oxidativo en estado postprandial, y que las dietas LFHCC y LFHCC n-3 tienen un efecto intermedio en relación con las dietas HMUFA y HSFA en una población con SMet de la cohorte española incluida en el estudio LIPGENE [11]. Además, en la primera parte de mi trabajo de tesis doctoral, demostramos que el consumo de la dieta HSFA aumentó el estrés oxidativo postprandial debido a un desequilibrio entre la generación de ROS y su posterior eliminación, como consecuencia del aumento en los niveles de ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa y la disminución en la expresión de enzimas antioxidantes en el tejido adiposo [154].

Tomando como base estos hallazgos, nos planteamos si la dieta, específicamente la cantidad y la calidad de la grasa de la dieta, también podrían modificar la expresión de genes pro-oxidantes y anti-oxidantes en las CMSP de pacientes con SMet. Las CMSP (monocitos y linfocitos) [133], desempeñan un papel crítico en el sistema inmune, en la iniciación y progresión de la aterosclerosis [113, 155], sustrato responsable de la enfermedad cardiovascular en pacientes con SMet [61]. Además, estas células se están utilizando cada vez más para estudios de expresión génica, [156, 157] y se ha demostrado que modifican su perfil de expresión génica en respuesta a estímulos tales como la grasa de la dieta, factores metabólicos tales como la dislipidemia, y moléculas inflamatorias producidas por otros órganos y tejidos [133, 158, 159].

En este bloque experimental, abordamos el uso de las CMSP como un modelo celular *in vivo* para evaluar la respuesta oxidativa sistémica a la intervención dietética. Para ello, se estudió el efecto de cuatro dietas que difieren

en la cantidad y calidad de la grasa en la expresión postprandial de genes prooxidantes como $gp91^{phox}$, $p22^{phox}$, $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$ y el factor de transcripción *PU.1*, y genes implicados en la defensa antioxidante tales como *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN*, *TXNRD1* y *NFE2L2* en PBMC de los pacientes con síndrome metabólico.

3.1. Efecto de la dieta en la expresión génica de las subunidades de la NADPH-oxidasa en CMSP

El consumo a largo plazo de la dieta LFHCC n-3 aumentó los niveles en ayunas del ARNm de $p22^{phox}$ ($P=0,025$), comparado con los niveles del ARNm en ayunas medidos antes de iniciar la intervención dietética (**Tabla 9**). Sin embargo, no observamos cambios significativos en la expresión de los genes $gp91^{phox}$, $p67^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$, ni del factor de transcripción *PU.1*, tras el consumo a largo plazo de las cuatro dietas administradas en este estudio.

Tabla 9. Niveles en ayunas de ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} y el factor de transcripción PU.1 en CMSP de pacientes con Síndrome Metabólico. Los valores representan la media ± error estándar (SE), de los niveles de ARNm en estado de ayunas al inicio y tras finalizar el periodo de intervención dietética.

Dietas		gp91 ^{phox}	p22 ^{phox}	p67 ^{phox}	p47 ^{phox}	p40 ^{phox}	PU.1
Pre-intervención Ayunas (0h)	HSFA	0,963±0,046	0,567±0,065	0,400±0,029	0,381±0,037	0,197±0,021	0,659±0,051
	HMUFA	1,056±0,148	0,590±0,084	0,413±0,046	0,443±0,075	0,206±0,025	0,691±0,089
	LFHCC	1,012±0,100	0,624±0,095	0,370±0,029	0,410±0,055	0,166±0,023	0,591±0,056
	LFHCC-n-3	1,215±0,129	0,551±0,063	0,442±0,048	0,368±0,036	0,219±0,027	0,677±0,067
Post-intervención Ayunas (0h)	HSFA	1,275±0,179	0,680±0,085	0,492±0,065	0,470±0,072	0,240±0,026	0,984±0,180
	HMUFA	1,087±0,039	0,582±0,080	0,402±0,026	0,394±0,030	0,236±0,020	0,705±0,047
	LFHCC	1,225±0,092	0,693±0,041	0,378±0,026	0,375±0,033	0,217±0,018	0,802±0,068
	LFHCC-n-3	1,119±0,118	0,727±0,076*	0,454±0,031	0,341±0,024	0,171±0,016	0,814±0,110
Valores P							
Efecto Dieta		0,914	0,902	0,380	0,656	0,182	0,904
Efecto Tiempo		0,100	0,035	0,283	0,914	0,177	0,134
Interacción dieta-tiempo		0,337	0,360	0,950	0,924	0,094	0,789

HSFA: dieta occidental rica en grasa saturada; HMUFA: dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCCn-3: dieta baja en grasa y alta en hidratos de carbono complejos con 1,24 g / día PUFAn-3. Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 75). * significa efecto significativo del tiempo (P<0,05) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno previo a la intervención.

3.2. Efecto de la dieta en la expresión de genes del sistema de defensa antioxidante en CMSP

Nuestro estudio mostró un incremento de los niveles en ayunas del ARNm de *SOD1* tras el consumo a largo plazo de la dieta HMUFA ($P=0,034$), LFHCC ($P=0,012$) y LFHCC n-3 ($P=0,021$), además de una tendencia tras el consumo de la dieta HSFA ($P=0,058$) (Figura 10A). Además, observamos un aumento de los niveles en ayunas del ARNm de *SOD2* y *CAT*, independientemente de la cantidad y tipo de grasa de la dieta, comparado con los niveles en ayunas antes de iniciar la intervención dietética (Figura 10B y 10C).

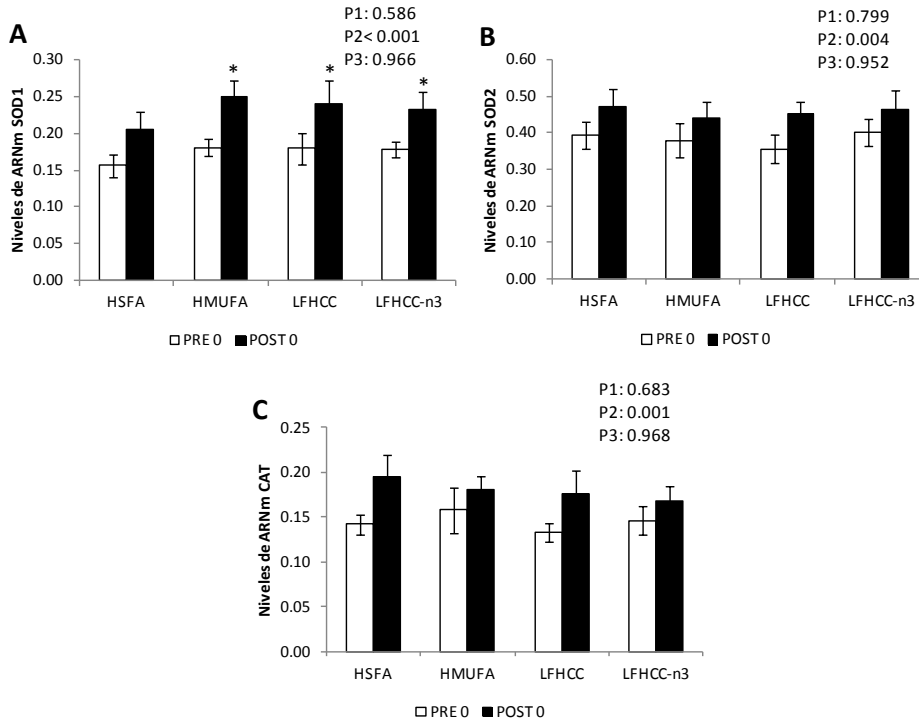


Figura 10. Niveles de ARNm en ayunas de las enzimas antioxidantes en CMSP de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE), de los niveles de ARNm en estado de ayunas al inicio y tras finalizar el periodo de intervención dietética. (A) superóxido dismutasa 1, (B) superóxido dismutasa 2, (C) catalasa. Pre-intervención (barras blancas) y Post-intervención (barras negras). Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas ($n = 75$). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. *significa efecto significativo del tiempo ($P<0,05$) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno previo a la intervención.

Los niveles en ayunas del ARNm de *Gpx1* aumentaron tras el consumo a largo plazo de las dietas HMUFA ($P=0,024$) y LFHCC n-3 ($P=0,012$) (**Figura 11A**). En el periodo post-intervención, observamos un aumento en los niveles del ARNm de *Gpx4* ($P=0,044$), independientemente de la cantidad y tipo de grasa de la dieta (**Figura 11B**). Así mismo, el consumo a largo plazo de las dietas HSFA y HMUFA ($P=0,014$ y $P<0,001$, respectivamente) aumentaron los niveles en ayunas del ARNm de *Gpx4*. Los niveles en ayunas del ARNm de *GSR* aumentaron tras el consumo a largo plazo de las dietas HSFA y HMUFA ($P=0,005$ y $P=0,002$, respectivamente) (**Figura 11C**).

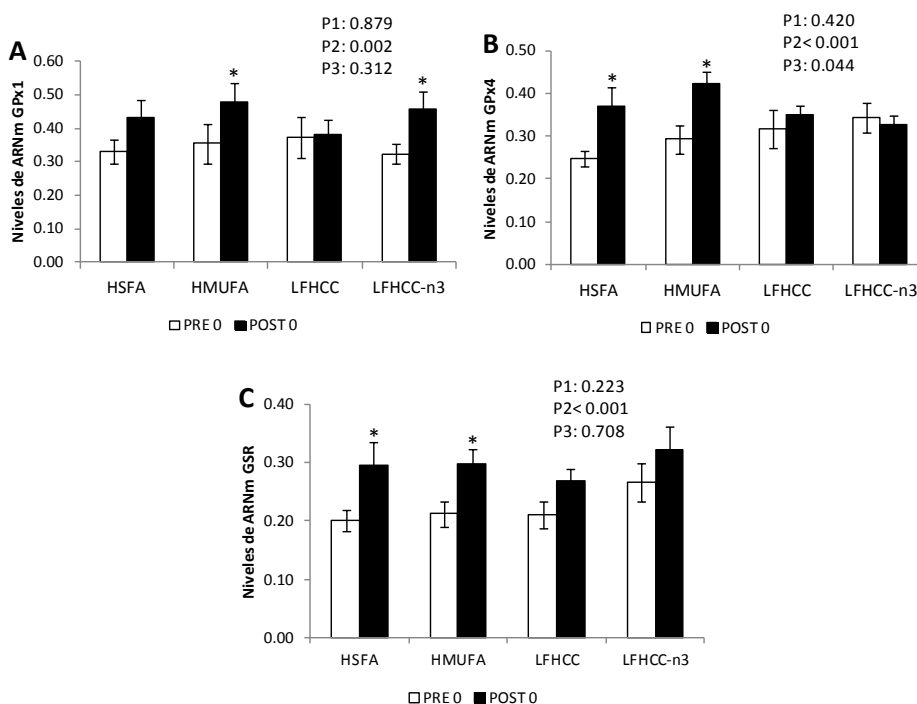


Figura 11. Niveles de ARNm en ayunas de las enzimas antioxidantes en CMSP de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE), de los niveles de ARNm en estado de ayunas al inicio y tras finalizar el periodo de intervención dietética. (A) Glutacion peroxidasa1, (B) Glutacion peroxidasa 4, (C) GSR. Pre-intervención (barras blancas) y Post-intervención (barras negras). Los datos se analizaron mediante ANOVA para medidas repetidas ($n = 75$). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. *significa efecto significativo del tiempo ($P<0,05$) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno previo a la intervención.

Nuestro estudio mostró un aumento en los niveles en ayunas del ARNm de *TXN* tras el consumo a largo plazo de las dietas HMUFA ($P=0,029$) y LFHCC ($P=0,050$), además de una tendencia tras el consumo de la dieta HSFA ($P=0,052$) (**Figura 12A**). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles del ARNm de *TXNRD1* en estado de ayunas post-intervención (**Figura 12B**).

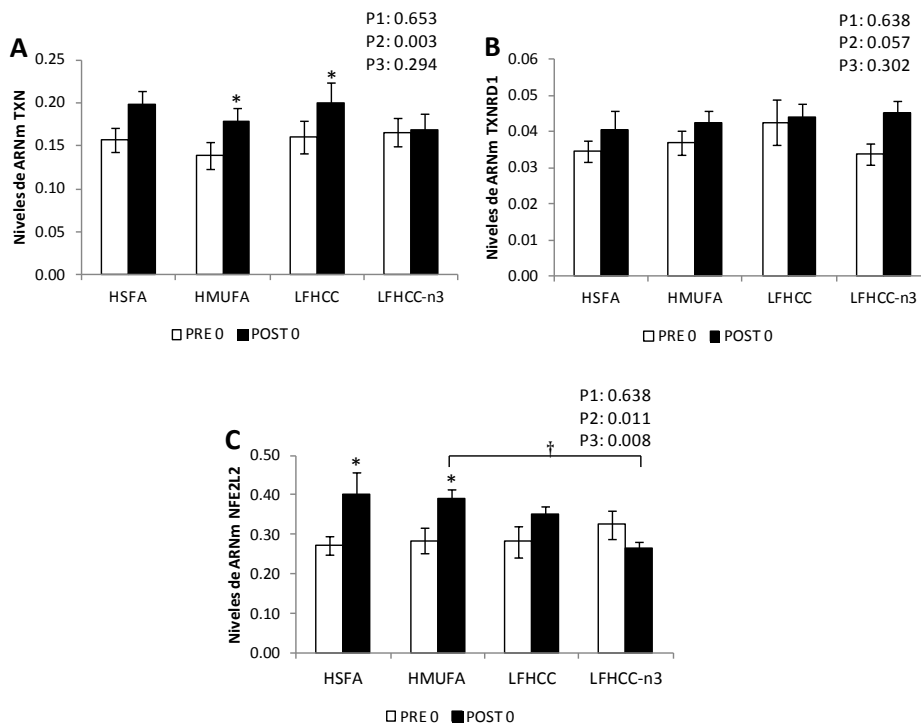


Figura 12. Niveles de ARNm en ayunas de las enzimas antioxidantes en CMSP de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE), de los niveles de ARNm en estado de ayunas al inicio y tras finalizar el periodo de intervención dietética. (A) Tiorredoxina, (B) Tiorredoxina reductasa 1, (C) NFE2L2. Pre-intervención (barras blancas) y Post-intervención (barras negras). Los datos se analizaron mediante ANOVA para medidas repetidas ($n = 75$). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. * significa efecto significativo del tiempo ($P < 0,05$) dentro de la dieta en comparación con el estado de ayuno previo a la intervención, † significa diferencia significativa post-intervención entre dietas, $P < 0,05$.

El consumo a largo plazo de las dietas HSFA ($P=0,021$) y HMUFA ($P=0,005$) aumentó los niveles en ayunas del ARNm del factor de transcripción

NFE2L2. No obstante, el consumo a largo plazo de la dieta LFHCC n-3 tiende a disminuir los niveles en ayunas del ARNm de *NFE2L2* (P=0,098) (**Figura 12C**). El análisis post hoc mostró que el aumento de los niveles en ayunas del ARNm de *NFE2L2* tras la dieta HMUFA fue mayor que el observado tras la dieta LFHCC n-3 (P=0,007).

3.3. Expresión génica postprandial de las subunidades de la NADPH-oxidasa en CMSP.

Cuando estudiamos el efecto postprandial del consumo a largo plazo de cada una de las dietas, se observó un aumento en los niveles del ARNm de *gp91^{phox}* (P<0,001), *p22^{phox}* (P=0,005), *p47^{phox}* (P=0,001), *p40^{phox}* (P<0,001) a las 2 horas de la ingesta de la comida HSFA (**Figura 13**), mientras que la expresión de estos genes permaneció sin cambios tras el consumo de las demás comidas. El análisis post hoc demostró que el aumento en los niveles postprandiales del ARNm de *gp91^{phox}*, *p47^{phox}*, *p40^{phox}* y *PU.1* a las 2 horas de la ingesta de la comida HSFA fueron mayores que tras la ingesta de las comidas HMUFA (P=0,020, P=0,001, P=0,002 y P=0,027, respectivamente), LFHCC (P=0,034, P<0,001, P=0,010 y P=0,042, respectivamente) y LFHCC n-3 (P=0,001, P<0,001, P<0,001 y P=0,007, respectivamente) (**Figura 13**). Además, se observó que el aumento en los niveles postprandiales del ARNm de *p47^{phox}* se mantuvieron tras 4 horas de la ingesta de la comida HSFA, y éstos fueron mayores que tras la ingesta de las comidas HMUFA (P=0,050) y LFHCC n-3 (P=0,024) (**Figura 13D**). También observamos que después de 4 horas de la ingesta de la comida HMUFA, los niveles postprandiales del ARNm de *p40^{phox}* fueron menores que los observados tras la ingesta de las comidas HSFA (P=0,022) y LFHCC (P=0,038) (**Figura 13E**).

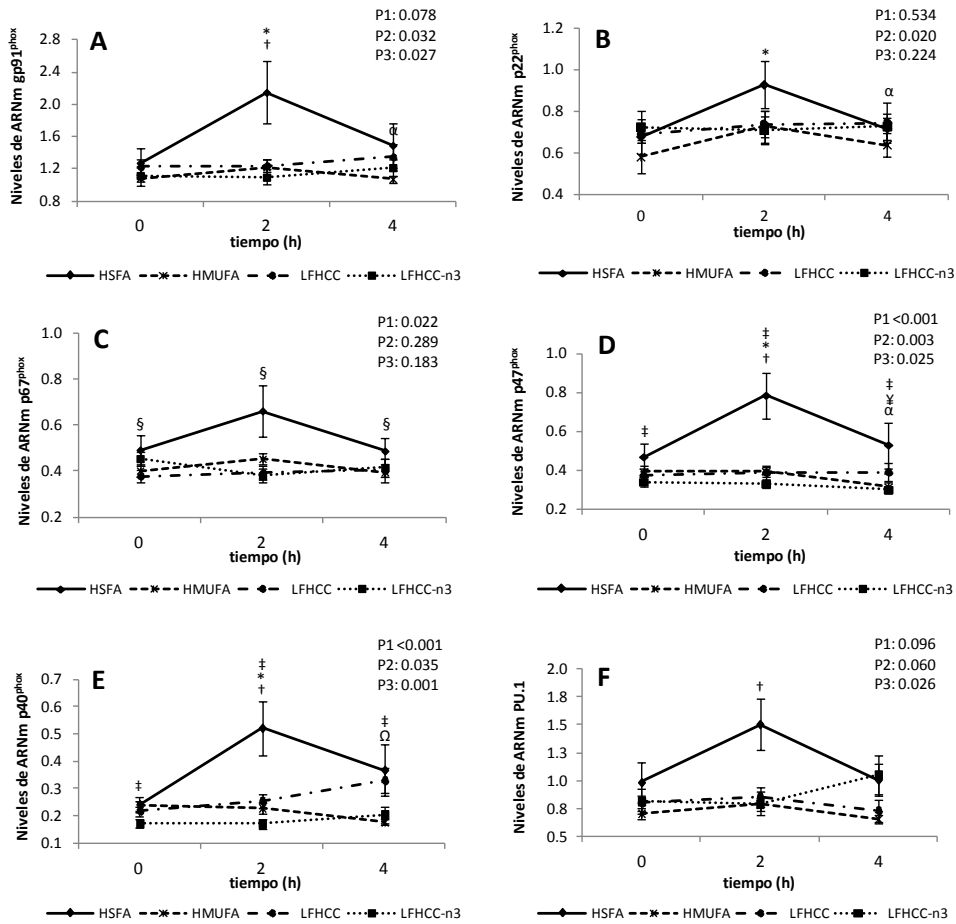


Figura 13. Niveles de ARNm postprandiales del factor de transcripción PU.1 y las subunidades de la NADPH-oxidasa en CMSP de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). Cambios de expresión génica en (A) gp91^{phox}, (B) p22^{phox}, (C) p67^{phox}, (D) p47^{phox}, (E) p40^{phox}, (F) PU.1. Los datos se analizaron mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 75). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. ‡ significa P < 0,05 para el desayuno HSFA comparado con HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3; § significa P < 0,05 para el desayuno HSFA comparado con LFHCC; † significa P < 0,05 2 h después del desayuno HSFA comparado con HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3; ¶ significa P < 0,05 4 h después del desayuno HSFA comparado con HMUFA y LFHCC n-3; Ω significa P < 0,05 4 h después del desayuno HMUFA comparado con HSFA y LFHCC, y * significa P < 0,05 2 h después del desayuno HSFA frente al estado de ayuno; α significa P < 0,05 4 h después del desayuno HSFA frente a las 2 h del postprandio.

La ingesta de la comida HSFA aumentó los niveles postprandiales del ARNm $p47^{phox}$ de manera que éstos fueron mayores a los observados tras la ingesta de las comidas HMUFA (P=0,007), LFHCC (P=0,007) y LFHCC n-3 (P<0,001) (**Figura 13D**). También observamos que el aumento en los niveles postprandiales del ARNm de $p40^{phox}$ tras la ingesta de la comida HSFA fueron mayores que tras la ingesta de las comidas HMUFA (P=0,008) y rico en LFHCC n-3 (P<0,001) (**Figura 13E**). Así mismo, el aumento postprandial en los niveles del ARNm de $p40^{phox}$ fueron mayores tras la ingesta de la comida LFHCC que tras la ingesta de la comida LFHCC n-3 (P=0,014). El aumento en los niveles del ARNm de $p67^{phox}$ tras la ingesta de la comida HSFA fueron mayores que los observados tras la ingesta de la comida LFHCC (P=0,016) (**Figura 13C**).

3.4. Expresión postprandial de genes del sistema de defensa antioxidante en CMSP.

Hemos observado que los niveles del ARNm de *GSR* y *GPx1* aumentaron a las 2 horas de la ingesta de la comida HSFA (ambos, P<0,001), mientras que no encontramos cambios significativos en los niveles del ARNm de estos genes tras la ingesta de las demás comidas. (**Figura 16B y 16C**).

Los niveles postprandiales del ARNm de *GSR*, *GPx1*, *TXNRD1* y *NFE2L2* a las 2 horas de la ingesta de la comida HSFA fueron más elevados que a las 2 horas de la ingesta de las comidas HMUFA (P=0,001, P=0,019, P=0,021 y P=0,001, respectivamente), LFHCC (P=0,001, P=0,038, P=0,002 y P=0,001, respectivamente) y LFHCC n-3 (P<0,001, P=0,001, P=0,001 y P<0,001, respectivamente) (**Figura 16B, 16C, 16F y Figura 14**).

El aumento en los niveles postprandiales del ARNm de *SOD1* y *GPx4* observado a las 2 horas de la ingesta de una comida HSFA fue mayor que tras la ingesta de la comida LFHCC n-3 (P=0,029 y P=0,005, respectivamente) (**Figura 15A y 16D**) y el aumento en los niveles postprandiales del ARNm de *GSR*, tras la ingesta de la comida HSFA fue mayor que tras la ingesta de las comidas HMUFA (P=0,013) y el LFHCC (P=0,006) (**Figura 16B**). Así mismo, los niveles

postprandiales del ARNm de CAT y la *TXNRD1* tras la ingesta de la comida HSFA fueron mayores que tras la ingesta de las comidas LFHCC (P=0,039 y P=0,013) y LFHCC n-3 (P=0,011 y P=0,033) (**Figura 16A y 16F**). Cuando estudiamos el efecto postprandial de la comida HSFA, observamos unos niveles postprandiales del ARNm de GPx1 (P=0,044) y *NFE2L2* (P<0,001) más elevados que los observados tras la ingesta de la comida LFHCC n-3 (**Figura 16C y Figura 14**).

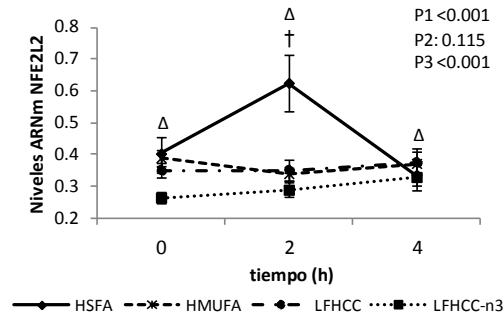


Figura 14. Niveles de ARNm postprandiales de NFE2L2 en CMSP de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). Los datos se analizaron mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 75). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. Δ significa P<0,05 para el desayuno HSFA comparado con LFHCC n-3, \dagger significa P<0,05 2 h después del desayuno HSFA comparado con HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3.

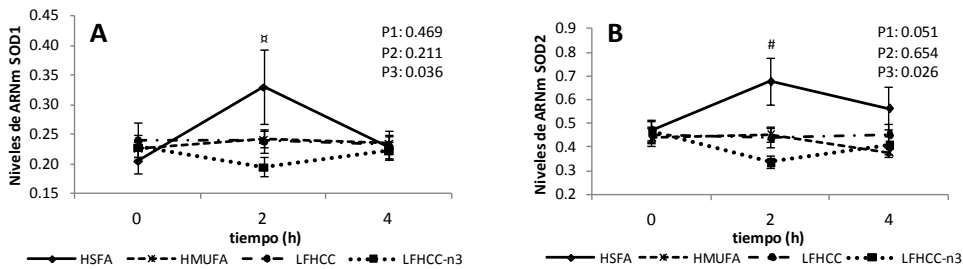


Figura 15. Niveles de ARNm postprandiales de genes implicados en la respuesta antioxidante de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). (A) SOD1, (B) SOD2. Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 75). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. α significa P<0,05 2 h después del desayuno HSFA comparado con LFHCC n-3, # significa P<0,05 2 h después del desayuno HSFA comparado con LFHCC y LFHCC n-3.

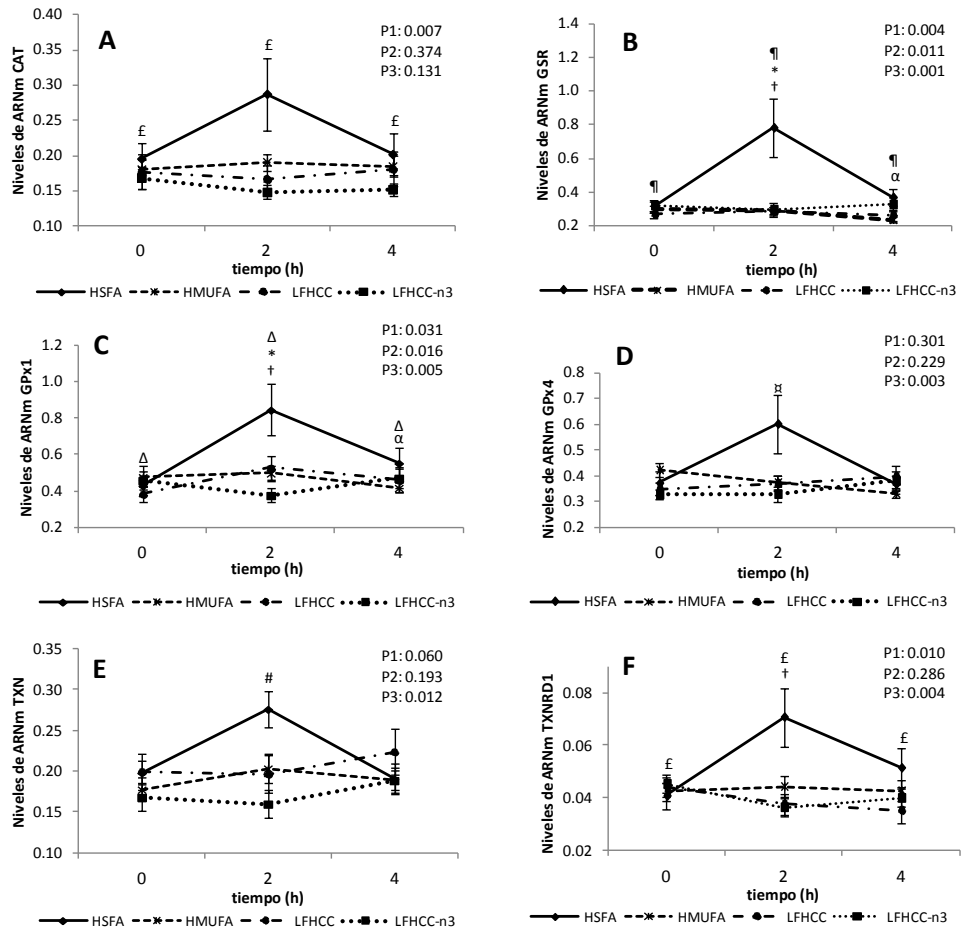


Figura 16. Niveles de ARNm postprandiales de genes implicados en la respuesta antioxidante de pacientes con SMet. Los valores representan la media \pm error estándar (SE). (A) CAT, (B) GSR, (C) GPx1, (D) GPx4, (E) TXN, (F) TXNRD1. Datos analizados mediante ANOVA para medidas repetidas (n = 75). P1: efecto de la dieta, P2: efecto del tiempo y P3: efecto interacción dieta-tiempo. £ significa $P < 0,05$ para el desayuno HSFA comparado con LFHCC y LFHCC n-3, ¶ significa $P < 0,05$ para el desayuno HSFA comparado con HMUFA y LFHCC, Δ significa $P < 0,05$ para el desayuno HSFA comparado con LFHCC n-3, † significa $P < 0,05$ 2 h después del desayuno HSFA comparado con HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3, # significa $P < 0,05$ 2 h después del desayuno HSFA comparado con LFHCC y LFHCC n-3, α significa $P < 0,05$ 2 h después del desayuno HSFA comparado con LFHCC n-3, * significa $P < 0,05$ 2 h después del desayuno HSFA frente al estado de ayuno; α significa $P < 0,05$ 4 h después del desayuno HSFA frente a las 2 h del postprandio.

3.5. Niveles de la proteína de NFE2L2 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) mediante Western Blot.

Con el objeto de evaluar el efecto postprandial de la cantidad y tipo de grasa de la dieta, tanto en ayunas como en estado postprandial, tras una sobrecarga grasa que reflejaba la composición de la dieta a la que fue asignado, se determinó la activación del factor de transcripción *NFE2L2* en CMSP de los pacientes con Síndrome Metabólico. Puesto que este factor transcripcional migra al núcleo de la célula cuando es activado, se ha determinado la cantidad de proteína *NFE2L2* tanto en la fracción nuclear como en la fracción citoplasmática de CMSP mediante la técnica de Western Blotting, como medida de la activación de este factor de transcripción.

No se observaron cambios significativos en cuanto a los niveles en ayunas de la proteína *NFE2L2* en la fracción nuclear ni en la citoplasmática tras el consumo de ninguna de las dietas.

No obstante, los niveles postprandiales de la proteína *NFE2L2* en la fracción nuclear fueron mayores tras la ingesta de la comida HSFA en comparación con los niveles observados tras la ingesta de las comidas LFHCC, y LFHCCn-3 ($P=0,018$ y $P=0,011$) (**Figura 17**). A su vez, los niveles citoplasmáticos de la proteína *NFE2L2* fueron menores tras la ingesta de las comidas HSFA y LFHCC n-3 comparado con los niveles elevados de ésta proteína observados tras la ingesta de la comida HMUFA ($P=0,047$ y $P=0,003$).

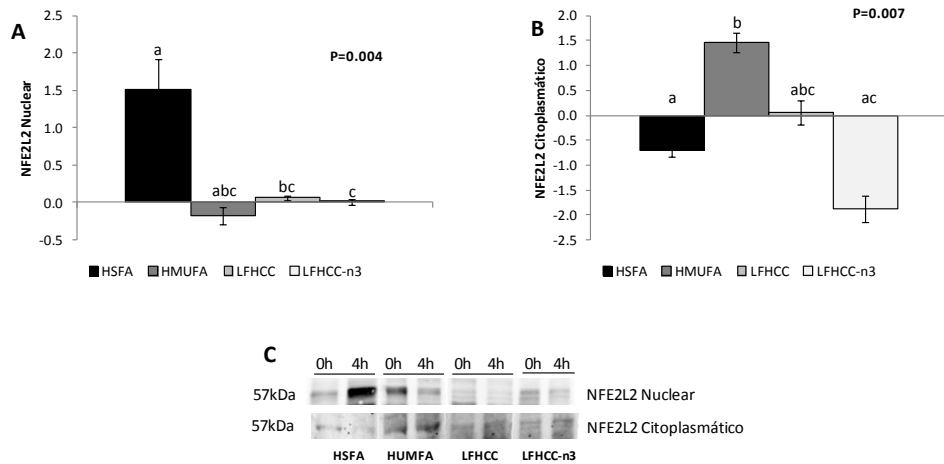


Figura 17. Incremento de la proteína nuclear y citoplasmática en CMSP tras el consumo de desayunos con diferente cantidad y tipo de grasa. Valores representados por la media \pm S.E.M. Diferencias entre el tiempo de 4 h y el basal tras la intervención dietética, $n = 36$. Datos analizados mediante ANOVA de un factor, P: efecto de la dieta. Las barras con diferentes letras representan diferencias estadísticamente significativas entre las dietas ($P < 0,05$). Niveles postprandiales de NFE2L2 nuclear (A) y citoplasmática (B), en CMSP de acuerdo con la comida consumida. Inmunoblot representativo de NFE2L2 nuclear y citoplasmático (C).

4. CORRELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CMSP, TEJIDO ADIPOSO Y LOS PARÁMETROS Y BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO PLASMÁTICOS EN ESTADO POSTPRANDIAL.

4.1. Análisis de correlación entre la expresión génica en CMSP con los biomarcadores de estrés oxidativo y los parámetros plasmáticos lipídicos en estado postprandial.

En este trabajo, se hemos analizado la relación entre los niveles del ARNm de CMSP (genes: *gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}*, *p40^{phox}*, *PU.1*, *NFE2L2*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* and *TXNRD1*) y marcadores de estrés oxidativo, tales como lipoperóxidos (LPOs), H₂O₂ y proteínas carboniladas previamente descritos por Pérez-Martínez et al. [11], así como los niveles plasmáticos de lípidos como el colesterol total, triglicéridos, c-HDL y c-LDL en estado postprandial. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 10**.

Nuestro estudio mostró una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de proteínas carboniladas y los niveles del ARNm en CMSP de *gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}*, *p40^{phox}*, *PU.1*, *NFE2L2*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* y *TXNRD1*) a las 2 horas de la ingesta de la sobrecarga grasa, ver **Tabla 10**. Además, observamos una correlación negativa entre las concentraciones plasmáticas de proteínas carboniladas con los niveles del ARNm de *p22^{phox}* y *NFE2L2*, a las 4 horas de la ingesta de las comidas (P=0,003 r= -0,342 y P=0,020 r= -0,275, respectivamente).

Además, observamos una correlación positiva entre la concentración plasmática postprandial de H₂O₂ con los niveles del ARNm de las subunidades de la NADPH -oxidasa (*gp91^{phox}*, *p67^{phox}*, *p40^{phox}* y *PU.1*) y los antioxidantes (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *TXN*, *TXNRD1* y *NFE2L2*) a las 2 horas tras la ingesta de la sobrecarga grasa (**Tabla 10**).

Nuestro estudio mostró una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de LPOs, con los niveles del ARNm del factor de transcripción *PU.1* a las 2 horas tras la ingesta de las comidas grasas (P=0,041 r=0,241). Por otra parte,

se observó una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de LPOs y los niveles del ARNm de *gp91^{phox}*, *p67^{phox}*, *p40^{phox}*, *SOD2*, *GSR* y *TXN* a las 4 horas tras la ingesta de las comidas grasas (**Tabla 10**).

Tabla 10. Correlaciones entre la expresión génica en CMSP y los biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo en estado postprandial.

P r	2 h			4 h		
	H ₂ O ₂	Proteínas carboniladas	LPOs	H ₂ O ₂	Proteínas carboniladas	LPOs
ARNm gp91 ^{phox}	0,002	0,003	n.s.	n.s.	n.s.	0,008
	0,358	0,341				0,312
ARNm p22 ^{phox}	n.s.	0,037	n.s.	n.s.	0,003	n.s.
		0,247			-0,342	
ARNm p67 ^{phox}	0,001	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	0,014
	0,400	0,389				0,287
ARNm p47 ^{phox}	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
		0,493				
ARNm p40 ^{phox}	0,002	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	0,019
	0,364	0,428				0,275
ARNm PU.1	0,001	0,001	0,041	n.s.	n.s.	n.s.
	0,382	0,389	0,241			
ARNm NFE2L2	0,023	<0,001	n.s.	n.s.	0,02	n.s.
	0,268	0,458			-0,0275	
ARNm SOD1	0,025	0,014	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	0,265	0,29				
ARNm SOD2	0,001	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	0,007
	0,372	0,42				0,317
ARNm CAT	<0,001	0,010	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	0,443	0,303				
ARNm GPx1	0,002	0,003	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	0,358	0,345				
ARNm GPx4	0,018	0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	0,279	0,394				
ARNm GSR	n.s.	<0,001	n.s.	n.s.	n.s.	0,010
		0,484				0,303
ARNm TXN	0,009	0,027	n.s.	n.s.	n.s.	0,029
	0,307	0,26				0,257
ARNm TrxR	0,003	0,002	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	0,350	0,365				

4.2. Análisis de correlación entre la expresión génica postprandial en CMSP y en tejido adiposo.

En este trabajo, hemos analizado la relación entre los niveles del ARNm en CMSP y en tejido adiposo (genes: *gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}*, *p40^{phox}*, *PU.1*, *NFE2L2*, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* and *TXNRD1*).

Nuestro estudio mostró una correlación positiva entre los niveles del ARNm de *gp91^{phox}* en CMSP y *GPx1* en T.A. ($P=0,022$ $r=0,370$) (**Figura 18A**), a las 4 horas tras la ingesta de las comidas. Además, hemos encontrado correlaciones negativas entre los niveles del ARNm de *TXN* en T.A. con los niveles del ARNm de *p47^{phox}* en CMSP ($P=0,008$ $r= -0,442$) (**Figura 18B**) a las 4 horas tras la ingesta de las comidas. Igualmente, observamos correlaciones negativas entre los niveles del ARNm de *TXNRD1* en T.A. con los niveles del ARNm de *p47^{phox}* y *GPx1* en CMSP ($P=0,045$ $r= -0,328$ y $P=0,038$ $r= -0,338$, respectivamente) (**Figuras 18C y D**).

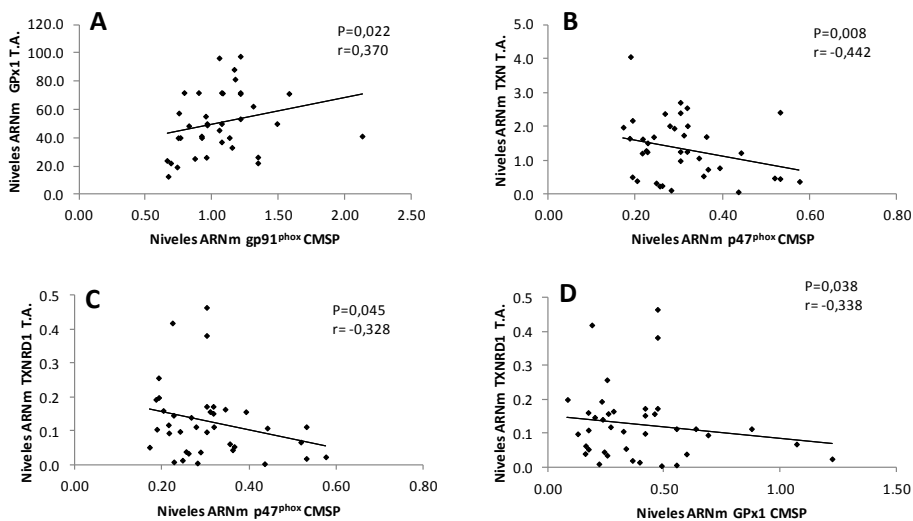


Figura 18. Correlaciones entre **A)** niveles postprandiales del ARNm de *GPx1* en T.A. y *gp91^{phox}* en CMSP, **B)** niveles postprandiales del ARNm de *TXN* en T.A. y *gp47^{phox}* en CMSP, **C)** niveles postprandiales del ARNm de *TXNRD1* en T.A. y *gp47^{phox}* en CMSP, **D)** niveles postprandiales del ARNm de *TXNRD1* en T.A. y *GPx1* en CMSP, tras 4 horas de haber ingerido los desayunos con la misma composición grasa de la dieta. Coeficiente de correlación lineal de Pearson.

5. EFECTO DEL TIPO DE GRASA EN EL PROTEOMA POSTPRANDIAL DE CMSP MEDIANTE PROTEÓMICA 2-D

La proteómica es una plataforma central en nutrigenómica y describe cómo nuestro genoma se expresa en respuesta a determinados estímulos, como pueden ser diferencias en la dieta [160]. No obstante, mientras que la proteómica representa una novedosa y prometedora herramienta para descubrir mecanismos de acción de los nutrientes, así como también para identificar posibles biomarcadores de salud o enfermedad, el uso de esta técnica en ensayos de intervención dietética es todavía bastante limitado [161].

En este bloque experimental hemos analizado la regulación que sufre el proteoma de CMSP de pacientes con SMet en estado postprandial, en función del tipo de grasa ingerida, lo que nos permitió identificar proteínas de respuesta rápida ante la ingesta aguda de comidas con diferente composición grasa. Este estudio se realizó antes de iniciar el periodo de intervención dietética. Los alimentos utilizados en las comidas han sido detallados en el apartado de Diseño y Metodología.

5.1. Análisis del efecto de la grasa en la dieta en el proteoma

Nuestro estudio consistió en comparar el proteoma antes (estado de ayunas) y después (estado postprandial) de la ingesta aguda de cada una de las comidas mediante electroforesis en 2-D, fracciones nucleares y citoplasmáticas de CMSP por separado de pacientes con SMet. Se detectaron en promedio más de 400 spots en cada gel, tanto en los correspondientes a las fracciones nucleares como citoplasmáticas.

En el análisis comparativo del proteoma de CMSP en ayunas y en estado postprandial, observamos que la ingesta aguda de la comida HSFA aumentó la expresión postprandial de cinco proteínas (ZFP2, SMC6, HLA-C, THBS1 y PSME1) y redujo la de cinco proteínas (REV3-like, PDIA3, HSPA1A, FGB y PLEC). Por su parte, la ingesta de la comida HMUFA aumentó la expresión postprandial de tres proteínas (HSPA1A, HLA-A y PDIA3) y la reducción

postprandial de otras tres proteínas (CCDC150, CEP290 y SERPIN B1). La ingesta de la comida LFHCC aumentó la expresión postprandial de cuatro proteínas (FLNA, GRIN1, HLA-C y HSPA6) y redujo la de una (MRLC3). Por último, la ingesta de la comida LFHCC n-3 aumentó la expresión postprandial de tres proteínas (VIM, PPIA, ALDH2) y redujo la de dos (CAPZB, ECH1).

Las proteínas identificadas cuya expresión postprandial es susceptible de ser modulada por el tipo de grasa ingerida, se pueden agrupar en las siguientes categorías, tomando como criterio la función que realizan:

- (a) chaperonas moleculares y respuesta al stress (HSPA1A, HSPA6, PDIA3);
- (b) interacción célula-célula (FGB, THBS1);
- (c) mantenimiento del DNAe (SMC6, REV3-like, CEP290);
- (d) filamentos estructurales o componentes del citoesqueleto (PLEC, FLNA, VIM, MRLC3, CAPZB);
- (e) enzimas y receptor (HLA-A, HLA-C, SERPIN B1, GRIN1, PPIA, ALDH2, ECH1);
- (f) otros (ZFP2, CCDC150, PSME1) (**Figura 19**).

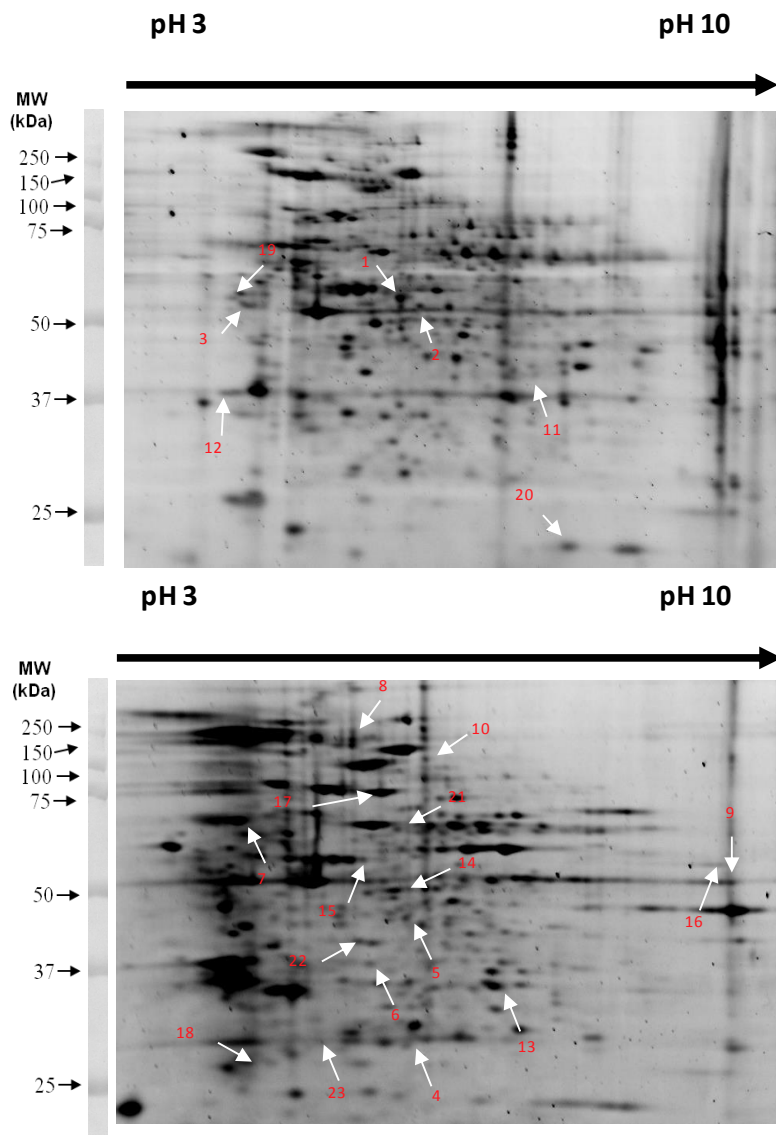


Figura 19. Proteómica 2-D PAGE del proteoma completo de las CMSP, fracción nuclear (1) y la fracción citoplasmática (2). La separación de proteínas se llevó a cabo en geles 2-D, utilizando tiras de 18 cm con pH 3-10 en la primera dimensión y geles SDS-PAGE al 12% en la segunda dimensión, tal y como se describe en el apartado de Diseño y Metodología. Las proteínas expresadas diferencialmente están indicadas con flechas. Los números correspondientes a los spots se detallan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Efecto de la grasa de la dieta sobre los cambios postprandiales en el proteoma.

	PC	valor P	M	pI	Nº acceso	%ICM	Cont. Pep.	%IC Iones
<i>Cambios postprandiales de las proteínas tras la ingesta aguda de una comida HSFA</i>								
Fracción nuclear								
1. ZFP2: Zinc finger protein 2 homolog	3,27	0,036	54359,7	8,91	gi 47271457		8	
2. SMC6: structural maintenance of chromosomes 6	2,35	0,006	35828	7,59	gi:122070455	99,919	11	
3. REV3-like: catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast), isoform CRA	0,44	0,031	37,5	9,6	gi:119568677	99,093		
Fracción Citoplasmática								
4. HLA-C: HLA class I histocompatibility antigen. Cw-1 alpha chain	3,90	0,030	24053,8	6,75	gi 599786	30,637	6	
5. THBS1:Thrombospondin	2,53	0,043	42215,2	6,6	gi 553801	99,99	5	99,997
6. PSME1: Proteasome activator subunit 1 isoform 1	1,90	0,031	28754,9	6,28	gi 30581141	99,982	28	81,644
7. PDIA3: Protein disulfide-isomerase	0,58	0,043	52884,4	4,76	gi:2507460	100	8	100
8. HSPA1A: Heat shock 70kDa protein 1A	0,43	0,047	70280,1	5,48	gi 5123454	100	16	100
9. FGB: Fibrinogen beta chain. isoform CRA_f	0,33	0,026	44723,6	8,84	gi 119625340	100	9	99,834
10. PLEC: Plectin-1	0,32	0,049	518510,8	5,60	gi:209572726	99,322	33	
<i>Cambios postprandiales de las proteínas tras la ingesta aguda de una comida HMUFA</i>								
Fracción nuclear								
11. CCDC150 protein	0,25	0,032	44114,5	9,47	gi 38541637	83,74	9	
12. CEP290: Centrosomal protein of 290 kDa	IE	0,018	268104,8	5,75	gi:116241294	99,941	26	
Fracción Citoplasmática								
8. HSPA1A: Heat shock 70kDa protein 1A	2,20	0,045	70110,0	5,42	gi 386785	100	16	100
13. HLA-A: MHC class I antigen	1,81	0,042	21139,1	5,77	gi 89152359	44,903	6	
7. PDIA3: Protein disulfide isomerase	1,40	0,043	54453,6	6,78	gi 119597640	100	15	99,95
14. SERPIN B1: serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	0.36	0.036	42889.8	6.22	gi:266344	99.999	9	99.512

Tabla 11. Efecto de la grasa de la dieta sobre los cambios postprandiales en el proteoma (*Continuación*).

	PC	valor P	M	pI	Nº acceso	%ICM	Cont. Pep.	%IC Iones
<i>Cambios postprandiales de las proteínas tras la ingesta aguda de una comida LFHCC</i>								
Fracción Citoplasmática								
15. FLNA: filamin alpha (actin binding protein 280), isoform CRA_e	7,94	0,0434	266548,5	5,79	gi 119593154	100	15	100
16. GRIN1: glutamate receptor subunit zeta-1	2,73	0,0469	105373	8,5	gi:548377	99,274	14	
4. HLA-C: HLA class I histocompatibility antigen. Cw-17 alpha chain	1,38	0,029	19045,2	6,95	gi:34395506	39,587	6	
17. HSPA6: Heat shock 70kDa protein 6, variant	1,35	0,046	71416,3	5,81	gi 62898285	99,874	5	99,992
18. MRLC3: Myosin regulatory light chain 12A.	0,49	0,0397	19456,2	4,74	gi 127169	99,992	5	99,916
<i>Cambios postprandiales de las proteínas tras la ingesta aguda de una comida LFHCC n-3A</i>								
Fracción nuclear								
19. VIM: vimentin	1,94	0,031	53604,1	5,09	gi 47115317	53,109	6	73,579
20. PPIA: cyclophilin A	1,84	0,047	18039,9	8,37	gi 75766275	100	5	100
Fracción Citoplasmática								
21. ALDH2: Aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	1,78	0,042	56932,9	6,63	gi 48146099	92,902	2	99,944
22. CAPZB: Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	0,69	0,045	29561,9	6,45	gi 55665440	100	7	100
23. ECH1: Enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	IE	0,014	36077,5	8,47	gi 16924265	100	6	100

PC, porcentaje de cambio (niveles de proteínas en estado postprandial / niveles de proteínas en ayunas); valor P, valor P del t test, M, peso molecular teórico; pI, punto isoeléctrico teórico; %ICM, índice de confianza del marcador; Cont. Pep., conteo de péptidos; IE, infraexpresados, no se detecta en postprandial.

5.2. Validación de los resultados obtenidos por proteómica 2-D, mediante Western blot

Para confirmar los resultados obtenidos por proteómica 2-D, se decidió utilizar una técnica independiente, como es el western blot, para analizar la expresión de ocho proteínas identificadas mediante proteómica 2-D, los cuales correspondieron a las siguientes categorías: tres chaperonas, dos enzimas, dos componentes estructurales de la célula y una de interacción célula-célula y cuya expresión iba desde represión 0,43 hasta sobreexpresión 2,45. La cuantificación de estas proteínas mediante western blot, mostraron los mismos cambios inducidos por la dieta que aquellos observados en la proteómica 2-D (**Figura 20**).

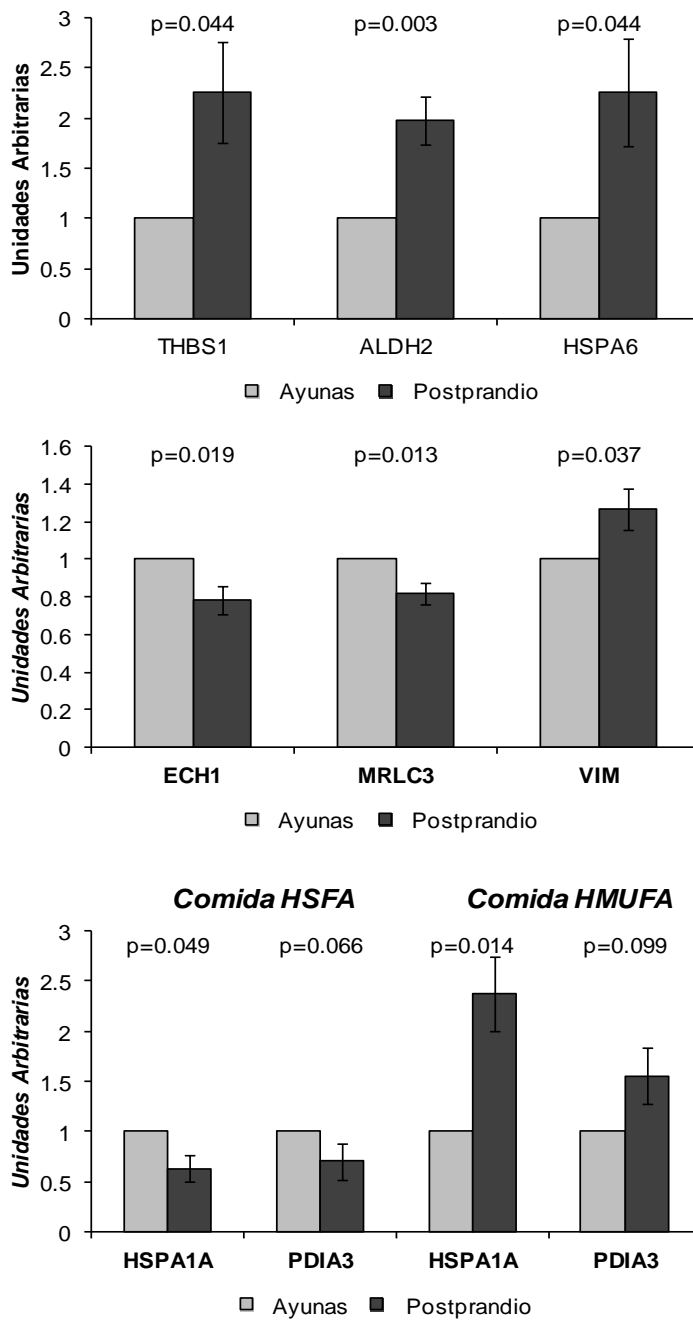


Figura 20. Validación de la proteómica 2-D PAGE mediante Western Blot

5.3. Análisis de las rutas afectadas por el tipo de grasa en la comida ingerida

Mediante el programa Ingenuity Pathway Analysis [153], se llevó a cabo la identificación de las rutas moduladas por el tipo de grasa en la dieta. Nuestro estudio mostró que la respuesta inflamatoria fue principal ruta afectada tras la ingesta de la comida HSFA: HLA-C, THBS1 y PSME1, proteínas sobreexpresadas; PLEC, FGB y HSPA1A, proteínas reprimidas. Así mismo, los diferentes desórdenes genéticos fueron las principales funciones asociadas a las proteínas expresadas diferencialmente tras la ingesta aguda de las comidas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3.

En términos de función molecular, la señalización e interacción célula-célula (HSFA cinco proteínas, HMUFA dos proteínas y LFHCC cero proteínas), junto con la replicación, recombinación y reparación de ADN (HSFA dos proteínas, HMUFA dos proteínas y LFHCC cero proteínas), fueron las funciones más representadas tras la ingesta de las comidas HSFA y HMUFA en comparación con la comida LFHCC, pero no tras la ingesta de la comida LFHCC n-3 (señalización e interacción célula-célula, dos proteínas; replicación, recombinación y reparación de ADN, dos proteínas). En cambio, las proteínas involucradas en la organización y ensamblaje celular (HSFA una proteína, HMUFA una proteína, LFHCC dos proteínas y LFHCC n-3 tres proteínas), así como aquellas involucradas en la morfología celular (HSFA cero proteínas, HMUFA cero proteínas, LFHCC dos proteínas y LFHCC n-3 dos proteínas) fueron funciones más representadas tras la ingesta de ambas comidas LFHCC que tras la ingesta de las comidas HSFA y HMUFA.

Con el fin de investigar si las proteínas expresadas diferencialmente después de la ingesta de diferentes tipos de grasa interactúan entre sí, analizamos la relación entre las proteínas expresadas diferencialmente en el estado postprandial después de la ingesta aguda de las cuatro comidas. El análisis de las redes de interacción creó 15 diferentes subredes, que se agruparon en dos redes

mediante la fusión de las subredes que compartían una o más proteínas. Las principales funciones asociadas a la red 1 fueron el crecimiento, proliferación, movimiento y desarrollo celular. En el caso de la red 2, fueron la respuesta inflamatoria, la muerte celular, el crecimiento y proliferación celular. Por último, fueron eliminadas aquellas proteínas que no se conectaban directamente a las proteínas identificadas (**Figura 21**).

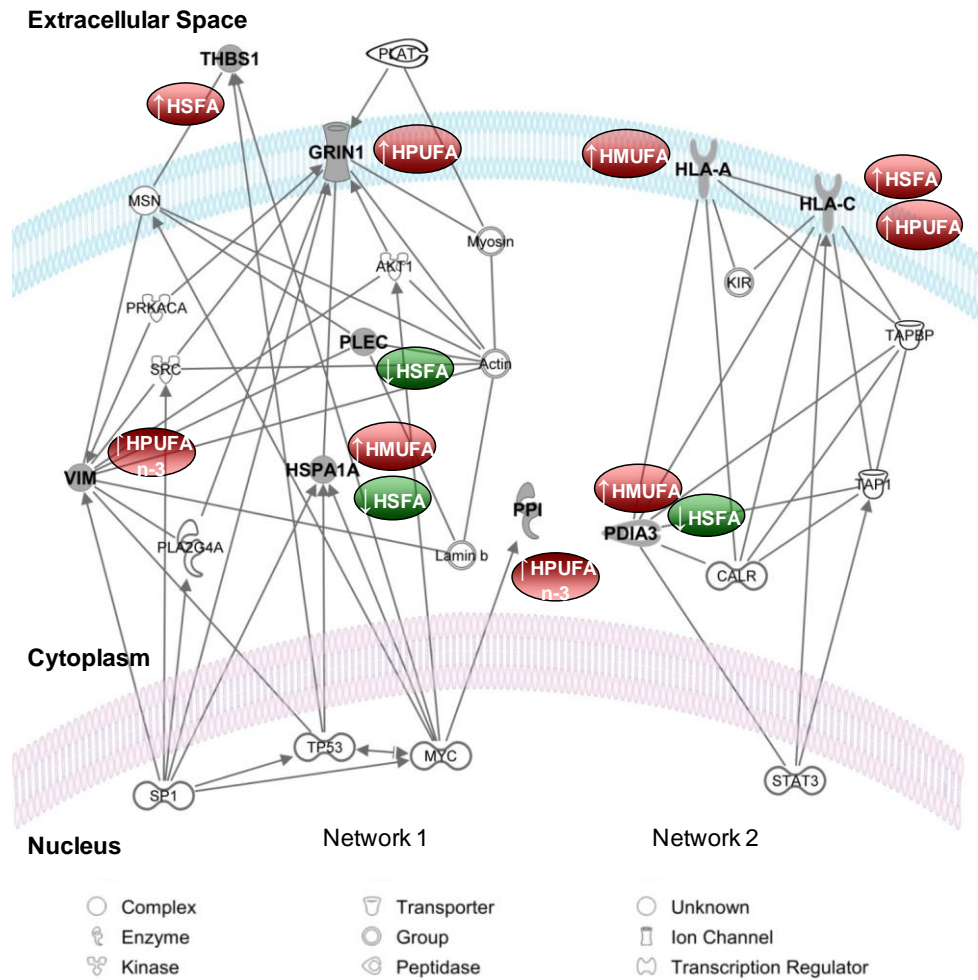


Figura 21. Interacción entre las proteínas inducidas en estado postprandial.

Redes de proteínas expresadas diferencialmente en estado postprandial tras la ingesta aguda de cuatro comidas con diferente tipo de grasa proveniente de la dieta que se encontraban interconectadas e interactuando unas con otras. Los símbolos grises indican que las proteínas estaban sobreexpresadas o reprimidas por la grasa de la dieta en estado postprandial.

VII. DISCUSIÓN

Cantidad y tipo de grasa en la dieta y el estrés oxidativo en tejido adiposo

El consumo de una dieta rica en ácidos grasos saturados, afecta negativamente los niveles de colesterol, marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo dando lugar al desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular [93, 162, 163]. Los estudios de intervención dietética a largo plazo, tienen como objetivo la búsqueda de un modelo dietético idóneo para la prevención y el tratamiento de numerosas patologías, y generalmente administran dietas hipo- y normo-calóricas con una duración de entre 4 a 24 semanas [164-166]. El hecho de que se utilicen dietas normocalóricas e isoenergéticas (dietas con aporte energético similar) en los estudios de intervención, permite estudiar los cambios metabólicos en respuesta a determinados alimentos y/o nutrientes sin influir en el peso corporal [11, 104, 154, 167-169]. Por otra parte, las dietas hipocalóricas, además de la pérdida de peso provocan cambios más acentuados en el perfil metabólico debido a la pérdida de tejido adiposo y muscular provocando desajustes hormonales, lo que puede enmascarar el efecto real del o los alimentos y/o nutrientes estudiados [170-172]. Así pues, en la intervención dietética llevada a cabo en este estudio, se administraron cuatro dietas normocalóricas e isoenergéticas para determinar los efectos sobre el perfil metabólico y bioquímico del organismo y sobre los factores de riesgo del SMet, en respuesta a la ingesta de los alimentos y/o nutrientes que se investigan [164-168].

El desequilibrio entre la producción de radicales libres y su eliminación por los sistemas antioxidantes produce una situación de estrés oxidativo, lo que da lugar a daño celular [1] y a alteraciones en biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos [173]. Estudios en animales han demostrado que el elevado estrés oxidativo sistémico que tiene lugar en condiciones de obesidad, es causado por la producción de ROS en el tejido adiposo pero no en otros tejidos, como consecuencia de un incremento en la expresión de la NADPH-oxidasa, complejo enzimático generador de ROS [99] y la disminución en la expresión de

enzimas antioxidantes [26]. En este contexto nuestros resultados sugieren que la generación de estrés oxidativo en el tejido adiposo de humanos puede ser modulado por la grasa de la dieta.

En estado postprandial, situación en la que la mayoría de las personas pasa la mayor parte del día, se ha observado que la expresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa se incrementa y el proceso de detoxificación de ROS se ve reducido por la disminución en la expresión de algunas de las enzimas antioxidantes y por lo tanto, se produce un desequilibrio que da como resultado el incremento del estrés oxidativo postprandial tras la ingesta de la comida HSFA, situación que no ocurre tras la ingesta de las comidas HMUFA y ambas comidas LFHCC. Nuestros resultados concuerdan con un estudio previo de la misma población a la que hace referencia ésta tesis, donde se demostró que la dieta HMUFA reduce los niveles plasmáticos de los parámetros relacionados con estrés oxidativo en comparación con los efectos de la dieta HSFA y de ambas dietas LFHCC, las cuales tuvieron un efecto intermedio entre las dietas HMUFA y HSFA [11].

Debido a los hábitos alimentarios de hoy en día, la duración del postprandio se extiende durante varias horas e incluso actualmente, las personas pasan la mayor parte del día en estado postprandial [174], el cual es básicamente una condición de estrés, como el incremento de estrés oxidativo que ocurre tras la ingesta de alimentos [143, 175, 176]. Aunque las ROS se generan en condiciones fisiológicas como subproductos del metabolismo, varias enzimas incluyendo la NADPH-oxidasa generan ROS [99]. La NADPH-oxidasa, además de expresarse en las células fagocíticas, también lo hace en las células no fagocíticas del tejido adiposo [119]. La obesidad, componente central del SMet [80-82], está asociada con la acumulación de macrófagos en tejido adiposo [66, 119], donde se producen y liberan especies reactivas de oxígeno por la NADPH-oxidasa durante la explosión oxidativa (del inglés respiratory burst) [177, 178].

Nuestro estudio demostró que los niveles del ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa se incrementaron en estado postprandial, siguiendo un patrón definido de sobreexpresión, tras la ingesta de la comida HSFA. Por lo tanto, la sobreexpresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa en tejido adiposo podría ser la causa del incremento de estrés oxidativo tras la ingesta de la comida HSFA observado en nuestro estudio previo [11].

Los niveles del ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa se ven aumentados en el tejido adiposo de ratones obesos [26, 179, 180] y en personas con SMet [154].

Las enzimas antioxidantes tales como *SOD*, *CAT* y *GPxs* pertenecen a la primera línea de defensa antioxidante ante la agresión de las ROS durante el estrés oxidativo. Nuestro estudio mostró que la ingesta de la comida HSFA reduce la expresión postprandial disminuida de varios de los genes del sistema de defensa antioxidante, *CAT*, *GPx1*, *GPx3* y *TXNRD1*. La función de la enzima *SOD* es catalizar la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y O_2 , donde el H_2O_2 su vez es convertido a agua y oxígeno molecular por las enzimas *CAT* o *GPx*. En la familia de isoenzimas *GPxs*, la isoforma *GPx4* se encarga de la detoxificación de hidroperóxidos lipídicos generados mediante la interacción de lípidos con el anión superóxido [111, 181, 182]. Nuestros resultados sugieren que es la isoforma mitocondrial, *SOD2* en lugar de la isoforma *SOD1*, la principal responsable de la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ en el tejido adiposo durante el periodo postprandial, en base a que los niveles del ARNm de *SOD2* aumentan en estado postprandial, y por el contrario no encontramos cambios significativos en la expresión de la enzima *SOD1*.

Nuestro estudio sugiere que la detoxificación del H_2O_2 por las enzimas *CAT*, *GPx1* y *GPx3* disminuye tras la ingesta de la comida HSFA, en tejido adiposo. Por el contrario, la detoxificación del H_2O_2 parece aumentar tras la ingesta de la comida HMUFA en base al aumento de los niveles del ARNm de las enzimas *CAT* y *GPx1* observado. Estos resultados sugieren que la comida HSFA reduce los niveles del ARNm de los genes antioxidantes *CAT*, *GPx1* y *GPx3*,

involucrados en la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ y la posterior eliminación de H_2O_2 , resultados respaldados por un estudio previo realizado por nuestro grupo, en el cual se observó un incremento postprandial de H_2O_2 en plasma la ingesta de la comida HSFA comparado con las demás comidas administradas a los pacientes [11]. Por otra parte, los niveles de ARNm de *GPx4*, aumentaron tras la ingesta de una comida HSFA, siendo estos niveles de ARNm postprandiales mayores que tras la ingesta de las comidas HMUFA y ambas LFHCC. Esto, sugiere que la expresión de *GPx4*, enzima responsable de la detoxificación de hidroperóxidos lipídicos, aumenta en consecuencia del aumento de la peroxidación lipídica provocado por un elevado estrés oxidativo postprandial tras la ingesta de la comida HSFA [183, 184].

El sistema tiorredoxina es un sistema oxidorreductasa ubicuo con función antioxidante y de regulación redox. Este sistema se compone de las proteínas Tiorredoxina (*TXN*) y Tiorredoxina reductasa (*TXNRDI*), además de la enzima NADPH [43]. Aunque no hemos encontrado diferencias entre dietas en los niveles de ARNm de *TXN*, sí que observamos una disminución postprandial en los niveles de ARNm de *TXNRDI*, enzima que reduce a *TXN* [185], sugiriendo que la capacidad para reciclar la proteína *TXN* de la forma oxidada a la reducida, se ve disminuida tras la ingesta de la comida HSFA. Por el contrario, la ingesta de una comida HMUFA y ambas comidas LFHCC aumentaron los niveles de ARNm de *TXNRDI* en estado postprandial.

Los resultados de expresión génica observados en ayunas reflejan la activación del sistema de defensa antioxidante contra el estrés oxidativo generado tras el consumo de la dieta HSFA, sistema de defensa antioxidante cuya inducción se ve reducida en estado postprandial con esta dieta lo que se refleja en unos menores niveles postprandiales de ARNm de enzimas antioxidantes [154]. Estos resultados, coinciden con estudios realizados en tejido adiposo de modelos animales obesos y diabéticos, respecto a la disminución de los antioxidantes *SOD*, *CAT* y *GPx* [26, 186, 187].

Posiblemente el ataque que sufren las células en estado de ayunas es menos agresivo, por lo que todavía el sistema de defensa antioxidante puede responder, en cambio difiere de lo que ocurre en estado postprandial donde el sistema de defensa antioxidante se ve claramente deteriorado [154].

La grasa acumulada *per se* incrementa el estrés oxidativo en la obesidad, incrementando la NADPH-oxidasa y disminuyendo los antioxidantes probablemente como resultado de la disfunción del tejido adiposo [26].

Por otra parte, también se analizó *NFE2L2*, factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes que codifican para proteínas antioxidantes y enzimas de fase II. El balance entre la producción de ROS y su detoxificación por las enzimas antioxidantes está regulado por el factor de transcripción *NFE2L2* [188], el cual migra al núcleo como respuesta al estrés oxidativo y promueve la expresión de genes antioxidantes [189, 190]. En ausencia de estrés en las células, el *NFE2L2* se encuentra regulado por Keap1 en el citoplasma, y se encuentra en constante ubiquitinación por el complejo Cul3-Keap1 ubiquitin ligasa, por lo tanto *NFE2L2* es degradado rápidamente por el proteosoma [46-48]. De acuerdo con esto, la disminución de los niveles de ARNm de *NFE2L2* observados en aquellos pacientes que consumieron una comida HSFA podría explicarse por el hecho de que, esos mismos pacientes presentaron niveles más altos del ARNm de Keap1 en comparación con los pacientes que consumieron las demás comidas. Una posible explicación es que los ácidos grasos saturados están bloqueando la expresión de genes antioxidantes y por lo tanto causan un incremento del estrés oxidativo mediante el aumento en los niveles de ARNm de Keap1.

Células mononucleares de sangre periférica efectos a largo plazo

Las CMSP (linfocitos y monocitos) desempeñan un papel importante en el sistema inmunológico [113, 155]. La inflamación de bajo grado se asocia con la activación de las CMSP y con cambios en la expresión de citoquinas relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune, tales como la interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral- α [156, 157]. Además, se ha demostrado que las CMSP son útiles para distinguir entre un estado de salud y de enfermedad, alterando su perfil normal de liberación de proteínas a otro mucho más pro-inflamatorio en presencia de enfermedad [191, 192], y tras la ingesta dietética, reflejando lo que ocurre a nivel sistémico modificando la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo [104, 133, 137, 156]. En este bloque experimental analizamos el uso de las CMSP como modelo celular *in vivo*, mediante estudios de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, ante el estímulo provocado por la grasa de la dieta y como biomarcadores del estrés oxidativo generado en el tejido adiposo.

Nuestros resultados muestran que la ingesta de una comida HSFA aumenta en las CMSP los niveles postprandiales de ARNm de *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* y *TXNRD1*, genes involucrados en la defensa antioxidante, en respuesta al estrés oxidativo, mientras que en estado de ayunas los niveles de ARNm de los genes antioxidantes, *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* y *NFE2L2*, aumentaron con todas las dietas tras las 12 semanas de intervención dietética, lo que sugiere una respuesta adaptativa a la dieta que en estado de ayunas no parece discriminar entre la cantidad y tipo de grasa. No obstante, la ingesta de la comida HSFA aumentó la expresión postprandial de los genes que codifican para las diferentes subunidades del complejo enzimático generador de ROS [99] NADPH-oxidasa (*gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p47^{phox}* y *p40^{phox}*).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios previos en esta misma población, basados en los parámetros de estrés oxidativo en plasma, donde la ingesta de una comida HSFA aumentó el estrés oxidativo postprandial en

comparación con la ingesta de las demás comidas [11]. No obstante, en tejido adiposo subcutáneo, se observó un incremento en los niveles de ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa y una disminución en la expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes tras la ingesta de una comida HSFA, lo que sugiere un aumento de estrés oxidativo en este tejido [154]. Estas observaciones apoyan la idea de que los cambios en los parámetros oxidativos observados en las CMSP reflejan, lo que ocurre en el tejido adiposo de pacientes con SMet, es decir, responden al estrés oxidativo generado en el tejido adiposo.

De acuerdo al estilo de vida actual, la mayoría de las personas pasan gran parte del día en estado postprandial [123], condición que se caracteriza por un incremento del estrés oxidativo [143, 175, 176], causado por un desequilibrio entre la producción de ROS como subproductos del metabolismo o generados por el complejo enzimático NADPH-oxidasa [26, 137] y la detoxificación de las ROS por los antioxidantes [1, 193].

No obstante, el estrés oxidativo postprandial puede ser modulado por la dieta según resultados observados en varios estudios [11, 107, 136, 137, 194]. De hecho, estos estudios demostraron que el consumo de ácidos grasos saturados causa efectos nocivos relacionados con el incremento de marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo; este último causado por la generación de ROS como subproductos del metabolismo, así como también por el complejo enzimático NADPH-oxidasa [26, 99, 137, 194]. De acuerdo con esto, se observó un aumento postprandial de los niveles de ARNm de *SOD1*, *SOD2*, *GPx1*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* y *TXNRD1* en CMSP, a las 2 horas de la ingesta de la comida HSFA, mientras que estos mismos genes antioxidantes se mantuvieron sin cambios tras la ingesta de las demás comidas.

Ha sido demostrado que en respuesta al estrés oxidativo, las células incrementan su sistema de defensa antioxidante [11, 137, 143], por lo que el incremento postprandial que hemos observado en los niveles de ARNm de *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1* y *GPx4* a las 2 horas, podría ser consecuencia del estrés

oxidativo postprandial generado tras la ingesta de la comida HSFA a diferencia de las demás comidas administradas a los pacientes [11]. Por el contrario, en el tejido adiposo se observó la disminución postprandial en los niveles de ARNm de varios antioxidantes tales como *CAT*, *GPx1*, *GPx3* y *TXNRD1* tras la ingesta de la comida HSFA [154] de un subgrupo de la población analizada en este estudio, lo que causa, al menos en parte, un desequilibrio entre la generación de ROS y la detoxificación tras la ingesta de la comida HSFA, dando lugar al incremento del estado oxidativo [11, 154].

Las CMSP han sido ampliamente utilizadas para estudiar los cambios en el estado inflamatorio y de estrés oxidativo inducidos por la intervención dietética [136, 137]. Sin embargo, en términos de estrés oxidativo, los resultados encontrados en CMSP eran contradictorios con la hipótesis de Furukawa, respecto al incremento del estrés oxidativo sistémico generado por el tejido adiposo como consecuencia de la disminución de la expresión de genes antioxidantes [26, 154], ya que los estudios en CMSP demostraron el incremento de su sistema de defensa antioxidante cuando aumenta el estrés oxidativo [136, 137, 195].

Nuestros resultados sugieren que la maquinaria de defensa antioxidante en las CMSP se activa en estado postprandial mediante el aumento en los niveles de ARNm de los genes antioxidantes tras la ingesta de la comida HSFA, mientras que en ayunas, la expresión de estos genes parece aumentar de manera constitutiva tras el consumo de todas las dietas [136, 137, 154].

Basados en estudios previos de esta población, y en lo referente a los incrementados niveles postprandiales de ARNm de los antioxidantes *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1* y *GPx4* a las 2 h de la ingesta de una comida HSFA, sugiere que el incremento del estrés oxidativo postprandial es generado en el tejido adiposo tras la ingesta de la comida HSFA [11, 154], y en respuesta a este aumento del estrés oxidativo, las células mononucleares de sangre periférica parecen reforzar sus defensas antioxidantes mediante el aumento de la expresión de los genes antioxidantes.

Junto con los cambios en la expresión génica descritos en párrafos anteriores, también observamos que la ingesta de la comida HSFA aumentó los niveles de ARNm de *GSR* y *TXNRDI* en comparación con la ingesta de las comidas HMUFA, LFHCC y LFHCC n-3. La función de la *GSR* es catalizar la reducción del glutatión oxidado (*GSSG*) a glutatión reducido (*GSH*), el cual es utilizado como sustrato por la *GPx* en presencia de H_2O_2 [37, 38], por su parte, la *TXNRDI* es una oxidoreductasa que depende de NADPH y transfiere los electrones al sitio activo de la *TXN* oxidada (disulfuro -S₂) y ésta se reduce (ditiol [-(SH)₂]), luego se transfieren los equivalentes reductores a los grupos disulfuro de las proteínas diana y la *TXN* se oxida de nuevo [44, 45] [185]. Por lo tanto, es probable que el aumento en los niveles de ARNm de *GSR* y *TXNRDI* a las 2 horas del consumo de una comida HSFA, incrementa la presencia de *GSH* y *TXN* en su forma reducida para reforzar los sistemas antioxidantes de la célula, con el fin de disminuir el estrés oxidativo inducido por la ingesta de grasa saturada, así como también reducir la oxidación de macromoléculas o proteínas [196], probablemente más abundantes tras la ingesta de la comida HSFA, basándonos en nuestros estudios previos [11, 154].

En condiciones de estrés oxidativo, el complejo *KEAP1-NFE2L2* localizado en el citoplasma se rompe, y *NFE2L2* migra al núcleo para unirse específicamente a ARE (elemento de respuesta antioxidante) y promover la expresión de genes que codifican la respuesta antioxidantes tales como *CAT*, *SOD* y *GPx* [49, 137]. De acuerdo con los cambios de expresión génica observados tras la ingesta de la comida HSFA, también observamos un incremento en los niveles de la proteína *NFE2L2* en la fracción nuclear, así como su descenso en la fracción citoplasmática tras la ingesta de la comida HSFA, lo cual pudo haber ocurrido como una respuesta al aumento de ROS tras la comida HSFA. Estos resultados coinciden con un estudio previo llevado a cabo en una población de personas mayores [137].

Como ya hemos señalado antes, las especies reactivas de oxígeno son generadas como subproductos del metabolismo, pero varias enzimas, incluso la NADPH-oxidasa está relacionada con la producción de ROS [186, 197]. Estudios en modelos animales demostraron que el consumo de dietas altas en grasas, incrementan la expresión de NADPH-oxidasa [136, 137]. Así mismo, nuestro grupo ha demostrado que la calidad de la grasa de la dieta es también un factor que puede modular la expresión de este complejo enzimático [137]. De hecho, se observó que el consumo de grasa saturada induce un incremento en la expresión postprandial de subunidades de la NADPH-oxidasa, $p22^{phox}$ y $p47^{phox}$ en comparación con el consumo de grasa monoinsaturada. De acuerdo con esto, hemos demostrado que en CMSP de pacientes con SMet, la ingesta de una comida HSFA incrementa los niveles de ARNm de las subunidades de la NADPH-oxidasa tales como $p91^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p40^{phox}$ y del factor de transcripción PU.1 relacionado con la regulación positiva de la transcripción de $p91^{phox}$ [198]. A diferencia de los genes antioxidantes, los cuales son inducidos en las CMSP y disminuyen en tejido adiposo tras la ingesta de una comida HSFA, la expresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa parece incrementar tanto en CMSP como en tejido adiposo tras la ingesta de la comida HSFA y se mantiene sin cambios tras la ingesta de las otras tres comidas en CMSP y en tejido adiposo.

Cabe destacar que hemos observado un estrecho paralelismo entre los cambios en la expresión génica tras la ingesta de la comida HSFA, donde se incrementa la expresión de genes antioxidantes a las 2 horas de la ingesta y descienden a las 4 h hasta niveles basales, y los parámetros plasmáticos de estrés oxidativo, los cuales se incrementan a las 2 h de la ingesta y descienden hasta niveles basales a las 4 horas [11]. De acuerdo con esto, nuestros resultados también demostraron una correlación positiva entre varios parámetros de estrés oxidativo tales como H_2O_2 , proteínas carboniladas y lipoperóxidos con la expresión génica de las subunidades de la NADPH-oxidasa y genes antioxidantes en estado postprandial.

Con estas observaciones demostramos que el incremento en la expresión de genes antioxidantes tienen lugar en las CMSP en respuesta al incremento en la expresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa y el aumento de ROS tras la ingesta de una comida HSFA, situación en la cual se generan productos secundarios tales como H₂O₂, proteínas carboniladas y lipoperóxidos produciendo daño oxidativo.

Proteómica. Efecto postprandial agudo

La importancia de nuestro estudio radica en que muestra la respuesta postprandial del proteoma a diferentes modelos dietéticos en pacientes con SMet, cuya etiología está relacionada precisamente con los hábitos alimenticios, y entre los que se destaca el tipo de grasa de la dieta [79]. Nuestro abordaje proteómico nos proporcionó 23 proteínas expresadas diferencialmente en estado postprandial tras la ingesta aguda de cuatro comidas con diferentes calidades de grasa. Las comidas HSFA y HMUFA causaron cambios proteómicos postprandiales en procesos tales como señalización e interacción celular y la reparación del ADN. En contraste, la ingesta de la comida LFHCC provocó cambios postprandiales en las proteínas implicadas en procesos tales como ensamblaje y organización celular o morfología celular. Además, la suplementación de una comida LFHCC con PUFA n-3 de cadena larga provocó cambios en el proteoma relacionado con la señalización e interacción celular, reparación del ADN, ensamblaje y organización celular, y la morfología celular.

En el presente estudio demostramos que a pesar de la heterogeneidad de las sobrecargas grasas administradas en forma de comida, en términos de calidad de la grasa, la mayor parte de las proteínas de la respuesta postprandial aguda, podrían agruparse en una red interconectada y asociada a funciones celulares tales como crecimiento y proliferación celular (red 1), la cual podría ser clave para el desarrollo de la aterosclerosis ya que se ha demostrado que la progresión de esta enfermedad está asociada con la expansión clonal de las células T [199].

No obstante, ninguno de los modelos dietéticos administrados mostró un perfil proteómico que indique de forma clara que alguna de las comidas provoque la inducción o represión del crecimiento y la proliferación de CMSP. El hecho de que la ingesta de las comidas provocó el aumento o disminución en la expresión postprandial de sólo una o dos proteínas en la red 1, sugiere que la grasa de la dieta podría afectar a los procesos de crecimiento y proliferación celular en estado postprandial, pero no en las proporciones de ácidos grasos o las dosis administradas en nuestro estudio.

Cabe destacar que, varias de las proteínas expresadas diferencialmente o las isoformas de proteínas observadas en nuestro estudio [proteína de choque térmico (HSPA1A, HSPA6), cadena reguladora de miosina, subunidad activadora del proteasoma, filamina alfa, cadena beta de fibrinógeno y trombospondina] han demostrado ser moduladas por las isoflavonas de la soja en ayunas tras una intervención dietética a largo plazo [134]. Este estudio mostró el efecto crónico de una dieta con extracto de soja enriquecida con isoflavonas en mujeres posmenopáusicas. Estos hallazgos, junto con los nuestros apoyan la idea de que estas proteínas son sensibles a la modulación por la intervención dietética.

El estado postprandial se relaciona con un aumento en la producción de ROS, lo que puede causar daño a las macromoléculas biológicas tales como las proteínas y el ADN [200, 201]. La proteína HSPA1A, es un miembro de la familia de las proteínas de choque térmico [202], cuya expresión génica es reprimida por p53, cuando está activada por daño al ADN [203]. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la ingesta de una comida HMUFA, después del consumo a largo plazo de una dieta rica en MUFA disminuye varios biomarcadores de estrés oxidativo postprandial en comparación con la ingesta de la comida HSFA después del consumo a largo plazo de una dieta rica en SFA [11]. Teniendo en cuenta que p53 tiene funciones antioxidantes que protegen al genoma de la oxidación producida por el estrés oxidativo [204, 205], nuestros resultados sugieren que la activación de p53 por el estrés oxidativo postprandial tras la

ingesta de una comida HSFA - probablemente por daño al ADN, tal como se demostró previamente en un población de edad avanzada [206] - podría ser responsable de la reducción postprandial de la proteína HSPA1A y, el efecto contrario, el aumento postprandial tras la ingesta de una comida HMUFA, lo que puede explicarse por la falta de activación postprandial de p53.

Cabe destacar que, la proteína THBS-1, una glicoproteína de adhesión celular cuya expresión génica es incrementada por p53 [207], aumentó su expresión postprandial tras la ingesta de la comida HSFA y se mantuvo sin cambios tras la ingesta de las otras tres comidas. Esta glicoproteína está involucrada en la agregación plaquetaria [208], un proceso fisiológico de defensa contra la hemorragia no controlada, pero que en ciertas condiciones puede llegar a ocluir los vasos sanguíneos con trombos, lo que puede llegar a provocar la aparición de eventos cardiovasculares, incluyendo angina inestable e infarto de miocardio [209]. De hecho, también observamos una disminución postprandial en la cadena beta de fibrinógeno (FGB), cuya síntesis es la etapa limitante en la producción de fibrinógeno maduro [210]. El fibrinógeno es cortado por la trombina para formar fibrina insoluble, que es el componente más abundante de los coágulos de sangre [211]. Por lo tanto, la disminución postprandial de FGB tras la ingesta de la comida HSFA sugiere un aumento en la producción de fibrina por corte y liberación, lo que reduce la cantidad de sustrato, FGB.

Tanto el aumento postprandial de la proteína THSB1, como la disminución de FGB sugieren un estado pro-coagulante, tras la ingesta de la comida HSFA en comparación con la ingesta de las otras comidas estudiadas. En este sentido, se ha relacionado el desequilibrio entre la actividad pro-coagulante y pro-fibrinolíticas con cardiopatía coronaria [212]. Esto es básicamente importante en pacientes con SMet, ya que presentan un estado protrombótico en estado de ayunas [69] que parece incrementarse en estado postprandial tras la ingesta de la comida HSFA.

La idea de que varios de los cambios postprandiales observados en el proteoma sean debido al aumento del estrés oxidativo postprandial tras la ingesta de la comida HSFA, se apoya en el hecho de que SMC6, una proteína implicada en el mantenimiento de la estructura de los cromosomas [213] y PSME1, un activador del proteosoma [214] que recientemente ha sido relacionado con la protección frente al estrés oxidativo [215], aumentaron su expresión postprandial en aquellos pacientes que consumieron esta dieta. Por otra parte, REV3, una proteína implicada en la síntesis del ADN de translesión [216], disminuyó su expresión tras la ingesta de la comida HSFA. Cabe destacar, que los niveles de las proteínas SMC6, PSME1 y REV3 se mantuvieron sin cambios tras la ingesta de las otras tres comidas.

Por otro lado, PDIA3 (también llamado ERp57) pertenece a una familia de oxidorreductasas, que incluyen a PDI, ERp72, P5 y PDIR que están implicados en la formación de enlaces disulfuro nativos, y en condiciones de estrés oxidativo, las oxidorreductasas se reducen rápidamente y permanecen activas. Cabe destacar que, PDIA3 ha demostrado ser reducido directamente por el glutatión [217], una molécula que aumenta en el estado postprandial tras una comida HMUFA luego del consumo a largo plazo de una dieta rica en MUFA, y disminuye tras la ingesta de la comida HSFA luego del consumo a largo plazo de una dieta rica en SFA en nuestra población [11]. En conjunto, estos resultados indican que la dieta HSFA podría disminuir los niveles de PDIA3 a corto plazo y reprimir la actividad de la enzima, cuando el componente responsable de su reducción (glutatión) es escaso (es decir, tras la ingesta a largo plazo de una dieta HSFA). Por el contrario, la expresión postprandial aumentó tras la ingesta de la comida HMUFA, así como los niveles de glutatión pueden ser mayores que los observados tras la ingesta de la comida HSFA, como ha sido demostrado por Pérez-Martínez et al. [11].

En su conjunto, estos hallazgos sugieren que el proteoma o al menos en parte, parece estar respondiendo al estado oxidativo en estado postprandial tras la ingesta de las diferentes comidas administradas en este estudio, directamente y

mediante el daño al ADN. Además de la relación con el estrés oxidativo, la ruta principal asociada con las proteínas expresadas diferencialmente tras la ingesta de la comida HSFA, fue la respuesta inflamatoria, lo cual apoya la relación entre el estrés oxidativo y la inflamación [101, 218]. Cabe destacar que, aunque HSPA1A y PDIA3 pertenecen a la familia de las proteínas asociadas al estrés de retículo endoplásmico (HSP70 y PDI), estas isoformas parecen responder al estrés oxidativo en lugar de responder al estrés de retículo endoplásmico, que a su vez está relacionado con el estrés oxidativo [219], y esto apoya el concepto de que la respuesta al mal plegamiento de las proteínas cumple un amplio espectro de funciones fisiológicas [220]. Por lo tanto, en condiciones de estrés oxidativo postprandial elevado (es decir, tras la ingesta de una comida HSFA), que parece tener una deficiencia en la respuesta al mal plegamiento de las proteínas en pacientes con SMet, lo que también podría contribuir al deterioro del estado postprandial de estos pacientes.

Cuando las comidas contenían porcentajes similares de SFA y MUFA (comidas LFHCC), no se observaron cambios en el proteoma relacionados con el estrés oxidativo, probablemente debido a una situación intermedia entre las comidas HSFA y HMUFA. Sin embargo, la ingesta de las comidas LFHCC (con o sin suplementos de n-3) parecen causar cambios postprandiales en la morfología celular, según lo sugiere la reducción postprandial observada en FLNA (filamina alfa) y MRLC3 (cadena ligera reguladora de la miosina) tras la ingesta de LFHCC, y VIM (vimentina) y CAPZB (Capping protein, filamentos de actina) tras la ingesta de LFHCC suplementada con ácidos grasos n-3 de cadena larga.

Además, la suplementación de una comida LFHCC con PUFA n-3 de cadena larga dio lugar a un cambio en el proteoma relacionado con el metabolismo de ácidos grasos. La beta-oxidación de ácidos grasos se lleva a cabo tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas. Las mitocondrias catalizan la beta-oxidación de la mayor parte de los ácidos grasos derivados de la dieta, y los peroxisomas están involucrados preferentemente, en la beta-oxidación del

acortamiento de la cadena de ácidos grasos de cadena larga [221]. Se ha sugerido que la ingesta incrementada o suplementación con ácidos grasos n-3 pueden mejorar los defectos en la señalización de insulina [222]. Pues, se ha demostrado que la beta-oxidación peroxisomal es inhibida por la insulina [223] y el hecho de que en nuestro estudio observamos que los niveles de la proteína ECH1, una enzima implicada en la vía de la beta-oxidación peroxisomal [224], disminuyó tras la ingesta de una comida LFHCC n-3, sugiere que la reducción postprandial en la expresión de ECH1 y la consiguiente reducción de la beta-oxidación peroxisomal podrían ser la base de efectos beneficiosos en la señalización de insulina observada tras la ingesta de ácidos grasos n-3, y por consiguiente sugiere que la inhibición de la beta-oxidación peroxisomal por la insulina podría ser causado por la reducción postprandial en la expresión de la proteína ECH1.

Así mismo, la suplementación de una comida LFHCC con PUFA n-3 dio lugar al aumento en la expresión postprandial de PPIA (ciclofilina A), una proteína que se une a la ciclosporina, un inmunosupresor que por lo general se utiliza para evitar el rechazo en órganos trasplantados, mediante la interrupción en la producción de moléculas pro-inflamatorias TNF- α e interleucina-2 [225], y que está involucrada también en los efectos anti-inflamatorios asociados al consumo de ácidos grasos n-3 [226]. Por lo tanto, el consumo de PUFA n-3 podría potenciar el efecto de la ciclosporina, lo cual apoyaría la idea de la administración terapéutica de PUFA n-3 en combinación con ciclosporina después de un trasplante de órganos.

Discusión general

Desde una perspectiva general, este trabajo aporta información relevante sobre el efecto de la cantidad y calidad de la grasa en la dieta sobre el estrés oxidativo postprandial. La importancia de realizar estudios postprandiales frente a realizarlos analizando el efecto de la dieta en ayunas, radica en el hecho de que en la actualidad, el estado postprandial es el estado en el que las personas pasamos la mayor parte del tiempo.

Este trabajo de tesis doctoral muestra por un lado el efecto de la ingesta aguda de comidas con diferente tipo de grasa, llevado a cabo antes del periodo de intervención dietética, lo que nos ha permitido identificar proteínas de respuesta rápida a la grasa en la dieta sin el enmascaramiento que pudiera derivarse de efectos adaptativos tras un periodo de consumo a largo plazo, y por otro, el efecto postprandial tras el periodo de intervención dietética, tras las 12 semanas de intervención dietética, una situación más extrapolable a la vida real de las personas que siguen diferentes modelos de dietas en función del lugar que habitan (dieta occidental, dieta mediterránea y la dieta oriental) o por elección de un modelo de dieta en concreto.

Nuestros resultados han demostrado que en el estado postprandial, situación en la que las personas pasan la mayor parte del día, la expresión de las subunidades de la NADPH-oxidasa aumentan y el proceso de detoxificación de ROS disminuye, mediante la disminución de la expresión de genes antioxidantes, tras la ingesta de la comida HSFA, lo que sugiere que el consumo de grasa saturada genera un aumento del estrés oxidativo en el tejido adiposo de personas con SMet, lo cual parece incrementar el estrés oxidativo sistémico reflejado en nuestros resultados en CMSP, en contrapartida con el estudio previo basado en medidas plasmáticas de marcadores de estrés oxidativo.

En términos de estrés oxidativo, este mecanismo concuerda con el propuesto por Furukawa [26], quien describió el mecanismo por el cual el estrés oxidativo sistémico observado en la obesidad, es causado por la producción de

ROS en el tejido adiposo y no en otros tejidos, como consecuencia de un aumento en la expresión de la NADPH-oxidasa y una disminución en la expresión de los antioxidantes [26]. Esto sugiere que, el estrés oxidativo postprandial observado en nuestro estudio, podría ser generado en el tejido adiposo tras la ingesta de la comida HSFA [11, 154], debido al incremento en la expresión de la NADPH-oxidasa y la disminución de genes antioxidantes [154] y además, verse reflejado en el incremento del sistema de defensa antioxidante en las CMSP, cuando aumenta el estrés oxidativo generado en tejido adiposo [136, 137, 195].

De hecho, nuestros resultados sugieren que las CMSP activan su maquinaria de defensa antioxidante en estado postprandial, mediante el aumento en los niveles de ARNm de los genes antioxidantes tras la ingesta de la comida HSFA, en respuesta al estrés oxidativo postprandial generado en el tejido adiposo [26, 154]. Estos resultados muestran la utilidad del estudio de las CMSP como biomarcadores de estrés oxidativo, y apoyan la idea de que son una herramienta útil para evaluar entre estado de salud o enfermedad [156, 157, 191], así como para evaluar los cambios que ocurren en el estado oxidativo e inflamatorio estimulado en respuesta a distintos tratamientos [104, 106, 136, 137, 169].

Por otra parte, hemos evaluado el efecto global del tipo de grasa ingerida en la dieta mediante una aproximación proteómica que nos ha permitido identificar proteínas de respuesta rápida a la calidad de la grasa de la dieta en el proteoma de CMSP de pacientes con SMet. Nuestros resultados mostraron una estrecha relación entre la ingesta de grasa saturada y la expresión de proteínas involucradas en la ruta del estrés oxidativo, así como en procesos de daño al ADN y estado pro-coagulante [169] en comparación con la ingesta de grasas monoinsaturadas y poli-insaturadas. Desde el punto de vista clínico vemos que la expresión postprandial de las proteínas THBS-1 y cadena beta de fibrinógeno (FGB) tras la ingesta de la comida HSFA están relacionadas con la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular [212], cuyo desarrollo está estrechamente relacionado con los componentes del SMet [59, 69].

En resumen, nuestro trabajo muestra que la ingesta de una comida rica en grasas saturadas aumenta el estrés oxidativo, lo cual a su vez ha sido asociado a la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes y el SMet [18, 26, 154]. Además, elevados niveles de ROS, favorecen a la disfunción vascular, lo cual ocurre en condiciones fisiopatológicas tales como, hipertensión, aterosclerosis, diabetes, hiperhomocisteinemia, insuficiencia cardíaca, sepsis, hemorragia subaracnoidea, envejecimiento y Alzheimer [111, 136, 137], de las cuales algunas son componentes del SMet.

VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRINCIPAL

El consumo de grasa saturada aumenta el estrés oxidativo postprandial, como consecuencia del desequilibrio entre la producción y detoxificación de ROS en tejido adiposo, lo cual no ocurre cuando se ingieren dietas ricas en grasas monoinsaturadas o bajas en grasas y ricas en hidratos de carbono complejos.

CONCLUSIONES SECUNDARIAS

1. El consumo de grasa monoinsaturada aumenta la expresión postprandial de enzimas antioxidantes en el tejido adiposo y consecuentemente reduce el estrés oxidativo.

2. En términos de estrés oxidativo, las células mononucleares de sangre periférica y el tejido adiposo responden de forma diferente frente a la grasa ingerida en la dieta. Si bien, la NADPH-oxidasa, tras la ingesta de grasa saturada aumenta tanto en células mononucleares de sangre periférica como en tejido adiposo, la expresión de los genes antioxidantes disminuye en tejido adiposo y aumenta en células mononucleares de sangre periférica.

3. En el estado postprandial, unos niveles elevados de biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo están asociados a una mayor expresión de genes de las subunidades de la NADPH-oxidasa y genes antioxidantes en células mononucleares de sangre periférica.

4. Los cambios observados en el proteoma de las células mononucleares de sangre periférica tras la ingesta de una comida rica en grasas saturadas, frente a comidas ricas en grasas monoinsaturadas y poli-insaturadas, en términos de daño al ADN y estado pro-coagulante, reflejan un mayor estrés oxidativo postprandial. Además, los cambios en el proteoma sugieren que los ácidos grasos PUFA n-3 de

Conclusiones

cadena larga mejoran la señalización de insulina y ejercen un efecto anti-inflamatorio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ďuračková Z. Current Insights into Oxidative Stress. *Physiol. Res.* 2010;59:459-69.
- [2] Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142:231-55.
- [3] Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1995;35:7-20.
- [4] Gutiérrez CJRV. Daño Oxidativo, Radicales libres y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 2002;31:126-33.
- [5] Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84:1381-478.
- [6] Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 2011;13:361-6.
- [7] Meza-Miranda ER, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, et al. Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people. *Age (Dordr).* 2013;doi:10.1007/s11357-013-9579-y.
- [8] Ballesteros M, Fredriksson A, Henriksson J, Nystrom T. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *Embo J.* 2001;20:5280-9.
- [9] Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, Taddei F, Radman M, Nystrom T. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:5746-9.
- [10] Alondra E. Díaz-Acosta, Membrillo-Hernández J. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 2006;9:34-44.
- [11] Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci.* 2010:251-61.
- [12] Cabisco E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol.* 2000;3:3-8.
- [13] Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-

- mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;293:C584-96.
- [14] Foster DB, Van Eyk JE, Marban E, O'Rourke B. Redox signaling and protein phosphorylation in mitochondria: progress and prospects. *J Bioenerg Biomembr.* 2009;41:159-68.
- [15] Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem.* 2002;80:780-7.
- [16] Varabyova A, Topf U, Kwiatkowska P, Wrobel L, Kaus-Drobek M, Chacinska A. Mia40 and MINOS act in parallel with Ccs1 in the biogenesis of mitochondrial Sod1. *Febs J.* 2013.
- [17] Joo YC, Oh DK. Lipoxygenases: potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. *Biotechnol Adv.* 2012;30:1524-32.
- [18] Krieger-Brauer HI, Medda PK, Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Galphai2. *J Biol Chem.* 1997;272:10135-43.
- [19] Mahadev K, Wu X, Zilbering A, Zhu L, Lawrence JT, Goldstein BJ. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:48662-9.
- [20] Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood.* 1999;93:1464-76.
- [21] Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol.* 2004;16:42-7.
- [22] Li SL, Valente AJ, Zhao SJ, Clark RA. PU.1 is essential for p47(phox) promoter activity in myeloid cells. *J Biol Chem.* 1997;272:17802-9.
- [23] Marden CM, Stefanidis D, Cunnigham-Graham DS, Casimir CM. Differentiation-dependent up-regulation of p47(phox) gene transcription is associated with changes in PU.1 phosphorylation and increased binding affinity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305:193-202.
- [24] Assari T. Chronic Granulomatous Disease; fundamental stages in our understanding of CGD. *Med Immunol.* 2006;5:4.
- [25] Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Goraca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2012;60:277-94.
- [26] Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114:1752-61.

- [27] Martino F, Loffredo L, Carnevale R, Sanguigni V, Martino E, Catasca E, et al. Oxidative stress is associated with arterial dysfunction and enhanced intima-media thickness in children with hypercholesterolemia: the potential role of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Pediatrics*. 2008;122:e648-55.
- [28] Mendoza Cousette U, García Piñeiro JC, Gastell PL, Armenteros AA. Xantina oxidorreductasa, propiedades, funciones y regulación de su expresión genética. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2005;24.
- [29] Armitage ME, Wingler K, Schmidt HH, La M. Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87:1071-6.
- [30] Roe ND, Ren J. Nitric oxide synthase uncoupling: a therapeutic target in cardiovascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2012;57:168-72.
- [31] Skrzypczak-Jankun E, Jankun J, Al-Senaïdy A. Human lipoxigenase: developments in its structure, function, relevance to diseases and challenges in drug development. *Curr Med Chem*. 2012;19:5122-7.
- [32] Dobashi Y, Miyakawa Y, Yamamoto I, Amao H. Effects of intestinal microflora on superoxide dismutase activity in the mouse cecum. *Exp Anim*. 2011;60:133-9.
- [33] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002;33:337-49.
- [34] FAO/WHO. Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Bangkok, Thailand. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome and World Health Organization, Geneva. 2001.
- [35] Naziroglu M. Molecular role of catalase on oxidative stress-induced Ca(2+) signaling and TRP cation channel activation in nervous system. *J Recept Signal Transduct Res*. 2012;32:134-41.
- [36] Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol*. 2000;296:295-309.
- [37] Kobayashi H, Matsuda M, Fukuhara A, Komuro R, Shimomura I. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296:E1326-34.
- [38] Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *Febs J*. 2008;275:3959-70.

- [39] Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;250:70-9.
- [40] Utomo A, Jiang X, Furuta S, Yun J, Levin DS, Wang YC, et al. Identification of a novel putative non-selenocysteine containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (NPGPx) essential for alleviating oxidative stress generated from polyunsaturated fatty acids in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2004;279:43522-9.
- [41] Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem.* 2009;390:191-214.
- [42] Satoh N, Watanabe N, Kanda A, Sugaya-Fukasawa M, Hisatomi H. Expression of glutathione reductase splice variants in human tissues. *Biochem Genet.* 2010;48:816-21.
- [43] Holmgren A, Lu J. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396:120-4.
- [44] Nordberg J, Arner ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1287-312.
- [45] Burke-Gaffney A, Callister ME, Nakamura H. Thioredoxin: friend or foe in human disease? *Trends Pharmacol Sci.* 2005;26:398-404.
- [46] Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, et al. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 1999;13:76-86.
- [47] Nguyen T, Sherratt PJ, Nioi P, Yang CS, Pickett CB. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *J Biol Chem.* 2005;280:32485-92.
- [48] Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem.* 2009;284:13291-5.
- [49] Aleksunes LM, Manautou JE. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol.* 2007;35:459-73.
- [50] Hayes JD, McMahon M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett.* 2001;174:103-13.

- [51] Nguyen T, Sherratt PJ, Pickett CB. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:233-60.
- [52] Bachmann K. Chapter 8. Drug Metabolism. In: WMaKB Miles Hacker, editor. *Pharmacology Principles and Practice*: Elsevier; 2009.
- [53] Staicu ML, Muresan A, Tache S, Moldovan R. Effects of exogenous antioxidants on oxidative stress in pregnancy. *J Med Life.* 2011;4:163-7.
- [54] Da Costa LA, Badawi A, El-Sohemy A. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Ann Nutr Metab.* 2012;60 Suppl 3:27-36.
- [55] Barbosa KB, Bressan J, Zulet MA, Martinez Hernandez JA. [Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans]. *An Sist Sanit Navar.* 2008;31:259-80.
- [56] Covas MI, Gambert P, Fito M, de la Torre R. Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis.* 2010;208:297-304.
- [57] Fito M, de la Torre R, Farre-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43:375-81.
- [58] Martin-Pelaez S, Covas MI, Fito M, Kusar A, Pravst I. Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims. *Mol Nutr Food Res.* 2013.
- [59] Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002;106:3143-421.
- [60] Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009;120:1640-5.
- [61] Grundy S.M., Brewer H.B. Jr., Cleeman J.I., Smith S.C. Jr., C.; L, National Heart L, and Blood Institute;, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues

- related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:e13-e8.
- [62] Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Adams-Huet B, Grundy SM. Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes.* 1996;45:1684-93.
- [63] Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med.* 2008;14:741-51.
- [64] Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1212:E1-E19.
- [65] Hertz A. V., Thompson B. R., Wiczorak B. M., et al. Lipid metabolism in adipose tissue (Chapter 10). In: Vance D.E., V J.E., editors.: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* Elsevier.; 2008.
- [66] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 2003;112:1796-808.
- [67] Serrano Ríos M., Caro J. F., Carraro R., et al. GFJ, eds. *The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century. A Genetic and Molecular Approach.* 2005, Elsevier.
- [68] Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:629-36.
- [69] Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005;112:2735-52.
- [70] Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539-53.
- [71] Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks.: Geneva, World Health Organization, (http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_full.pdf). 2009.
- [72] World Health Statistics. A Snapshot of Global Health.: World Health Organization. (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/70889/1/WHO_IER_HSI_12.1_eng.pdf). 2012.
- [73] Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in

- European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes & metabolism*. 2002;28:364-76.
- [74] Hernández A, Riera C, Solá E OM, Martínez ML MC, et al. Prevalencia del síndrome metabólico entre pacientes con cardiopatía isquémica. *Med Clin (Barc)*. 2003;212:204-8.
- [75] Alvarez EE, Ribas L, L S. Prevalencia del síndrome metabólico en la población de la Comunidad Canaria. 2003. 2003;120:172-4.
- [76] Alegria E, Cordero A, Laclaustra M, Grima A, Leon M, Casasnovas JA, et al. [Prevalence of metabolic syndrome in the Spanish working population: MESYAS registry]. *Rev Esp Cardiol*. 2005;58:797-806.
- [77] Mohan V, Deepa M. The metabolic syndrome in developing countries. *Diabetes Voice*. 2006;51:15-7.
- [78] Marquez-Sandoval F, Macedo-Ojeda G, Viramontes-Horner D, Fernandez Ballart JD, Salas Salvado J, Vizmanos B. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr*. 2011;14:1702-13.
- [79] Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol*. 2006;21:185-93.
- [80] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000;106:473-81.
- [81] Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*. 2000;404:652-60.
- [82] Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. 2000;49:883-8.
- [83] Southam L, Soranzo N, Montgomery SB, Frayling TM, McCarthy MI, Barroso I, et al. Is the thrifty genotype hypothesis supported by evidence based on confirmed type 2 diabetes- and obesity-susceptibility variants? *Diabetologia*. 2009;52:1846-51.
- [84] Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001;60:5-20.
- [85] Vessby B. Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:15-9.
- [86] Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*. 2006;114:82-96.

- [87] Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci.* 2010;11:458-79.
- [88] Trichopoulou A, Lagiou P. Worldwide patterns of dietary lipids intake and health implications. *The American journal of clinical nutrition.* 1997;66:961S-4S.
- [89] Paletas K, Athanasiadou E, Sarigianni M, Paschos P, Kalogirou A, Hassapidou M, et al. The protective role of the Mediterranean diet on the prevalence of metabolic syndrome in a population of Greek obese subjects. *J Am Coll Nutr.* 2010;29:41-5.
- [90] Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, et al. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *The American journal of clinical nutrition.* 1999;69:1135-43.
- [91] Ortega A, Varela LM, Bermudez B, Lopez S, Abia R, Muriana FJ. Dietary fatty acids linking postprandial metabolic response and chronic diseases. *Food Funct.* 2012;3:22-7.
- [92] van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, Hoelen DW, Heijligenberg R, Bromhaar MG, et al. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition.* 2009;90:1656-64.
- [93] Siri-Tarino PW, Sun Q, Hu FB, Krauss RM. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition.* 2010;91:502-9.
- [94] Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Gomez P, Paz-Rojas E, Montilla P, et al. A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons. *Diabetologia.* 2001;44:2038-43.
- [95] Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia.* 2001;44:312-9.
- [96] Kwak JH, Paik JK, Kim HI, Kim OY, Shin DY, Kim HJ, et al. Dietary treatment with rice containing resistant starch improves markers of endothelial function with reduction of postprandial blood glucose and oxidative stress in patients with prediabetes or newly diagnosed type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2012;224:457-64.
- [97] Serrano Ríos M., Ordovás J. M., A. GFJ, eds. *Obesity.* 2011, Elsevier.

- [98] Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 2008;39:715-28.
- [99] Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets.* 2005;6:495-501.
- [100] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw.* 2006;17:4-12.
- [101] Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-Gonzalez A, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci.* 2011;12:3117-32.
- [102] Coppack SW. Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2001;60:349-56.
- [103] Dusi S, Donini M, Lissandrini D, Mazzi P, Bianca VD, Rossi F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: role of cytokines and transcriptional regulators involved. *Eur J Immunol.* 2001;31:929-38.
- [104] Cruz-Teno C, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Garcia-Rios A, Marin C, et al. Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56:854-65.
- [105] Meneses ME, Camargo A, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Cruz-Teno C, Jimenez-Gomez Y, et al. Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models. *Mol Nutr Food Res.* 2011;55:1759-70.
- [106] Camargo A, Ruano J, Fernandez JM, Parnell LD, Jimenez A, Santos-Gonzalez M, et al. Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. *BMC Genomics.* 2010;11:253.
- [107] Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation.* 2002;106:2530-2.
- [108] Badimón L, Martínez-González J. Endothelial Dysfunction. *Rev Esp Cardiol.* 2006;6 Suppl A:21-30.

- [109] Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R. Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis. *Curr Diabetes Rev.* 2005;1:59-63.
- [110] Badimón L, Vilahur G, Padró T. Lipoproteins, Platelets and Atherothrombosis. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:1161-78.
- [111] Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1367-73.
- [112] Colome C, Martinez-Gonzalez J, Vidal F, de Castellarnau C, Badimon L. Small oxidative changes in atherogenic LDL concentrations irreversibly regulate adhesiveness of human endothelial cells: effect of the lazaroid U74500A. *Atherosclerosis.* 2000;149:295-302.
- [113] Osterud B, Bjorklid E. Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev.* 2003;83:1069-112.
- [114] Serrano Ríos M., A. GFJ, eds. *Type 2 Diabetes Mellitus.* 2010, Elsevier.
- [115] Riccardi G, Giacco R, Rivellese AA. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr.* 2004;23:447-56.
- [116] Krieger-Brauer HI, Kather H. Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest.* 1992;89:1006-13.
- [117] Peairs AD, Rankin JW, Lee YW. Effects of acute ingestion of different fats on oxidative stress and inflammation in overweight and obese adults. *Nutr J.* 2011;10:122.
- [118] Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-9.
- [119] Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 2003;112:1821-30.
- [120] Sampson SR, Bucris E, Horovitz-Fried M, Parnas A, Kahana S, Abitbol G, et al. Insulin increases H₂O₂-induced pancreatic beta cell death. *Apoptosis.* 2010;15:1165-76.
- [121] Tang C, Han P, Oprescu AI, Lee SC, Gyulkhandanyan AV, Chan GN, et al. Evidence for a role of superoxide generation in glucose-induced beta-cell dysfunction in vivo. *Diabetes.* 2007;56:2722-31.
- [122] Eriksson JW. Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation - a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett.* 2007;581:3734-42.

- [123] Lairon D, Lopez-Miranda J, Williams C. Methodology for studying postprandial lipid metabolism. *European journal of clinical nutrition*. 2007;61:1145-61.
- [124] Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *The British journal of nutrition*. 2007;98:458-73.
- [125] Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *Jama*. 2007;298:299-308.
- [126] Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *Jama*. 2007;298:309-16.
- [127] Nordestgaard BG, Freiberg JJ. Clinical relevance of non-fasting and postprandial hypertriglyceridemia and remnant cholesterol. *Curr Vasc Pharmacol*. 2011;9:281-6.
- [128] Proctor SD, Mamo JC. Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall--evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins. *European journal of clinical investigation*. 1998;28:497-503.
- [129] Fuentes F, Lopez-Miranda J, Sanchez E, Sanchez F, Paez J, Paz-Rojas E, et al. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Annals of internal medicine*. 2001;134:1115-9.
- [130] Barona J, Jones JJ, Kopec RE, Comperatore M, Andersen C, Schwartz SJ, et al. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet increases plasma carotenoids and decreases LDL oxidation in women with metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23:609-15.
- [131] Fielding B. Tracing the fate of dietary fatty acids: metabolic studies of postprandial lipaemia in human subjects. *Proc Nutr Soc*. 2011;70:342-50.
- [132] Paglialunga S, Cianflone K. Regulation of postprandial lipemia: an update on current trends. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32:61-75.
- [133] de Mello VD, Kolehmanien M, Schwab U, Pulkkinen L, Uusitupa M. Gene expression of peripheral blood mononuclear cells as a tool in dietary intervention studies: What do we know so far? *Mol Nutr Food Res*. 2012;56:1160-72.
- [134] Fuchs D, Vafeiadou K, Hall WL, Daniel H, Williams CM, Schroot JH, et al. Proteomic biomarkers of peripheral blood mononuclear

- cells obtained from postmenopausal women undergoing an intervention with soy isoflavones. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86:1369-75.
- [135] Kallio P, Kolehmainen M, Laaksonen DE, Kekalainen J, Salopuro T, Sivenius K, et al. Dietary carbohydrate modification induces alterations in gene expression in abdominal subcutaneous adipose tissue in persons with the metabolic syndrome: the FUNGENUT Study. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;85:1417-27.
- [136] Perez-Herrera A, Rangel-Zuniga OA, Delgado-Lista J, Marin C, Perez-Martinez P, Tasset I, et al. The antioxidants in oils heated at frying temperature, whether natural or added, could protect against postprandial oxidative stress in obese people. *Food Chem*. 2013;138:2250-9.
- [137] Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuniga O, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, et al. Postprandial antioxidant gene expression is modified by Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women. *Age (Dordr)*. 2011.
- [138] Murdolo G, Smith U. The dysregulated adipose tissue: a connecting link between insulin resistance, type 2 diabetes mellitus and atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16 Suppl 1:S35-8.
- [139] van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB, de Groot LC, de Vries JH, Muller M, et al. Consumption of a high monounsaturated fat diet reduces oxidative phosphorylation gene expression in peripheral blood mononuclear cells of abdominally overweight men and women. *J Nutr*. 2012;142:1219-25.
- [140] Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, et al. Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *The British journal of nutrition*. 2012;108:500-8.
- [141] Patel C, Ghanim H, Ravishankar S, Sia CL, Viswanathan P, Mohanty P, et al. Prolonged reactive oxygen species generation and nuclear factor-kappaB activation after a high-fat, high-carbohydrate meal in the obese. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92:4476-9.
- [142] Cortes B, Nunez I, Cofan M, Gilabert R, Perez-Heras A, Casals E, et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil

- on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:1666-71.
- [143] Cardona F, Tunez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *European journal of clinical investigation.* 2008;38:510-5.
- [144] Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:2696-8.
- [145] Shaw DI, Tierney AC, McCarthy S, Upritchard J, Vermunt S, Gulseth HL, et al. LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *The British journal of nutrition.* 2009;101:750-9.
- [146] Harris WS, Pottala JV, Sands SA, Jones PG. Comparison of the effects of fish and fish-oil capsules on the n 3 fatty acid content of blood cells and plasma phospholipids. *The American journal of clinical nutrition.* 2007;86:1621-5.
- [147] Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974;20:470-5.
- [148] Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem.* 1973;19:476-82.
- [149] Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem.* 1982;28:1379-88.
- [150] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18:499-502.
- [151] Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Martin-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, et al. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res.* 2003;57:168-77.
- [152] Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis.* 2009;30 Suppl 1:S122-32.
- [153] Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature.* 2005;437:1032-7.

- [154] Peña-Orihuela P., Camargo A., Rangel-Zuñiga O. A., Perez-Martinez P., Cruz-Teno C., Delgado-Lista J., et al. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2013.
- [155] Bouloumie A, Curat CA, Sengenès C, Lolmede K, Miranville A, Busse R. Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2005;8:347-54.
- [156] de Mello VD, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, et al. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism*. 2008;57:192-9.
- [157] Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004;110:1564-71.
- [158] Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67:603-6.
- [159] Bories G, Caiazzo R, Derudas B, Copin C, Raverdy V, Pigeyre M, et al. Impaired alternative macrophage differentiation of peripheral blood mononuclear cells from obese subjects. *Diab Vasc Dis Res*. 2012;9:189-95.
- [160] Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annual review of genomics and human genetics*. 2004;5:71-118.
- [161] de Roos B, McArdle HJ. Proteomics as a tool for the modelling of biological processes and biomarker development in nutrition research. *The British journal of nutrition*. 2008;99 Suppl 3:S66-71.
- [162] Flock MR, Kris-Etherton PM. Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids: implications for cardiovascular disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2013;16:133-40.
- [163] Wycherley TP, Brinkworth GD, Keogh JB, Noakes M, Buckley JD, Clifton PM. Long-term effects of weight loss with a very low carbohydrate and low fat diet on vascular function in overweight and obese patients. *Journal of internal medicine*. 2010;267:452-61.
- [164] Arguin H, Dionne IJ, Senechal M, Bouchard DR, Carpentier AC, Ardilouze JL, et al. Short- and long-term effects of continuous versus intermittent restrictive diet approaches on body composition and the metabolic profile in overweight and obese postmenopausal women: a pilot study. *Menopause*. 2012;19:870-6.

- [165] Noakes M, Keogh JB, Foster PR, Clifton PM. Effect of an energy-restricted, high-protein, low-fat diet relative to a conventional high-carbohydrate, low-fat diet on weight loss, body composition, nutritional status, and markers of cardiovascular health in obese women. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81:1298-306.
- [166] Snel M, van Diepen JA, Stijnen T, Pijl H, Romijn JA, Meinders AE, et al. Immediate and long-term effects of addition of exercise to a 16-week very low calorie diet on low-grade inflammation in obese, insulin-dependent type 2 diabetic patients. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:3104-11.
- [167] Uusitupa M, Hermansen K, Savolainen MJ, Schwab U, Kolehmainen M, Brader L, et al. Effects of an isocaloric healthy Nordic diet on insulin sensitivity, lipid profile and inflammation markers in metabolic syndrome -- a randomized study (SYSDIET). *Journal of internal medicine*. 2013;274:52-66.
- [168] Brader L, Uusitupa M, Dragsted LO, Hermansen K. Effects of an isocaloric healthy Nordic diet on ambulatory blood pressure in metabolic syndrome: a randomized SYSDIET sub-study. *European journal of clinical nutrition*. 2013.
- [169] Camargo A, Rangel-Zuniga OA, Pena-Orihuela P, Marin C, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, et al. Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;24:318-24.
- [170] Rossmeislova L, Malisova L, Kracmerova J, Stich V. Adaptation of human adipose tissue to hypocaloric diet. *International journal of obesity (2005)*. 2013;37:640-50.
- [171] Siklova-Vitkova M, Klimcakova E, Polak J, Kovacova Z, Tencerova M, Rossmeislova L, et al. Adipose tissue secretion and expression of adipocyte-produced and stromavascular fraction-produced adipokines vary during multiple phases of weight-reducing dietary intervention in obese women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97:E1176-81.
- [172] Rizkalla SW, Prifti E, Cotillard A, Pelloux V, Rouault C, Allouche R, et al. Differential effects of macronutrient content in 2 energy-restricted diets on cardiovascular risk factors and adipose tissue cell size in moderately obese individuals: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;95:49-63.

- [173] Hopps E, Noto D, Caimi G, Aversa MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20:72-7.
- [174] de Koning EJ, Rabelink TJ. Endothelial function in the post-prandial state. *Atheroscler Suppl.* 2002;3:11-6.
- [175] Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism.* 2008;57:867-70.
- [176] Ursini F, Sevanian A. Postprandial oxidative stress. *Biol Chem.* 2002;383:599-605.
- [177] Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med.* 2000;29:416-24.
- [178] Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol.* 1995;6:357-65.
- [179] Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism.* 2008;57:1071-7.
- [180] Jiang F, Lim HK, Morris MJ, Prior L, Velkoska E, Wu X, et al. Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. *Redox Rep.* 2011;16:223-9.
- [181] Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32:595-603.
- [182] Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:42-59.
- [183] Blokhina O, Fagerstedt KV. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48:359-73.
- [184] Gago-Dominguez M, Jiang X, Castela JE. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Res.* 2007;9:201.
- [185] Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J.* 2000;346:1-8.
- [186] Coate KC, Huggins KW. Consumption of a high glycemic index diet increases abdominal adiposity but does not influence adipose tissue pro-oxidant and antioxidant gene expression in C57BL/6 mice. *Nutr Res.* 2010;30:141-50.
- [187] Long EK, Olson DM, Bernlohr DA. High-fat diet induces changes in adipose tissue trans-4-oxo-2-nonenal and trans-4-hydroxy-2-

- nonenal levels in a depot-specific manner. *Free Radic Biol Med.* 2013;63C:390-8.
- [188] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med.* 2004;36:1199-207.
- [189] Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:385-94.
- [190] Xu W, Hellerbrand C, Kohler UA, Bugnon P, Kan YW, Werner S, et al. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Invest.* 2008;88:1068-78.
- [191] Burczynski ME, Dorner AJ. Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics.* 2006;7:187-202.
- [192] Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, et al. Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol.* 2002;169:5-9.
- [193] Scandalios JG. Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol.* 2002;3:REVIEWS1019.
- [194] Roberts CK, Ng C, Hama S, Eliseo AJ, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention on inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL in overweight/obese men with cardiovascular risk factors. *J Appl Physiol.* 2006;101:1727-32.
- [195] Kodydkova J, Vavrova L, Zeman M, Jirak R, Macasek J, Stankova B, et al. Antioxidative enzymes and increased oxidative stress in depressive women. *Clin Biochem.* 2009;42:1368-74.
- [196] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011;16:123-40.
- [197] Du Z, Yang Y, Hu Y, Sun Y, Zhang S, Peng W, et al. A long-term high-fat diet increases oxidative stress, mitochondrial damage and apoptosis in the inner ear of D-galactose-induced aging rats. *Hear Res.* 2012;287:15-24.
- [198] Suzuki S, Kumatori A, Haagen IA, Fujii Y, Sadat MA, Jun HL, et al. PU.1 as an essential activator for the expression of gp91(phox) gene in human peripheral neutrophils, monocytes, and B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:6085-90.
- [199] Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002;91:281-91.

- [200] Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2002;5:561-8.
- [201] Jain A, Agrawal BK, Varma M, Jadhav AA. Antioxidant status and smoking habits: relationship with diet. *Singapore Med J*. 2009;50:624-7.
- [202] Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81:15-27.
- [203] Daoud SS, Munson PJ, Reinhold W, Young L, Prabhu VV, Yu Q, et al. Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study. *Cancer Res*. 2003;63:2782-93.
- [204] Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*. 2001;268:2764-72.
- [205] Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med*. 2005;11:1306-13.
- [206] Gutierrez-Mariscal FM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Camargo A, Delgado-Casado N, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age (Dordr)*. 2012;34:389-403.
- [207] McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care*. 2004;27:538-46.
- [208] Roberts W, Magwenzi S, Aburima A, Naseem KM. Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade. *Blood*. 2010;116:4297-306.
- [209] Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol*. 2009;103:4A-10A.
- [210] Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta Donati M. Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension*. 2001;38:1199-203.

- [211] Redman CM, Xia H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;936:480-95.
- [212] Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation.* 2005;112:3080-7.
- [213] Pebernard S, Perry JJ, Tainer JA, Boddy MN. Nse1 RING-like domain supports functions of the Smc5-Smc6 holocomplex in genome stability. *Mol Biol Cell.* 2008;19:4099-109.
- [214] Ahn K, Erlander M, Leturcq D, Peterson PA, Fruh K, Yang Y. In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem.* 1996;271:18237-42.
- [215] Li J, Powell SR, Wang X. Enhancement of proteasome function by PA28 α ; overexpression protects against oxidative stress. *Faseb J.* 2011;25:883-93.
- [216] Murakumo Y, Ogura Y, Ishii H, Numata S, Ichihara M, Croce CM, et al. Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J Biol Chem.* 2001;276:35644-51.
- [217] Jessop CE, Bulleid NJ. Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem.* 2004;279:55341-7.
- [218] Codoner-Franch P., Valls-Belles V., Arilla-Codoner A., E. A-I. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res.* 2011;158:369-84.
- [219] Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res.* 2007;48:1905-14.
- [220] Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010;107:1071-82.
- [221] Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:193-230.
- [222] Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *The American journal of clinical nutrition.* 2006;83:1499S-504S.
- [223] Hamel FG, Bennett RG, Upward JL, Duckworth WC. Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology.* 2001;142:2702-6.

- [224] FitzPatrick DR, Germain-Lee E, Valle D. Isolation and characterization of rat and human cDNAs encoding a novel putative peroxisomal enoyl-CoA hydratase. *Genomics*. 1995;27:457-66.
- [225] Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol*. 2005;6:226.
- [226] Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*. 2010;68:280-9.

X. ANEXOS

Publicaciones derivadas de la Tesis

Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome

Camargo A, Rangel-Zúñiga OA, **Peña-Orihuela P**, Marín C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Gutiérrez-Mariscal FM, Malagón MM, Roche HM, Tinahones FJ, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J.

J Nutr Biochem. 2013 Jan;24(1):318-24. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.06.014. Epub 2012 Sep 5

Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients

Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zúñiga OA, Pérez-Martínez P, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano ME, Paniagua JA, Tinahones FJ, Malagón MM, Roche HM, Pérez-Jiménez F, López-Miranda J.

J Nutr Biochem. 2013 Oct;24(10):1717-23. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.02.012. Epub 2013 May 3



Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome ☆☆☆★

Antonio Camargo^{a,1}, Oriol Alberto Rangel-Zúñiga^{a,1}, Patricia Peña-Orihuela^a, Carmen Marín^a, Pablo Pérez-Martínez^a, Javier Delgado-Lista^a, Francisco Miguel Gutierrez-Mariscal^a, María M. Malagón^b, Helen M. Roche^c, Francisco José Tinahones^d, José Lopez-Miranda^{a,*}

^aLipids and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Reina Sofía University Hospital/University of Córdoba and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III. 14004, Córdoba, Spain

^bDepartment of Cell Biology, Physiology and Immunology, IMIBIC, University of Córdoba and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III. 14014, Córdoba, Spain

^cNutrigenomics Research Group, UCD School of Public Health and Population Science, UCD Conway Institute, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland

^dHospital Virgen de la Victoria, Málaga, Spain, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Málaga, Spain

Received 18 December 2011; received in revised form 10 May 2012; accepted 15 June 2012

Abstract

Metabolic syndrome is a multicomponent disorder whose etiology is the result of a complex interaction between genetic, metabolic and environmental factors including dietary habits. Our aim was to identify proteome–diet interactions during the postprandial state after the acute intake of four meals with different qualities of fat in the proteome of peripheral blood mononuclear cells. A randomized controlled trial conducted within the LIPGENE study assigned 39 metabolic syndrome patients to one of four meals: a high-saturated-fatty-acid (HSFA) meal, a high-monounsaturated-fatty-acid (HMUFA) meal and two high-polyunsaturated-fatty-acid (from walnut) (HPUFA) meals supplemented with n-3 PUFA or placebo. We analyzed the postprandial changes in the whole proteome of both nuclear and cytoplasmic fractions of peripheral blood mononuclear cells by two-dimensional proteomics. Twenty-three proteins were differentially expressed. HSFA intake caused the postprandial increase of proteins responding to oxidative stress (HSPA1A, PDIA3 and PSME1) and DNA damage (SMC6), whereas HMUFA intake led to the up-regulation of HSPA1A and PDIA3. HPUFA meal supplementation with n-3 PUFA produced peroxisomal beta-oxidation inhibition by down-regulation of ECH1, a process related to insulin signaling improvement. In conclusion, HSFA meal intake causes deleterious postprandial changes in the proteome in terms of DNA damage and procoagulant state, which reflect a higher postprandial oxidative stress after HSFA meal intake as compared to intake of HMUFA and HPUFA meals. Moreover, the addition of long-chain n-3 PUFA to an HPUFA meal may improve insulin signaling and exerts an anti-inflammatory effect when compared to an HPUFA meal.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Proteomic; Diet; Oxidative stress; Atherothrombosis; Metabolic syndrome

☆ Source of funding: This research has been funded partly by research grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2004-07907, AGL2006-01979 and AGL2009-12270 to J.L.-M.; SAF07-62005 to F.P.-J.; FIS PI10/01041 to P.P.-M.; PI10/02412 to F.P.-J.); Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Proyectos de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425 to J.L.-M., CTS0515 and AGR922 to F.P.-J., CTS-03039 to M.M.M.); Consejería de Salud, Junta de Andalucía (06/128, 07/43 and PI0193/09 to J.L.-M.; 06/129 to F.P.-J.; 06/127 to C.M.-H., 0118/08 to F.P.-J., PI-0252/09 to J.D.-L., PI-0058/10 to P.P.-M.); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); Science Foundation Ireland PI Programme (06/IM.1/B105) to H.M.R.; EU Sixth Framework Food Safety & Quality Programme (Contract Number FOOD-2003-CT-505944).

☆☆ Conflict of interests: None of the authors has any conflict of interests that could affect the performance of the work or the interpretation of the data.

* Clinical Trial Registration number: Study identifier at ClinicalTrials.gov was NCT00429195.

† Corresponding author. Reina Sofía University Hospital, Lipids and Atherosclerosis Research Unit, 14004 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957 012882; fax: +34 957 204763.

E-mail address: jlopezmir@uco.es (J. Lopez-Miranda).

¹ The first two authors (A.C. and O.A.R.-Z.) contributed equally to this study.

² The last two authors (F.P.-J. and J.L.-M.) contributed equally to this study.

1. Introduction

The metabolic syndrome (MetS) is a multicomponent disorder associated with an increased risk of type 2 diabetes and cardiovascular diseases [1]. The etiology of MetS is the result of a complex interaction between genetic, metabolic and environmental factors, including dietary habits and, probably, the quality of dietary fat [2].

The postprandial state causes an important stress on the homeostasis due to the increase in lipid-derived proinflammatory molecules, oxidative stress and a transient increase in proinflammatory molecules released by human white blood cells and endothelial cells [3]. Likewise, the changes in postprandial metabolism occurring every time we eat a meal and alterations in this state play an important role in the development of cardiovascular disease and associated pathologies [4].

An inflammatory response is a feature of the complex proatherogenic phenotype occurring during the postprandial state [5], which is especially important in patients with MetS since they are

characterized as exhibiting a state of low-grade inflammation. MetS patients are particularly vulnerable since they exhibit an exacerbated hypertriglyceridemia response [6] and abnormalities in the postprandial metabolism of lipoproteins [7]. In addition, postprandial hypertriglyceridemia has been related to the proinflammatory state [3].

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are a subset of white blood cells consisting of lymphocytes and monocytes/macrophages. They are relatively easily accessible in humans by isolation from a blood sample, and they can be used to assess biological responses and are a potential source to discover new biomarkers of response to environmental cues, including nutrition [8–10]. Despite the increasing number of studies that utilize PBMCs for diagnosis or disease-associated purposes [8], most of them analyze gene expression, and, while relevant, they have the intrinsic limitation of not focusing on the final products that perform the biological function. However, in the area of nutritional research, these studies have shown, for example, that diet modulates the gene expression of inflammatory genes [11,12], metabolism-related genes [13] and oxidative stress [14].

Proteomics is a central platform in nutrigenomics that describes how our genome expresses itself as a response to diet [15]. However, while proteomics represents a novel, promising tool to uncover the mechanisms of action of nutrients as well as to identify potential biomarkers of health or disease, the actual use of this technique in dietary intervention trials is still rather limited [16]. Fuchs et al. [17] have shown the PBMC proteome response to a dietary intervention with isoflavone-enriched soy extract in postmenopausal women in the fasting state. However, no studies to date have addressed the postprandial modulation of PBMC proteome by diet. Additionally, an observational study has shown that the plasma proteomic profile differs between young people of diverse ethnocultural groups with different dietary habits [18].

In this study, we present data on changes in the proteome of PBMCs isolated from MetS patients in response to the acute intake of four diets with different quantities and qualities of fat. The nutritional regulation of the postprandial proteome was analyzed to identify fast-response proteins to the quality of dietary fat and to pave the way for future research into the molecular mechanism underlying gene–nutrient interaction. To the best of our knowledge, our study is the first one focusing on postprandial proteome modulation by diet.

2. Methods and materials

2.1. Participants and recruitment

This study was conducted within the framework of the LIPGENE study (Diet, genomics and metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. All participants gave written informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination and clinical chemistry analysis before enrolment. This study was carried out at the Lipid and Atherosclerosis Unit of the Reina Sofia University Hospital from February 2005 to April 2006. The experimental protocol was approved by the local ethic committee according to the Helsinki Declaration.

From this LIPGENE cohort, we analyzed the PBMC proteome from 24 patients, 6 patients per meal (3 women and 3 men), by two-dimensional (2-D) proteomic analysis. After that, we used the PBMC proteins from the whole subgroup, which comprised 39 patients (Supplemental Table 1) [8 patients ingested a high-saturated-fatty-acid (HSFA) meal, 9 patients ingested a high-monounsaturated-fatty-acid (HMUFA) meal, 12 patients ingested a high-polyunsaturated-fatty-acid (HPUFA) meal, and 10 patients ingested an HPUFA n-3 meal] to validate proteomic data by Western blot.

2.2. Design, randomization and intervention

MetS patients were randomly stratified to one of four test meal intakes. MetS was defined by published criteria [19], which conformed to the LIPGENE inclusion and exclusion criteria [20]. Randomization was completed centrally according to age, gender and fasting plasma glucose concentration using the Minimization Program for Allocating Patients to Clinical Trials (Department of Clinical Epidemiology, London

Hospital Medical College, UK) randomization program. The meals differed in fat quality while remaining isoenergetic (Supplemental Table 2).

Briefly, HSFA meal provided 38% E from SFA, 21% from MUFA and 6% from PUFA; HMUFA meal provided 12% E from SFA, 43% from MUFA and 10% from PUFA; and HPUFA meals provided 21% E from SFA, 28% from MUFA and 16% from PUFA. HPUFA with placebo, meal included 1.2 g supplement of control high-oleic sunflower seed oil capsules; HPUFA with long chain (LC) n-3 PUFA, meal included 1.24 g/d of LC n-3 PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA).

Patients arrived at the clinical center at 08:00 h following a 12-h fast, refrained from smoking during the fasting period and abstained from alcohol intake during the preceding 7 days. In the laboratory and after cannulation, a fasting blood sample was taken before the test meal, which then was ingested within 20 min under supervision.

Test meals provided an equal amount of fat (0.7 g/kg body weight), E content (40.2 kJ/kg body weight), cholesterol (5 mg/kg of body weight), fiber and vitamin A [62.9 mmol vitamin A (retinol)/m² body surface area]. The test meal provided 65% of E as fat, 10% as protein and 25% as carbohydrates. During the postprandial assessment, participants rested and did not consume any other food for 9 h but were allowed to drink water.

The natural foods used in the meals were as follows: HSFA, 38% E from SFA, based on butter, whole milk, white bread and eggs intake; HMUFA, 43% E from MUFA, based on olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs and tomatoes intake; HPUFA (21% SFA, 28% MUFA), based on butter, olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs and walnuts.

2.3. Blood sample collection

Venous blood samples were obtained in the fasting state, after a 12-h fast, before and at 4 h after the ingestion of the breakfast. Samples from the fasting and postprandial states were collected in tubes containing 1 g EDTA/L and were stored in containers with iced water in the dark. Special care was taken to avoid exposure to air, light and ambient temperature. Plasma was separated from whole blood by low-speed centrifugation at 1500g for 15 min at 4°C within 1 h of extraction.

2.4. Isolation of peripheral blood mononuclear cells

PBMCs were isolated within 2 h after blood draw from 30-ml EDTA anticoagulated blood samples. Buffy coats were diluted 1:2 in phosphate-buffered saline (PBS), and cells were separated in 5 ml Ficoll gradient (lymphocyte isolation solution, Rafer) by centrifugation at 2000g for 30 min. PBMCs were collected and washed twice with cold PBS. PBMCs were stored in lysis buffer A (10 mM HEPES; 10 mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 0.5 mM PMSF; 1 mM DTT; 10 µg/ml CLAP; 1% NP-40) at –80°C prior to protein extraction.

2.5. Protein extraction from peripheral blood mononuclear cells

Protein extracts from nuclear and cytoplasmic fractions from PBMCs were obtained following the procedure previously described by Hernandez-Presa et al. [21]. Briefly, samples were thawed for 15 min in ice, and then they were vortexed for 20 min and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4°C, and the cytoplasmic fraction was collected on the supernatant. Pellet was dissolved in 100-µl lysis buffer C (20 mM HEPES; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF; 1 mM DTT; 10 µg/ml CLAP) and incubated for 20 min in ice. Samples were vortexed every 5 min for 30 s during the incubation period. After centrifugation at 10,000g for 5 min at 4°C, the nuclear fraction was collected on the supernatant. Protein samples were quantified by Bradford method using Dye Reagent Protein (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.6. 2-D gel electrophoresis

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) was performed as described by Görg et al. [22]. Protein fractions were cleaned using the Ready Prep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. A total of 200 µg of protein were diluted in 200 µl of rehydration buffer (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% Bio-Lyte 3/10 ampholyte and 0.002% bromophenol blue). Immobilized pH gradient strips (11 cm, pH 3–10) were rehydrated overnight in a Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories) following a stepwise voltage: slow ramp, 250 V (15 min), 8000 V (5 h, linear gradient), 8000 V (26,000 Vh), total Vh 40,000. Strips were equilibrated in equilibration buffer I [6 M urea, 0.375 M Tris–HCl, pH 8.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20% glycerol, 2% (w/v) DTT] for 10 min and then for another 20 min in equilibration buffer II [6 M urea, 0.375 M Tris–HCl, pH 8.8, 2% glycerol, 2.5% (w/v) iodoacetamide]. Thereafter, proteins were separated in 12% Bis-Tris Criterion XT Precast Gels (Bio-Rad Laboratories) using a Criterion Dodeca Cell system (Bio-Rad Laboratories) in MOPS buffer 1× at 180 V.

Gel staining was performed overnight in darkness with SYPRO Ruby after protein fixing by using 40% methanol and 10% acetic acid for 2 h. Gels were washed in 40% methanol and 10% acetic acid twice for 1 h and once in distilled water for 30 min before imaging acquisition.

2.7. Imaging acquisition and spots detection

After staining, gels were visualized with UV light by using ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories). Images were acquired using the software Quantity One 16.0 (Bio-Rad Laboratories). The spots were detected by the PDQuest software 8.0.1 (Bio-Rad Laboratories). Detection parameters set: spot detection sensitivity=6.0; size scale=5; mini peak=2000. Speckle filter enable and sensitivity=70.0. Image smoothing enabled, filter median and smooth kernel size 3×3. Background subtraction enabled, method floating ball and background radius=67. Streak removal enabled vertical and horizontal streak radius=111. The normalization method chosen was the total quantity in valid spots.

2.8. MALDI-TOF MS analysis

Spots were excised automatically in a ProPic station (Genomic Solutions, Huntingdon, UK) and subjected to MS analysis. For matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) analysis, gel specimens were unstained twice (30 min, 37°C) with 200 mM ammonium bicarbonate/40% acetonitrile. Gel pieces dehydrated for 5 min with pure acetonitrile and dried out over 4 h were automatically digested with trypsin according to the standard protocols in a ProGest station (Genomic Solutions). MS and MS/MS analyses of peptides of each sample were performed in a 4700 Proteomics Station (Applied Biosystems, CA, USA). Mass spectrometry was performed at the Proteomics Facility (SCAI) of the University of Cordoba, which is Node 6 of the ProteoRed Consortium financed by Genoma España and belongs to the Andalusian Platform for Genomics, Proteomics and Bioinformatics.

2.9. Pathway analysis

In order to investigate functional relationships in the set of differentially expressed proteins, we used the Ingenuity Pathway Analysis Software (Ingenuity Systems, Redwood City, CA USA) [23] which employs a predefined knowledge base containing over 10,000 curated human genes.

Network analysis yielded 15 different subnetworks. From the 10 proteins found differentially expressed after the intake of HSFA, 2 proteins (PSME1, ZFP2) were not eligible for network analysis, which yielded 6 subnetworks. For HMUFA meal, of the six proteins, two proteins (CCDC150, Serpin B1) were not eligible for network analysis which yielded four subnetworks. For HPUFA meal, of the five proteins, two proteins (HSPA6, MYL12A) were not eligible and yielded three subnetworks. For HPUFA n-3 meal, of the five proteins, three proteins (ALDH2, CAPZB, and ECH1) were not eligible and yielded two subnetworks. After that, we built two networks merging those subnetworks sharing one or more proteins.

2.10. Western blot validation experiments

Commercial antibodies used for Western blot validation experiments were provided by Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Forty micrograms of protein from each individual subject (8 patients who ingested an HSFA meal, 9 patients who ingested an HMUFA, 12 patients who ingested an HPUFA meal and 10 patients who ingested an HPUFA n-3 meal) was loaded in gels for SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were blocked with 1× tris-buffered saline and tween 20 (TBS-T) containing 2% of bovine serum albumin, followed by incubation with the corresponding primary antibody diluted in TBS-T at the concentrations indicated by the manufacturer. After washing, membranes were incubated with the appropriate IgG–HRP-conjugated secondary antibody. Membranes were incubated for 2 min with SuperSignal West Pico ECL Substrate (Thermo Scientific) for protein detection. Images were acquired on a Molecular Imager ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories), and band density analysis was performed with QuantityOne Software V (Bio-Rad Laboratories). Band intensity signal was normalized by total protein in membranes, which was measured by Ponceau S stain method.

2.11. Statistical analysis

2-D gel analysis was performed by PDQuest software (Bio-Rad Laboratories), version 8.0. Manual corrections were also performed to validate the matches automatically generated by the software. Spot volume values were normalized in each gel by dividing the raw quantity of each spot by the total volume of all the spots included in the same gel. Other normalizations provided by the PDQuest software were also performed with similar results. Variations of all the identified spots were finally confirmed and quantified by density measurements using ImageJ 1.40g software. Statistical analysis used SSPS statistical software, version 15.0 for WINDOWS (SSPS, Chicago, IL, USA). Normal distribution of variables to characterize differences in the expression of proteins under study was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test followed by a Student's *t* test for independent samples. Differences were considered significant at *P* < .05. All data are expressed as mean ± S.E.M.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

No significant differences were observed in the baseline characteristics of the 39 subjects with MetS participating in the dietary intervention (Supplemental Table 1).

3.2. Proteomic analysis

We performed 2-D gel electrophoresis of nuclear and cytoplasmic fractions from PBMCs separately. On average, >400 different protein spots from nuclear and cytoplasmic fractions were resolved by 2-D PAGE.

Comparative proteomic analysis of the PBMC proteome from patients before (fasting state) and after the intake of the test meal (postprandial state) (Table 1) revealed that the acute intake of HSFA meal caused the postprandial up-regulation of five proteins (ZFP2, SMC6, HLA-C, THBS1 and PSME1) and the postprandial down-regulation of five proteins (REV3-like, PDIA3, HSPA1A, FGB and PLEC). HMUFA meal intake caused the postprandial up-regulation of three proteins (HSPA1A, HLA-A and PDIA3) and the postprandial down-regulation of three proteins (CCDC150, CEP290 and SERPIN B1). HPUFA meal intake caused the postprandial up-regulation of four proteins (FLNA, GRIN1, HLA-C and HSPA6) and the postprandial down-regulation of one protein (MRLC3). HPUFA n-3 meal intake caused the postprandial up-regulation of three proteins (VIM, PPIA, ALDH2) and the postprandial down-regulation of two proteins (CAPZB, ECH1).

The identified proteins could be grouped into the following categories: (a) molecular chaperones and stress response (HSPA1A, HSPA6, PDIA3); (b) cell-to-cell interaction (FGB, THBS1); (c) DNA maintenance (SMC6, REV3-like, CEP290); (d) structural filaments or components of the cytoskeleton (PLEC, FLNA, VIM, MRLC3, CAPZB); (e) enzymes and receptor (HLA-A, HLA-C, SERPIN B1, GRIN1, PPIA, ALDH2, ECH1); (f) others (ZFP2, CCDC150, PSME1) (Fig. 1).

3.3. 2-D proteomic result validation by Western blot

To confirm proteomic analysis results using an independent technique, we analyzed eight differentially expressed proteins (fold change ranging from 2.53 to 0.43) by Western blot, which corresponded to the following categories: three chaperones, two enzymes, two cell structural components and one cell-to-cell interaction. Quantification of the immunoreactive bands revealed the same diet-induced changes as those observed by 2-D proteomics (Supplemental Figure 1).

3.4. Pathway analysis

Ingenuity Pathway Analysis showed that the top function associated with proteins differentially expressed after HSFA meal intake was inflammatory response (HLA-C, THBS1 and PSME1, up-regulated; PLEC, FGB and HSPA1A, down-regulated). Likewise, different genetic disorders were the top functions associated to proteins differentially expressed after acute intake of HMUFA, HPUFA and HPUFA n-3 meals.

In terms of molecular function, cell-to-cell signaling and interaction (HSFA five proteins, HMUFA two proteins and HPUFA zero protein), together with DNA replication, recombination and repair (HSFA two proteins, HMUFA two proteins, and HPUFA zero protein), showed higher representation after the intake of HSFA and HMUFA than after the intake of HPUFA meal, but not after the intake of HPUFA n-3 (cell-to-cell signaling and interaction, two proteins; DNA replication, recombination and repair, two proteins). On the other

Table 1
Quantity and quality of dietary fat effect in the postprandial changes on proteome

	FC	P value	MW	pI	Accession no.	Score	CI %	Pep count	Ion CI %
Postprandial changes of proteins induced after acute HSFA meal consumption									
Nuclear fraction									
1. ZFP2: zinc finger protein 2 homolog	3.27	.036	54359.7	8.91	gi 47271457			8	
2. SMC6: structural maintenance of chromosomes 6	2.35	.006	35828	7.59	gi:122070455	99.919		11	
3. REV3-like: catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast), isoform CRA	0.44	.031	37.5	9.6	gi:119568677	99.093			
Cytoplasm fraction									
4. HLA-C: HLA class I histocompatibility antigen. Cw-1 alpha chain	3.90	.030	24053.8	6.75	gi 599786	30.637		6	
5. THBS1: thrombospondin	2.53	.043	42215.2	6.6	gi 553801	99.99		5	99.997
6. PSME1: proteasome activator subunit 1 isoform 1	1.90	.031	28754.9	6.28	gi 30581141	99.982		28	81.644
7. PDIA3: protein disulfide-isomerase	0.58	.043	52884.4	4.76	gi:2507460	100		8	100
8. HSPA1A: heat shock 70-kDa protein 1A	0.43	.047	70280.1	5.48	gi 5123454	100		16	100
9. FGB: fibrinogen beta chain, isoform CRA_f	0.33	.026	44723.6	8.84	gi 119625340	100		9	99.834
10. PLEC: plectin-1	0.32	.049	518510.8	5.60	gi:209572726	99.322		33	
Postprandial changes of proteins induced after acute HMUFA meal consumption									
Nuclear fraction									
11. CCDC150 protein	0.25	.032	44114.5	9.47	gi 38541637	83.74		9	
12. CEP290: centrosomal protein of 290 kDa	UE	.018	268104.8	5.75	gi:116241294	99.941		26	
Cytoplasm fraction									
8. HSPA1A: heat shock 70-kDa protein 1A	2.20	.045	70110.0	5.42	gi 386785	100		16	100
13. HLA-A: MHC class I antigen	1.81	.042	21139.1	5.77	gi 89152359	44.903		6	
7. PDIA3: protein disulfide isomerase	1.40	.043	54453.6	6.78	gi 119597640	100		15	99.95
14. SERPIN B1: serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	0.36	.036	42889.8	6.22	gi:266344	99.999		9	99.512
Postprandial changes of proteins induced after acute HPUFA meal consumption									
Cytoplasm fraction									
15. FLNA: filamin alpha (actin binding protein 280), isoform CRA_e	7.94	.0434	266548.5	5.79	gi 119593154	100		15	100
16. GRIN1: glutamate receptor subunit zeta-1	2.73	.0469	105373	8.5	gi:548377	99.274		14	
4. HLA-C: HLA class I histocompatibility antigen. Cw-17 alpha chain	1.38	.029	19045.2	6.95	gi:34395506	39.587		6	
17. HSPA6: heat shock 70-kDa protein 6, variant	1.35	.046	71416.3	5.81	gi 62898285	99.874		5	99.992
18. MRLC3: myosin regulatory light chain 12A.	0.49	.0397	19456.2	4.74	gi 127169	99.992		5	99.916
Postprandial changes of proteins induced after acute HPUFA n-3 meal consumption									
Nuclear fraction									
19. VIM: vimentin	1.94	.031	53604.1	5.09	gi 47115317	53.109		6	73.579
20. PPIA: cyclophilin A	1.84	.047	18039.9	8.37	gi 75766275	100		5	100
Cytoplasm fraction									
21. ALDH2: aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	1.78	.042	56932.9	6.63	gi 48146099	92.902		2	99.944
22. CAPZB: capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	0.69	.045	29561.9	6.45	gi 55665440	100		7	100
23. ECH1: enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	UE	.014	36077.5	8.47	gi 16924265	100		6	100

FC, fold change (proteins level at postprandial/proteins level at fasting). P value, t test P value; MW, theoretical molecular weight; pI, theoretical isoelectric point. Pep count, peptide count; CI, confidence index; UE, underexpressed, not detected at postprandial.

hand, cellular assembly and organization (HSFA one protein, HMUFA one protein, HPUFA two proteins and HPUFA n-3 three proteins) as well as cell morphology (HSFA zero protein, HMUFA zero protein, HPUFA two proteins and HPUFA n-3 two proteins) showed higher representation after the intake of HPUFA meals than after the intake of HSFA and HMUFA meals.

In order to investigate whether the differentially expressed proteins after the intake of different quality of fat interact with each other, we studied the relationships between the differentially expressed proteins at the postprandial state after the acute intake of four test meals by using the Ingenuity Pathway Analysis Software. Thus, the network analysis yielded 15 different subnetworks, which could be grouped into two networks by merging those subnetworks sharing one or more proteins. The top functions associated to network 1 were cellular growth, proliferation, movement and development. For network 2, they were inflammatory response, cell death, cellular growth and proliferation. Finally, we removed those proteins not connecting the identified proteins directly (Fig. 2).

4. Discussion

Herein, we report for the first time the postprandial proteomes of PBMC in response to the quality of fat in diet. Moreover, this is the first study dealing with postprandial response to different dietary models in MetS patients, whose etiology is related to dietary habits [2].

Our proteomic approach yielded 23 differentially expressed proteins at the postprandial state after the acute intake of four test meals with different qualities of fat. HSFA and HMUFA meals caused postprandial proteome changes in processes such as cell signaling and interaction and DNA repair. In contrast, an HPUFA postprandial challenge led to postprandial changes in proteins involved in processes such as cellular assembly and organization, or cell morphology. Additionally, the supplementation of an HPUFA meal with LC n-3 PUFA caused proteome changes related to cell signaling and interaction, DNA repair, cellular assembly and organization, and cell morphology.

The current study showed that despite the heterogeneity of the fatty meals administered, in terms of fat quality, most of the postprandial short-term response proteins could be grouped in an interconnected network, associated to cellular functions such as cellular growth and proliferation (network 1), which may be important for the development of atherosclerosis since it has been demonstrated that the progression of this disease is associated with the clonal expansion of T cells [24].

However, none of the dietary models tested showed a proteome profile favoring or repressing the growth and proliferation of PBMC. The fact that each meal intake caused the up-regulation or down-regulation of only one or two proteins in the network suggests that dietary fat may affect cellular growth and proliferation processes at the postprandial state but not in the fatty acid proportions or doses administered in our study.

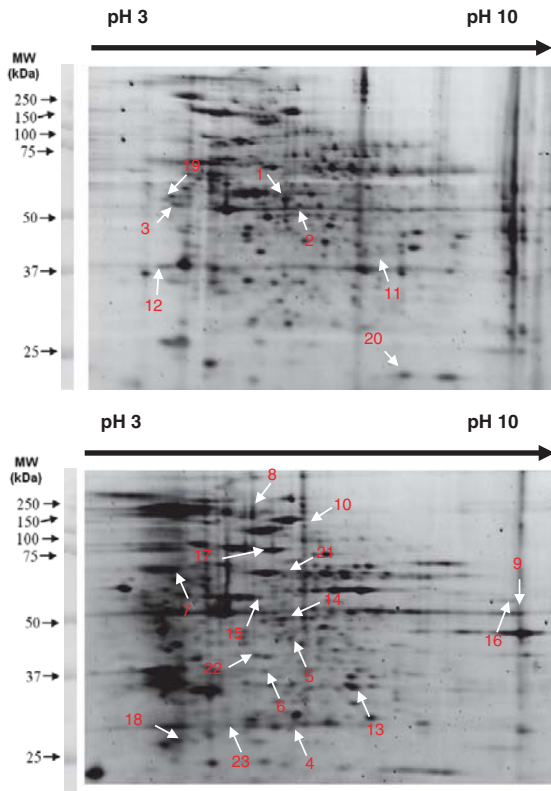


Fig. 1. 2-D PAGE of PBMC whole proteome, nuclear fraction [1] and cytoplasmic fraction [2]. Proteins were separated on a 2-DE gel using 18-cm pH 3–10 strips in the first dimension and 12% SDS-PAGE gels in the second dimension, as described in Material and Methods. Differentially expressed proteins are indicated with arrows. The numbers corresponding to the spot numbers are listed in Table 1.

Notably, several of the differentially expressed proteins or protein isoforms found in our study [heat shock protein (HSPA1A, HSPA6), myosin regulatory chain, proteasome activator subunit, filamin alpha, fibrinogen beta chain and thrombospondin] have been shown to be modulated by soy isoflavones in the fasting state after a long-term intervention [17]. This study showed the chronic effect of a dietary intervention with isoflavone-enriched soy extract in postmenopausal women. Together, these and our findings support the idea that these proteins are sensitive to modulation by nutritional intervention.

The postprandial state involves an increase in the production of reactive oxygen species, which can cause damage to biological macromolecules such as proteins and DNA [25,26]. HSPA1A is a member of the heat shock protein family [27], whose gene expression is repressed by p53 when activated by DNA damage [28]. Previous studies from our laboratory have shown that an HMUFA meal following a long-term consumption of a MUFA-rich diet lowered several postprandial oxidative stress biomarkers as compared to that evoked by an HSFA meal after long-term consumption of an SFA-rich diet [29]. Taking into account that p53 has antioxidant functions protecting the genome from oxidation produced by oxidative stress [30,31], our results suggest that p53 activation by postprandial oxidative stress after an HSFA meal intake – probably by DNA damage, as shown previously in an elderly population [32] – could be responsible for HSPA1A down-regulation and, for the opposite effect, up-regulation after an HMUFA meal, which may be accounted for by a lack of p53 postprandial activation.

Interestingly, THBS-1, an adhesive glycoprotein whose gene expression is increased by p53 [33], was up-regulated after the HSFA meal intake and remained unchanged after the intake of the other three meals. This glycoprotein has been shown to promote platelet aggregation [34], a physiologic process of defense against uncontrolled hemorrhage, although it also occludes blood vessels with thrombi, thus leading to cardiovascular events, including unstable angina and myocardial infarction [35]. In line with this, we also observed a postprandial decrease in fibrinogen beta chain (FGB), whose synthesis is the limiting step in the production of mature fibrinogen [36]. Fibrinogen is cleaved by thrombin to form insoluble fibrin which is the most abundant component of blood clots [37]. Thus, FGB postprandial decrease after an HSFA meal intake suggests an increased fibrin production by cleavage and release, which would reduce the substrate amount, FGB.

Both THBS1 increase and FGB decrease suggest a procoagulant state after an HSFA meal when compared to the other meals investigated herein. In this regard, an imbalance between procoagulant and profibrinolytic activity has been linked to coronary heart disease [38]. This is especially important in MetS patients as they exhibit a prothrombotic state in the fasting state [1], which seems to be increased in the postprandial state after an SFA-rich meal intake.

The notion that several of the postprandial proteome changes observed are due to increased postprandial oxidative stress after an SFA meal intake is also supported by the observation that SMC6, a protein involved in the structural maintenance of chromosomes [39], and PSME1, a proteasome activator [40] that has been recently related to oxidative stress protection [41], were up-regulated in patients following this diet. Moreover, REV3, a protein involved in translesion DNA synthesis [42], was down-regulated after an HSFA meal intake. Remarkably, protein levels of SMC6, PSME1 and REV3 remained unchanged after the intake of the other three meals.

On the other hand, PDIA3 (also called ERp57) belongs to a family of oxidoreductases, including PDI, Erp72, P5 and PDIR, which are involved in the formation of native disulfide bonds, and under conditions of oxidative stress, the oxidoreductases are quickly reduced and remain active. Interestingly, PDIA3 has been shown to be reduced directly by glutathione [43], a molecule that increases at the postprandial state after an HMUFA meal following long-term consumption of an HMUFA-rich diet, and decreases after an HSFA meal intake following the consumption of a long-term SFA-rich diet in our population [29]. In all, these findings indicate that HSFA diet would decrease PDIA3 levels in the short term and repress the activity of the enzyme when the component responsible for its reduction (glutathione) is scarce (i.e., after long-term consumption of an HSFA diet). In contrast, it was up-regulated after HMUFA intake, as glutathione levels may be higher than after an HSFA meal intake, as has been shown by Perez-Martinez et al. [29].

Taken together, these findings suggest that the proteome, at least partially, seems to be responding to the oxidative status at the postprandial state after the intake of the different meals, directly and through DNA damage. In addition to the relationship with oxidative stress, the top function associated with the proteins differentially expressed after an HSFA meal intake was inflammatory response, which supports the link between oxidative stress and inflammation [44,45]. Notably, although both HSPA1A and PDIA3 belong to protein families associated with endoplasmic reticulum stress (HSP70 and PDI), these isoforms seem to respond to oxidative stress rather than to ER stress, which is also related to oxidative stress [46], and this supports the notion that unfolded protein response fulfils a wide spectrum of physiological roles [47]. Thus, in conditions of high postprandial oxidative stress (i.e., after intake of an HSFA meal), it seem to have a lack of unfolding protein response in MetS patients, which could also contribute to impair the postprandial state of these patients.

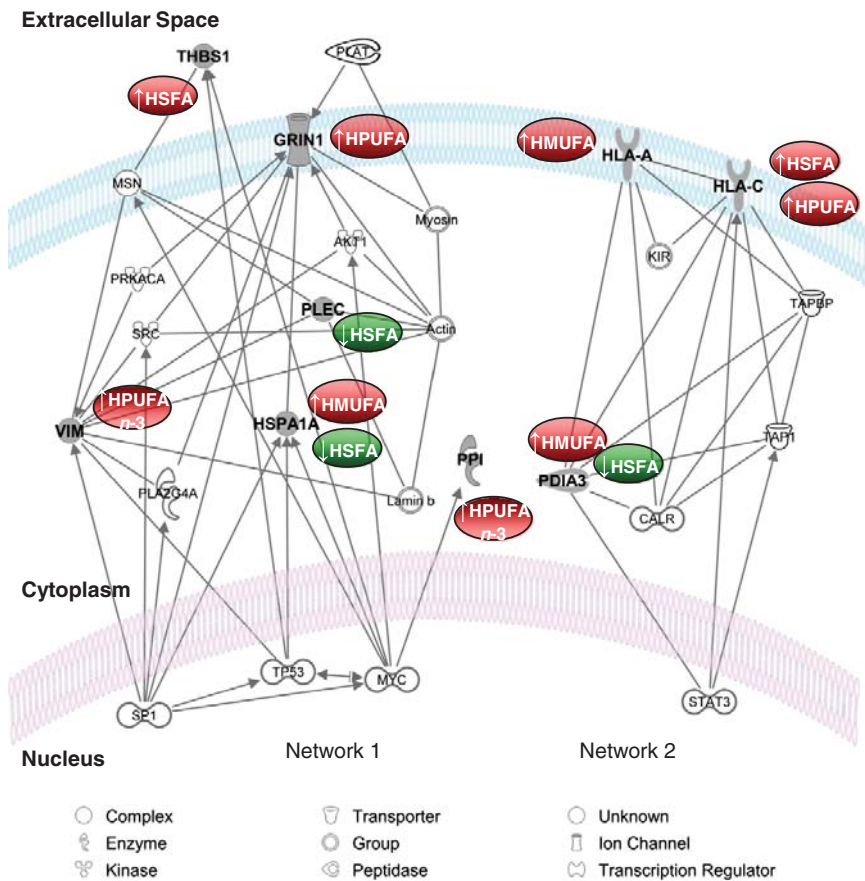


Fig. 2. Interaction between induced proteins at the postprandial state. Networks of differentially expressed proteins at the postprandial state after the acute intake of four diets with different quantities and qualities of fat that were found to be interconnected and interacting with each other. Gray symbols denote that the proteins were found overexpressed or underexpressed by dietary fat at the postprandial state.

When meals contained close percentages of SFA and MUFA (HPUFA meals), no proteome changes related to oxidative stress were observed, probably due to an intermediate situation between HSFA and HMUFA meals. However, the intake of HPUFA meals (with or without n-3 supplementation) seems to cause postprandial changes in cell morphology, as suggested by the dysregulation observed in FLNA (filamin alpha) and MRLC3 (myosin regulatory light chain) after HPUFA intake, and VIM (vimentin) and CAPZB (capping protein, actin filament) after HPUFA intake supplemented with LC n-3 fatty acids.

In addition, the supplementation of an HPUFA meal with LC n-3 PUFA led to a proteome change related to fatty acid metabolism. Fatty acid beta-oxidation occurs in both mitochondria and peroxisomes. Mitochondria catalyze the beta-oxidation of the bulk of fatty acids derived from diet, and peroxisomes are involved, preferentially, in the beta-oxidation chain shortening of very long chain fatty acids [48]. It has been suggested that increased intakes or supplements of n-3 fatty acids may improve defects in insulin signaling [49]. Since peroxisomal beta-oxidation has been shown to be inhibited by insulin [50], the fact that our study has shown that ECH1, an enzyme involved in the peroxisomal beta-oxidation pathway [51], was down-regulated after an HPUFA n-3 meal intake suggests that ECH1 down-regulation and the subsequent reduction of peroxisomal beta-oxidation may underlie the beneficial effects in

insulin signaling observed after intake of n-3 fatty acids, and suggests that peroxisomal beta-oxidation inhibition by insulin could be caused by ECH1 down-regulation.

In addition, n-3 PUFA supplementation of an HPUFA meal led to the postprandial up-regulation of PPIA (cyclophilin A), a protein that binds to cyclosporine, an immunosuppressant which is usually used to suppress rejection after internal organ transplants, by halting the production of the proinflammatory molecules TNF- α and interleukin-2 [52] and was also involved in the anti-inflammatory effects associated to n-3 fatty acid consumption [53]. Thus, n-3 PUFA consumption could increase the effect of cyclosporine which would support the therapeutic administration of n-3 PUFA in combination with cyclosporine after organ transplantation.

In conclusion, HSFA meal intake causes deleterious postprandial changes in the proteome, in terms of DNA damage and the procoagulant state, which reflects higher postprandial oxidative stress after an HSFA meal intake when compared to the intake of HMUFA and HPUFA meals. Moreover, the addition of LC n-3 PUFA to an HPUFA meal may improve insulin signaling and exerts an anti-inflammatory effect when compared to an HPUFA meal.

Further research is needed to extend our knowledge about the nutritional regulation of the postprandial events related to cardiovascular diseases. In addition, it would be interesting to compare the effect of dietary fat in pathological and nonpathological conditions.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.06.014>.

Acknowledgments

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. We thank Ma Jose Gomez-Luna for her technical support.

References

- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005;112:2735–52.
- Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2006;21:185–93.
- van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2004;177:175–82.
- Parks EJ. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr Atheroscler Rep* 2001;3:462–70.
- Magne J, Mariotti F, Fischer R, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Early postprandial low-grade inflammation after high-fat meal in healthy rats: possible involvement of visceral adipose tissue. *J Nutr Biochem* 2010;21:550–5.
- Khoury DE, Hwalla N, Frochot V, Lacorte JM, Chabert M, Kalopissis AD. Postprandial metabolic and hormonal responses of obese dyslipidemic subjects with metabolic syndrome to test meals, rich in carbohydrate, fat or protein. *Atherosclerosis* 2010;210:307–13.
- Ruotolo G, Howard BV. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Curr Cardiol Rep* 2002;4:494–500.
- Caimari A, Oliver P, Keijzer J, Palou A. Peripheral blood mononuclear cells as a model to study the response of energy homeostasis-related genes to acute changes in feeding conditions. *Omic* 2010;14:129–41.
- Burczynski ME, Dorner AJ. Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics* 2006;7:187–202.
- Bouwens M, Afman LA, Muller M. Fasting induces changes in peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles related to increases in fatty acid beta-oxidation: functional role of peroxisome proliferator activated receptor alpha in human peripheral blood mononuclear cells. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1515–23.
- Baer DJ, Judd JT, Clevidence BA, Tracy RP. Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr* 2004;79:969–73.
- Paschos GK, Rallidis LS, Liakos GK, et al. Background diet influences the anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid in dyslipidaemic subjects. *Br J Nutr* 2004;92:649–55.
- Konstantinidou V, Khymentos O, Fito M, et al. Characterization of human gene expression changes after olive oil ingestion: an exploratory approach. *Folia Biol (Praha)* 2009;55:85–91.
- Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *Omic* 2008;12:251–61.
- Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004;5:71–118.
- de Roos B, McArdle HJ. Proteomics as a tool for the modelling of biological processes and biomarker development in nutrition research. *Br J Nutr* 2008;99(Suppl. 3):S66–71.
- Fuchs D, Vafeiadou K, Hall WL, et al. Proteomic biomarkers of peripheral blood mononuclear cells obtained from postmenopausal women undergoing an intervention with soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 2007;86:1369–75.
- Garcia-Baillo B, Brenner DR, Nielsen D, et al. Dietary patterns and ethnicity are associated with distinct plasma proteomic groups. *Am J Clin Nutr* 2012;95:352–61.
- Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman JI, Smith Jr SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e13–8.
- Shaw DI, Tierney AC, McCarthy S, et al. LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *Br J Nutr* 2009;101:750–9.
- Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, et al. Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc Res* 2003;57:168–77.
- Gorg A, Drews O, Luck C, Weiland F, Weiss W. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 2009;30(Suppl. 1):S122–32.
- Calvano SE, Xiao W, Richards DR, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005;437:1032–7.
- Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281–91.
- Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:561–8.
- Jain A, Agrawal BK, Varma M, Jadhav AA. Antioxidant status and smoking habits: relationship with diet. *Singapore Med J* 2009;50:624–7.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 2007;81:15–27.
- Daoud SS, Munson PJ, Reinhold W, et al. Impact of p53 knockout and topotecan treatment on gene expression profiles in human colon carcinoma cells: a pharmacogenomic study. *Cancer Res* 2003;63:2782–93.
- Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci (Lond)* 2010;119:251–61.
- Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 2001;268:2764–72.
- Sablina AA, Budanov AV, Ilyinskaya GV, Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005;11:1306–13.
- Gutierrez-Mariscal FM, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 induces postprandial changes in p53 in response to oxidative DNA damage in elderly subjects. *Age (Dordr)* 2012;34:389–403.
- McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* 2004;27:538–46.
- Roberts W, Magwenzi S, Aburima A, Naseem KM. Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade. *Blood* 2010;116:4297–306.
- Jennings LK. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 2009;103:4A–10A.
- Iacoviello L, Vischetti M, Zito F, Benedetta Donati M. Genes encoding fibrinogen and cardiovascular risk. *Hypertension* 2001;38:1199–203.
- Redman CM, Xia H. Fibrinogen biosynthesis. Assembly, intracellular degradation, and association with lipid synthesis and secretion. *Ann N Y Acad Sci* 2001;936:480–95.
- Smith A, Patterson C, Yarnell J, Rumley A, Ben-Shlomo Y, Lowe G. Which hemostatic markers add to the predictive value of conventional risk factors for coronary heart disease and ischemic stroke? The Caerphilly Study. *Circulation* 2005;112:3080–7.
- Peberner S, Perry JJ, Tainer JA, Boddy MN. Nse1 RING-like domain supports functions of the Smc5-Smc6 holocomplex in genome stability. *Mol Biol Cell* 2008;19:4099–109.
- Ahn K, Erlander M, Leturcq D, Peterson PA, Fruh K, Yang Y. In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem* 1996;271:18237–42.
- Li J, Powell SR, Wang X. Enhancement of proteasome function by PA28 α : overexpression protects against oxidative stress. *Faseb J* 2011;25:883–93.
- Murakumo Y, Ogura Y, Ishii H, et al. Interactions in the error-prone postreplication repair proteins hREV1, hREV3, and hREV7. *J Biol Chem* 2001;276:35644–51.
- Jessop CE, Bulleid NJ. Glutathione directly reduces an oxidoreductase in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Biol Chem* 2004;279:55341–7.
- Fernandez-Sanchez A, Madrigal-Santillan E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 2011;12:3117–32.
- Codoner-Franch P, Valls-Belles V, Arilla-Codoner A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Transl Res* 2010;158:369–84.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007;48:1905–14.
- Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res* 2010;107:1071–82.
- Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: an adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr* 2001;21:193–230.
- Carpentier YA, Portois L, Malaisse WJ. n-3 fatty acids and the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1499S–504S.
- Hamel FG, Bennett RG, Upward JL, Duckworth WC. Insulin inhibits peroxisomal fatty acid oxidation in isolated rat hepatocytes. *Endocrinology* 2001;142:2702–6.
- FitzPatrick DR, Germain-Lee E, Valle D. Isolation and characterization of rat and human cDNAs encoding a novel putative peroxisomal enoyl-CoA hydratase. *Genomics* 1995;27:457–66.
- Wang P, Heitman J. The cyclophilins. *Genome Biol* 2005;6:226.
- Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev* 2010;68:280–9.



Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients^{☆,☆☆,★}

Patricia Peña-Orihuela^{a,b,1}, Antonio Camargo^{a,b,1}, Oriol Alberto Rangel-Zuñiga^{a,b}, Pablo Perez-Martinez^{a,b}, Cristina Cruz-Teno^{a,b}, Javier Delgado-Lista^{a,b}, Elena M. Yubero-Serrano^{a,b}, Juan A. Paniagua^{a,b}, Francisco J. Tinahones^c, Maria M. Malagon^d, Helen M. Roche^e, Francisco Perez-Jimenez^{a,b}, Jose Lopez-Miranda^{a,b,*}

^aLipids and Atherosclerosis Research Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba. Cordoba 14004, Spain

^bCIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, Spain

^cHospital Virgen de la Victoria. Malaga 29010, Spain, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Spain

^dDepartment of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, Cordoba 14071, Spain

^eNutrigenomics Research Group, UCD School of Public Health and Population Science, UCD Conway Institute, University College Dublin, Ireland

Received 4 November 2012; received in revised form 12 February 2013; accepted 26 February 2013

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) is associated with high oxidative stress, which is caused by an increased expression of NADPH-oxidase and a decreased expression of antioxidant enzymes in the adipose tissue. Our aim was to evaluate whether the quality and quantity of dietary fat can modify that process. A randomized, controlled trial conducted within the LIPGENE study assigned MetS patients to one of four diets for 12 wk each: (i) high-saturated fatty acid (HSFA), (ii) high-monounsaturated fatty acid (HMUFA), (iii) and (iv) two low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids (LFHCC n3), or placebo (LFHCC). A fat challenge reflecting the same fatty acid composition as the original diets was conducted post-intervention. The intake of an HSFA meal induced a higher postprandial increase in gp91phox and p67phox mRNA levels than after the intake of HMUFA, LFHCC and LFHCC n-3 meals (all p-values < 0.05). The postprandial decrease in CAT, GPXs and TXNRD1 mRNA levels after the HSFA meal intake was higher than after the intake of HMUFA, LFHCC and LFHCC n-3 meals (all p-values < 0.05). The intake of an HSFA meal induced a higher postprandial increase in KEAP1 mRNA levels than after the consumption of the HMUFA ($P = .007$) and LFHCC n-3 ($P = .001$) meals. Our study demonstrated that monounsaturated fat consumption reduces oxidative stress as compared to saturated fat by inducing higher postprandial antioxidant response in adipose tissue, and thus, replacing SFA for MUFA may be an effective dietary strategy to reduce the oxidative stress in MetS patients and its pathophysiological consequences. © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Metabolic syndrome; Oxidative stress; Antioxidant enzymes; Diet; Adipose tissue; LIPGENE study

1. Introduction

The metabolic syndrome (MetS) is a multi-component disorder characterized by hypertriglyceridemia, low HDL cholesterol, hyperglycaemia, abdominal obesity and hypertension, and is closely linked to cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes mellitus [1,2].

The etiology of MetS is the result of a complex interaction between genetic, metabolic and environmental factors including dietary habits and, probably, the quality and quantity of dietary fat [3].

Obesity is the central component of the MetS [4–6]. Furthermore, the expansion of adipose tissue and the enlargement of adipocytes in obesity have been shown to be associated with hypoxia, oxidative

[☆] Clinical Trial Registration Number: Study identifier at ClinicalTrials.gov was NCT00429195.

^{☆☆} Conflict of interests: None of the authors has any conflict of interests that could affect the performance of the work or the interpretation of the data.

[★] Source of funding: This study was supported partly by research grants from the European community (LIPGENE European project-505944), the Spanish Ministry of Health (CB06/03/0047 (CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición) and the following Spanish entities: Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2006-01979/ALI, AGL2009-12270 to JL-M and SAF2007-62005 to FP-J), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Proyectos de Investigación de Excelencia Junta de Andalucía (AGR 05/00922 and CT5015 to FP-J and P06-CTS-01425 to JL-M); Consejería de Salud, Junta de Andalucía (06/128, 07/43, PI 0193/09 to JL-M, 06/129 to FP-J), Centro de Excelencia Investigadora Aceite de Oliva y Salud (CEAS), FEDER, Fondo Social Europeo. PP-O has a fellowship from Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU), Ministerio de Educación. Gobierno de España.

* Corresponding author. Servicio de Medicina Interna, Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis, Hospital Universitario Reina Sofía, Avda. Menendez Pidal, s/n, 14004, Cordoba, Spain. Tel.: +34 957 012882; fax: +34 957 204763.

E-mail address: jlopezmir@uco.es (J. Lopez-Miranda).

¹ The first two authors (P.P.-O. and A.C.) contributed equally to this study.

stress and even mechanical damage due to hypertrophy of the adipocyte [7]. This adipocyte hypertrophy and the subsequent dysfunctional adipose tissue lead to a pro-oxidative and pro-inflammatory state characteristic of MetS patients [8]. In addition to low grade inflammation [9], MetS patients have high oxidative damage, as evidenced by increased oxidative stress plasma biomarkers [10].

Oxidative stress induces damage to DNA, lipids and proteins, and is also involved in the pathogenesis and etiology of several diseases, such as insulin resistance, impaired glucose tolerance, diabetes and CVD [11]. In addition, oxidative stress induces inflammation through the generation of inflammatory mediators, such as interleukins and adhesion molecules [12].

Systemic oxidative stress in obesity seems to be caused by an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and detoxification in the adipose tissue but not in other tissues [13]. Additionally, it has been proposed that adipose tissue oxidative stress is responsible for the development of MetS through dysregulation of the release of adipocytokines and by generating systemic oxidative stress [13]. Diet, and specifically the quality of dietary fat, can modulate this process. Previous dietary intervention studies have demonstrated that altering fat composition can significantly reduce oxidative stress in the MetS [14,15]. However, these studies have assessed oxidative stress in the fasting state, and humans spend most of the day in a continuous postprandial state. Postprandial oxidative stress is characterized by an imbalance between the production of ROS and their elimination by the antioxidant system [16,17], with an increase in oxidative stress biomarkers after meals [18–20], which is very important, as humans spend most of the time in the postprandial state [21].

Previous findings from the LIPGENE study have shown that diet may influence several features of the MetS. In fact, this study demonstrated that consumption of n-3 decreases the risk of MetS [22]. Moreover, consumption of n-3 and MUFA reduces the postprandial abnormalities of MetS [23], and the atherogenicity of the cholesterol-LDL particles [24].

In a previous work performed in the Cordoba subcohort of the LIPGENE study, we demonstrated that the HMUFA diet improves plasma postprandial oxidative stress parameters, and that the LFHCC and LFHCC n-3 diets have an intermediate effect relative to the HMUFA and HSFA diets in MetS patients [25]. On the basis of these previous findings, the aim of the current work was to explore the molecular mechanism that may trigger the diet-induced changes in postprandial oxidative stress by analyzing the gene expression of NADPH-oxidase (involved in ROS production), the antioxidant enzymes, and the regulatory genes NFE2L2 and KEAP1, in the adipose tissue of the MetS patients.

2. Methods and materials

2.1. Participants and recruitment

The current study was conducted within the framework of the LIPGENE study (“Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis”), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. This study was carried out at the Lipid and Atherosclerosis Unit at the Reina Sofia University Hospital, from February 2005 to April 2006. The 75 patients of the Cordoba cohort of the LIPGENE study were accepted to participate in the postprandial study and successfully concluded the dietary intervention and the post-intervention postprandial lipaemia studies. The Cordoba cohort was divided into two subgroups, patients in subcohort I ($N = 36$) followed the dietary intervention in the first year (2005), and patients in subcohort II ($N = 39$) followed the dietary intervention in the second year (2006). Due to the difficulty of collecting adipose tissue samples, we only collected postprandial adipose tissue samples from subcohort II ($N = 39$), in the second year of study (8 in HSFA diet group, 9 in HMUFA diet group, 12 in LFHCC diet group, and 10 in LFHCC n-3 diet group). All participants gave written informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemistry analysis before enrolment. Clinical Trial Registra-

tion Number: NCT00429195. The experimental protocol was approved by the local ethic committee according to the Helsinki Declaration.

2.2. Design

Patients were randomly stratified to 1 of 4 dietary interventions for 12 wk. MetS was defined by published criteria [26], which conformed to the LIPGENE inclusion and exclusion criteria [27]. A post-intervention high-fat meal was administered providing the same amount of fat (0.7 g/kg body weight) contained in the intervention period. The intervention study design and intervention protocol, which also provides information about pre, mid, and post-intervention food consumption and dietary compliance have been described in detail by Shaw et al. [27].

2.3. Randomization and intervention

Randomization was completed centrally, according to age, gender and fasting plasma glucose concentration using the Minimisation Program for Allocating patients to Clinical Trials (Department of Clinical Epidemiology, London Hospital Medical College, UK) randomisation program. Four differed diets in fat quantity and quality while remaining isoenergetic (Supplemental Table 1). Two diets were designed to provide 38% energy (E) from fat: a high-fat, saturated fatty acid-rich diet (HSFA), which was designed to provide 16% E as SFA, and a high monounsaturated fatty acid rich diet (HMUFA) designed to provide 20% E from MUFA. The other two diets were low fat, high complex carbohydrates-rich diet (LFHCC and LFHCC (n-3); 28%E from fat); the LFHCC (n-3) diet included a 1.24-g/d supplement of long chain (n-3) PUFA [ratio of 1.4 eicosapentaenoic acid (EPA):1 docosahexaenoic acid (DHA)] and the LFHCC diet included a 1.2- g/d supplement of control high-oleic sunflower seed oil capsules (placebo). The test meal, which represents a fat overload providing the same amount of fat (65%), allowed us to study the postprandial responses after a fat challenge that may be influenced by the previous dietary intervention because of adaptive effect after a long-term dietary intervention [27]. Patients received a fat meal reflecting the fatty acid composition of the original diet. Patients arrived at the clinical center at 8:00 a.m. following a 12 h. Fast, having refrained from smoking during the fasting period and abstained from alcohol intake during the preceding 7 days. After cannulation, a fasting blood sample was taken before the test meal, which then was ingested within 20 min. under supervision. Then, the blood samples were drawn at 4 h. The test meals were prepared in the center, reflecting the fatty acid composition of each subject's chronic dietary intervention (the composition of the meals has been previously described [28]). These test meals provided an equal amount of fat (0.7 g/kg body weight), E content (40.2 kJ/kg body weight), cholesterol (5 mg/ kg of body weight), fiber, and vitamin A (62.9 μ mol vitamin A (retinol)/m² body surface area). The test meal provided 65% of E as fat, 10% as protein, and 25% as carbohydrates. During the postprandial assessment, participants rested and did not consume any other food, but were allowed to drink water. The composition of the breakfasts was as follows: HSFA, 38% E from SFA, based on butter, whole milk, white bread and eggs intake; HMUFA, 43% E from MUFA, based on olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs and tomatoes intake; LFHCC with placebo capsules, 16% E as PUFA; LFHCC with LC (n-3) PUFA, 16% E as PUFA [1.24 g/d of LC (n-3) PUFA (ratio 1.4 EPA:1 DHA)]. Meals after LFHCC diets were based on butter, olive oil, skimmed milk, white bread, eggs, yolk eggs and walnuts.

2.4. Subcutaneous adipose tissue samples collection

Subcutaneous adipose tissue samples were obtained from the superficial abdominal subcutaneous adipose tissue lateral to the navel with instrument Bard® Magnum (ref. MG1522), needles Bard® Magnum Core (ref. MN1410). Samples were obtained at post-intervention in fasting state and 4 hours after the administration of the fatty meal. Immediately after extraction, samples were stored in eppendorf tubes with RNAlater until RNA extraction.

2.5. RNA isolation from adipose tissue

Adipose tissue was homogenized by Ultra-Turrax T25 (IKA Labor Technik). After lipids removal from the top of the tube, RNA was isolated with a commercial kit RiboPure kit (Ambion) designed for rapid purification of RNA and high quality. RNA is collected from the aqueous phase by binding to a glass fiber filter. The quantification of RNA is made using the spectrophotometer v3.5.2 Nanodrop ND- 1000 spectrophotometer (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK).

2.6. Gene expression by Real-time PCR

Retroscription reaction was performed with 1 μ g of total RNA using the commercial kit iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were carried out using the OpenArray NT Cycler system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The gene expression analysis was performed in duplicated samples from 39 subjects at fasting and postprandial states. Primer pairs were selected from the database TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adiirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267for> for the following genes: nuclear

Table 1
Baseline characteristics of subjects with the MetS assigned to each diet

Baseline characteristics	HSFA (n = 8)	HMUFA (n = 9)	LFHCC (n = 12)	LFHCC n-3 (n = 10)	P-value
Age (years)	57.8 ± 3.1	57.1 ± 2.3	56.5 ± 2.0	54.8 ± 2.1	.839
BMI (kg/m ²)	36.0 ± 1.2	34.5 ± 1.2	35.7 ± 1.0	35.0 ± 1.2	.817
Waist circumference	111.7 ± 3.1	104.0 ± 2.0	109.0 ± 3.1	108.3 ± 3.3	.420
TC (mg/dl)	204.0 ± 19.0	192.2 ± 11.1	206.8 ± 14.9	196.9 ± 10.0	.877
TG total (mg/dl)	226.7 ± 65.2	159.1 ± 20.9	161.5 ± 17.5	158.1 ± 20.3	.422
c-LDL (mg/dl)	129.7 ± 13	135.9 ± 9.6	148.2 ± 12.1	140.4 ± 8.8	.693
c-HDL (mg/dl)	41.0 ± 4.5	44.4 ± 3.3	43.4 ± 3.6	41.4 ± 2.9	.906
Glucose (mg/dl)	117.7 ± 6.2	120.3 ± 7.1	106.1 ± 3.2	125.1 ± 13.5	.371
Insulin (mU/ml)	15.3 ± 1.3	11.5 ± 1.3	12.6 ± 1.4	13.3 ± 1.7	.400

Values presented are the mean ± S.E.M. of each diet group. Abbreviations: HSFA, SFA-rich diet; HMUFA, MUFA-rich diet; LFHCC, Low-fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCC n-3, Low fat, high-complex carbohydrate diet with 1.24 g/d LC n-3 PUFA diet; BMI, body mass index; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; c-HDL, high density lipoprotein-cholesterol; c-LDL, low density lipoprotein-cholesterol. P-value corresponds to ANOVA statistical analysis.

factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NFE2L2), kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1), superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (GPX1), glutathione peroxidase 3 (GPX3), glutathione peroxidase 4 (GPX4), thioredoxin (TXN) and thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), NADPH oxidase subunits (gp91^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}). The relative expression for each gene was calculated using the ribosomal protein, large, P0 (RPLP0) as a housekeeping gene. The data set was analyzed by OpenArray Real-Time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

2.7. Statistical analysis

SPSS statistical software, version 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. The normal distribution of variables to characterize the postprandial response was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. The p47^{phox} gene expression values were log transformed to get a normal distribution. We performed analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements to determine the postprandial effect of the fat meal composition, with dietary intervention as the inter-subject factor. The global p-values indicate: P1: the effect of the diet (between-subject effect); P2: the time effect (within-subject effect); and P3: the interaction of both factors (diet by time interaction). Post hoc statistical analysis was completed using Bonferroni's multiple comparisons test. A P value <0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Baseline characteristics

No significant differences were found in the baseline characteristics between the groups of MetS patients assigned to each diet in the dietary intervention study (Table 1).

3.2. Diet effect on NADPH-oxidase gene expression in the postprandial state

We analyzed the effect of the dietary fat on the gene expression of NADPH-oxidase subunits (gp91^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox} and p40^{phox}) in the postprandial state. We found a postprandial increase in p40^{phox},

p47^{phox}, p67^{phox} and gp91^{phox} mRNA levels (P < 0.001, P < 0.001, P < 0.001, and P = 0.007, respectively) (Table 2). However, the intake of HSFA meal induced a higher postprandial increase in the gp91^{phox} and p67^{phox} mRNA levels than the intake of HMUFA (p = 0.003 and p = 0.039), LFHCC (p = 0.007 and p = 0.009) and LFHCC n-3 (p = 0.001 and p = 0.006) meals.

3.3. Effect of diet on antioxidant enzyme gene expression in the postprandial state

We also studied the effect of the dietary fat on the postprandial gene expression of the antioxidant enzymes SOD1, SOD2, CAT, GPX1, GPX3, and GPX4. We did not observe any postprandial changes in SOD1 mRNA levels, but the SOD2 mRNA levels, the mitochondrial isoform, increased in the postprandial state irrespective of the meal ingested (all, P < 0.05) (Fig. 1A). Post hoc statistical analysis showed that the postprandial increase in SOD2 mRNA levels were higher after the HSFA meal than after the intake of the other meals (all, P < 0.001) (Fig. 1B).

The postprandial increase in CAT mRNA levels observed after an HMUFA meal intake was statistically significant compared to the postprandial decrease in CAT mRNA levels observed after an HSFA (P = 0.002) and LFHCC (P = 0.013) meals intake (Fig. 1C). In addition, the postprandial decrease after the HSFA meal intake was higher than after the intake of LFHCC (P = 0.037) and LFHCC n-3 (P = 0.014) meals. Moreover, the postprandial increase in GPX1 mRNA levels observed after an HMUFA meal intake was statistically significant compared to the postprandial decrease in GPX1 mRNA levels observed after an HSFA (P = 0.004), LFHCC (P = 0.005) and LFHCC n-3 (P = 0.002) meals intake (Fig. 1D).

Additionally, the postprandial decrease in GPX3 mRNA levels after the HSFA meal intake was higher than after the intake of HMUFA (P = 0.037), LFHCC (P = 0.001) and LFHCC n-3 (P = 0.003) meals (Fig. 1E). By contrast, the postprandial increase in GPX4 mRNA levels after the HSFA meal intake was higher than after the intake of HMUFA (P = 0.049), LFHCC (P = 0.025) and LFHCC n-3 (P < 0.001) meals (Fig. 1F).

3.4. Effect of diet on gene expression of antioxidant redox-related proteins in the postprandial state

We have also studied the gene expression of TXN, a small redox protein involved in ROS detoxification and TXNRD1, the enzyme that reduces thioredoxin from the oxidised form to the reduced, active (in terms of ROS detoxification) form. Our study showed that the postprandial increase in TXN mRNA levels after intake of an HSFA meal was higher than after HMUFA (P = 0.001) and LFHCC n-3 (P = 0.001) meals. Moreover, the postprandial decrease in TXNRD1 mRNA levels after the intake of an HSFA meal was greater than after the HMUFA (P < 0.001), LFHCC (P < 0.001) and LFHCC n-3 (P < 0.001) meals (Fig. 1H).

Table 2

Postprandial increment in NADPH oxidase subunits gp91^{phox}, p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} mRNA levels in adipose tissue of subjects with MetS after the dietary intervention

Genes	DIETS				P values		
	HSFA	HMUFA	LFHCC	LFHCC-n-3	Diet effect	Time effect	Diet-by-time effect
gp91 ^{phox}	0.231 ± 0.044 *	0.034 ± 0.035 ‡	0.020 ± 0.062 ‡	0.013 ± 0.044 ‡	0.038	0.007	0.021
p67 ^{phox}	0.527 ± 0.153 *	0.137 ± 0.093 ‡	0.125 ± 0.052 ‡	0.022 ± 0.066 ‡	0.004	<0.001	0.004
p47 ^{phox}	0.558 ± 0.200 *	0.600 ± 0.104 *	0.342 ± 0.148 *	0.250 ± 0.079	0.867	<0.001	0.266
p40 ^{phox}	0.320 ± 0.055 *	0.218 ± 0.041 *	0.162 ± 0.063 *	0.121 ± 0.039 *	0.071	<0.001	0.090

Postprandial post-intervention differences in the parameter levels between time 0 and time 4 are shown as Δ 4 h. HSFA: SFA-rich diet; HMUFA: MUFA-rich diet; LFHCC: Low-fat, high-complex carbohydrate diet with placebo; LFHCCn-3: Low-fat, high-complex carbohydrate diet with 1.24 g/day long-chain n-3 PUFA diet. Values are represented by means ± standard errors (SE). Data were analyzed using ANOVA for repeated measures (n = 39). P1: diet effect, P2: time effect and P3: diet by time effect.

* Means significant time effect (P < 0.05) intra-diet versus fasting state post-intervention.

‡ Means P < 0.05 between HSFA diet and the indicated diet, taken together the two post-intervention measurements.

3.5. Effect of diet in the postprandial state on antioxidant response regulatory genes

The NFE2L2 transcription factor is sequestered in the cytoplasm by Keap1 and constantly ubiquitinated and degraded by proteasome action; however, under stress conditions, the Keap1-NFE2L2 complex is disrupted and NFE2L2 migrates to the nucleus. We found that NFE2L2 mRNA increased in the postprandial state after the HSFA, LFHCC and LFHCC n-3 meals ($P = 0.028$, $P < 0.001$ and $P = 0.008$, respectively), and it tended to increase after the HMUFA meal (Fig. 2A), although it did not

reach statistical significance ($P = 0.052$), and no statistically significant diet effect was found on NFE2L2 mRNA levels. Moreover, the HSFA meal induced a higher KEAP1 mRNA levels increase than the HMUFA ($P = 0.007$) and LFHCC n-3 ($P = 0.001$) meals (Fig. 2B).

4. Discussion

Oxidative stress breaks the equilibrium, leading to tissue damage [16] and biomolecular alterations such as in lipids, proteins and nucleic acids [29]. Animal studies have shown that systemic oxidative

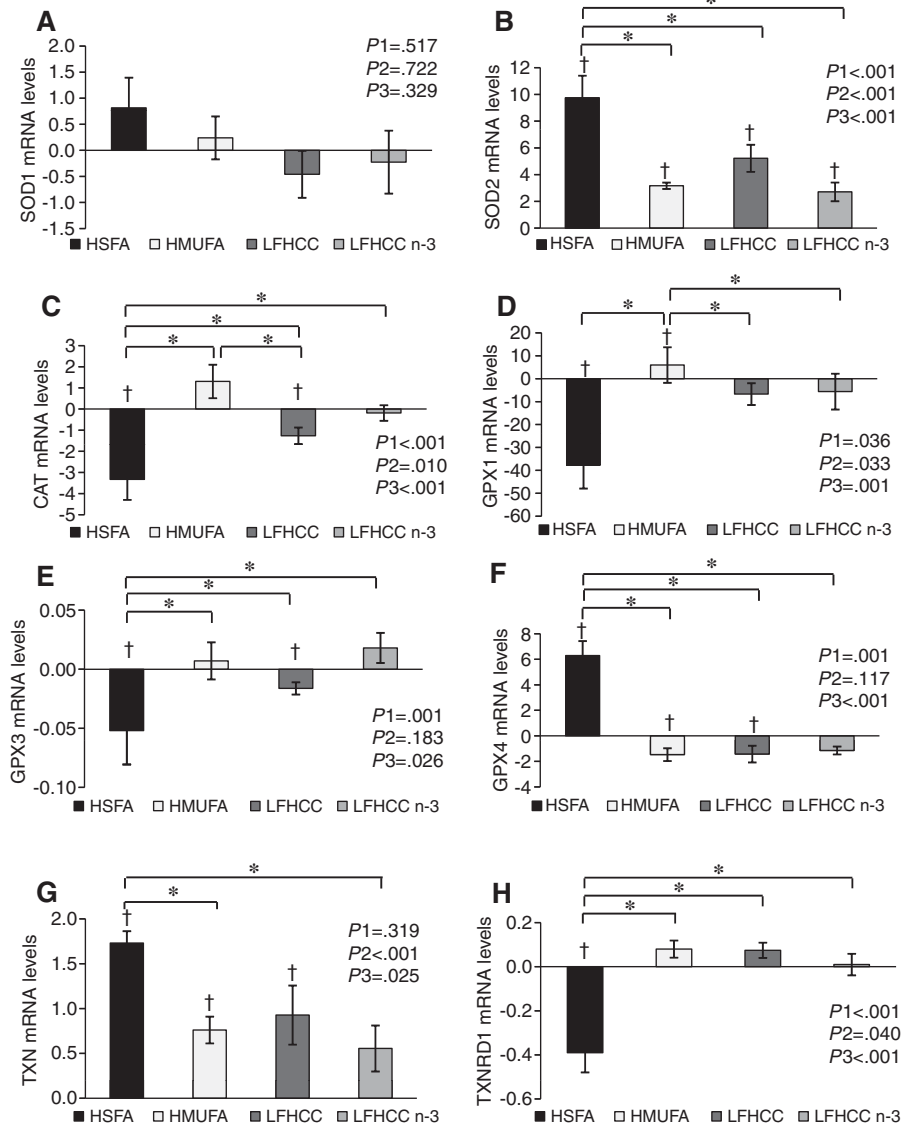


Fig. 1. Antioxidant enzymes postprandial changes in adipose tissue according to the four diets consumed. Mean (\pm S.E.M.) of postprandial gene expression changes in (A) catalase, (B) superoxide dismutase 1, (C) superoxide dismutase 2, (D) thioredoxin, (E) glutathion peroxidase 2, (F) glutathion peroxidase 3, (G) glutathion peroxidase 3, (H) thioredoxin reductase, after the intake of a meal reflecting the fatty acid composition of the diets consumed during the dietary intervention. HSFA: high-saturated fatty acid; HMUFA: high-monounsaturated fatty acid; LFHCC n-3: low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids; LFHCC: low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with placebo. ANOVA for repeated measured, global p-values: P1: diet effect; P2: time effect; P3: diet by time interaction. Post hoc statistical analysis using Bonferroni's multiple comparisons test, * $P < 0.05$ between diets, $^{\dagger}P < 0.05$ between time points.

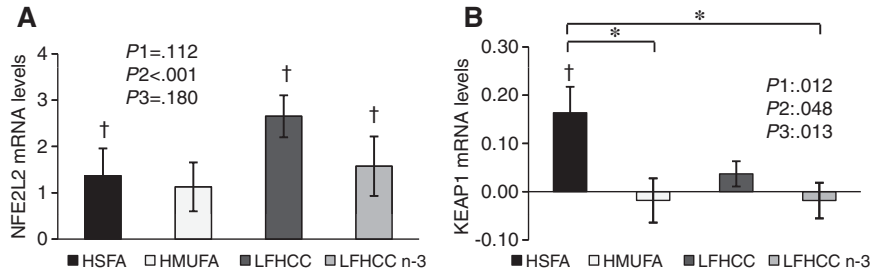


Fig. 2. Postprandial changes in adipose tissue mRNA levels of *NFE2L2* and *KEAP1*. Mean (\pm S.E.M.) of postprandial gene expression changes in (A) nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2, (B) kelch-like ECH-associated protein 1, after the intake of a meal reflecting the fatty acid composition of the diets consumed during the dietary intervention. HSFA: high-saturated fatty acid; HMUFA: high-monounsaturated fatty acid; LFHCC n-3: low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids; LFHCC: low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with placebo. ANOVA for repeated measured, global p-values: P1: diet effect; P2: time effect; P3: diet by time interaction. Post hoc statistical analysis using Bonferroni's multiple comparisons test. * $P < 0.05$ between diets, † $P < 0.05$ between time points.

stress in obesity is caused by ROS production in the adipose tissue but not in other tissues, as a consequence of an increase in the expression of NADPH-oxidase, an enzyme involved in the production of ROS [30], and by a decrease in the expression of antioxidant enzymes [13].

In the present study, we have shown for the first time in humans that this process can be modulated by dietary fat. We have found that in the postprandial state, the condition in which humans spend most of the time, we observed that the expression of NADPH-oxidase is increased and the ROS detoxification process is reduced by HSFA diet consumption but not by HMUFA or both LFHCC diets, which therefore leads to an imbalance between ROS production and inactivation, and, as a consequence, to higher postprandial oxidative stress (Fig. 3). Consistent with this, we demonstrated in a previous study that

HMUFA diet reduces the plasma postprandial oxidative stress parameters in a MetS population as compared to the HSFA diet, and both LFHCC diets had an intermediate effect between HMUFA and HSFA diets [25].

Due to current dietary habits and the extension of the postprandial state, which can take up to several hours, people in westernized cultures nowadays live in a postprandial state most of the day [21], which is an essentially stressful condition, as an increase in oxidative stress takes place after the intake of meals [18–20]. Although ROS are generated as by-products of the metabolism, several enzymes, including NADPH-oxidase, are also involved in ROS production [30]. Obesity, the central component of the metabolic syndrome [4–6], is associated with macrophage accumulation in adipose tissue [31,32],

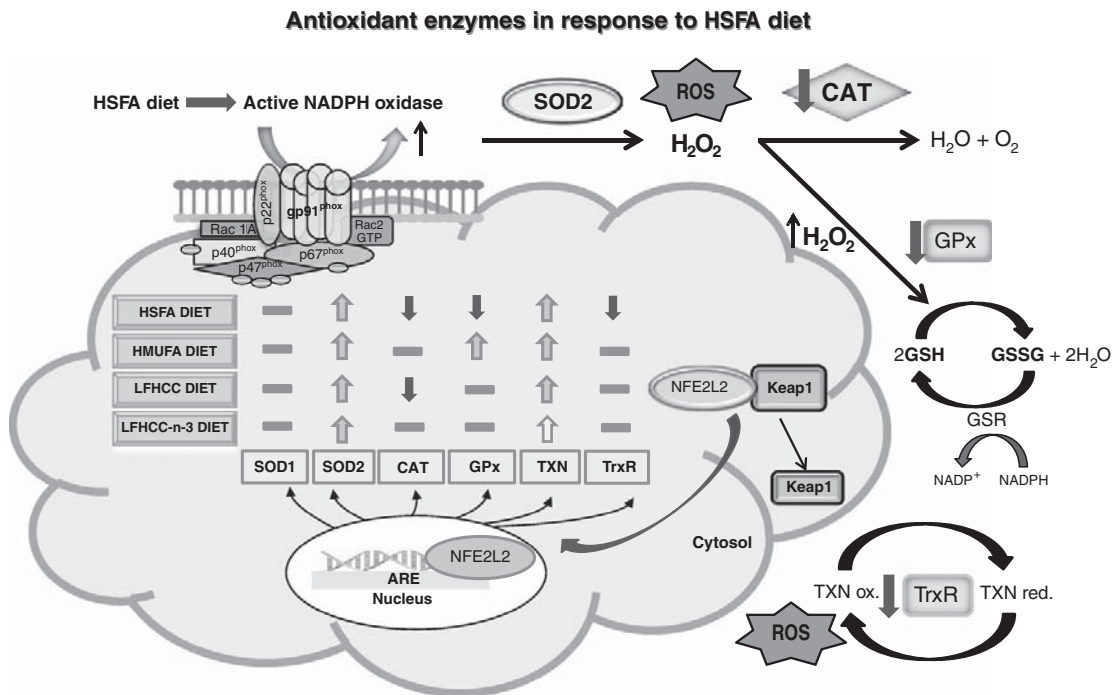


Fig. 3. Postprandial oxidative stress in metabolic syndrome adipose tissue. In the postprandial state, the condition in which humans spend most of the time, the ROS detoxification process is reduced by HSFA diet consumption but not by HMUFA or both LFHCC diets, which therefore leads to an imbalance between ROS production and inactivation, and as a consequence, higher postprandial oxidative stress after the intake of an HSFA diet.

which produces ROS by NADPH-oxidase in the respiratory burst [33,34]. However, in addition to the phagocytic cells, NADPH-oxidase is also expressed in the non-phagocytic cells of the adipose tissue [32].

Our study showed that the postprandial gene expression of NADPH-oxidase subunits increased in the postprandial state with a defined pattern of upregulation after the intake of the HSFA meal. Therefore, an upregulation of the NADPH-oxidase subunit adipose tissue gene expression may be a cause of the higher postprandial oxidative stress after HSFA diet consumption observed in our previous study [25].

Additionally, HSFA diet consumption induced lower postprandial gene expression of the antioxidant defence system. The antioxidant enzymes SOD, GPX, and CAT are regarded as the first line of defence against the ROS generated during oxidative stress [35]. SOD converts $^{\circ}\text{O}_2$ into H_2O_2 , which is, in turn, is converted into water or molecular oxygen by either CAT or GPX. Additionally, GPX4 isoform is mainly involved in the detoxification of lipid hydroperoxides generated by the action of $^{\circ}\text{O}_2$ [36–38]. Our results suggest that the mitochondrial SOD isoform, SOD2, seems to be the main cause of $^{\circ}\text{O}_2$ detoxification into H_2O_2 at the postprandial state in adipose tissue, rather than the cytoplasmic isoform SOD1, because SOD2 mRNA levels increased in the postprandial state, and no postprandial changes were observed in SOD1 gene expression.

Our study showed that the further H_2O_2 detoxification by GPX1, GPX3 and catalase is reduced after an HSFA meal as the postprandial expression of the antioxidant enzymes CAT, GPX1 and GPX3 decreased, and H_2O_2 detoxification is increased after an HMUFA meal because the postprandial expression of CAT and GPX1 increases. These findings suggest that an HSFA meal reduces the expression of the antioxidant enzymes involved in the detoxification step after $^{\circ}\text{O}_2$ inactivation, and they are supported by the greater increase in postprandial H_2O_2 in plasma found in our previous study after the intake of an HSFA meal as compared to the other meals [25].

In contrast, GPX4 postprandial mRNA levels increased only after an HSFA meal and its postprandial gene expression values were higher than after the HMUFA, and both LFHCC meals. This observation can be explained by the high preference of GPX4 to detoxify lipid hydroperoxides. In a previous study, it has been demonstrated that an HSFA diet leads to a high oxidative stress condition in the postprandial state, in which lipid peroxidation increases [39,40] and therefore, it also increases the gene expression of GPX4, the enzyme responsible for lipid hydroperoxide detoxification.

Additionally, the intake of an HSFA meal seems to reduce TXN, another antioxidant defence system. TXN is an antioxidant protein involved in the reduction of other proteins by cysteine thiol-disulfide exchange [41], and also by acting as an electron donor to peroxidases [42]. Although we did not observe any differences in TXN mRNA levels between meals, the postprandial reduction in TXNRD1 mRNA levels, the only enzymes known to reduce thioredoxin [43], suggest that the capacity to recycle TXN protein from the oxidized to the reduced and active form after a HSFA meal is diminished. In contrast, the intake of HMUFA and LFHCC meals increased the expression of TXNRD1 in the postprandial state.

Moreover, we also analyzed the expression of the regulatory genes that control the gene expression of antioxidant enzymes. The balance between ROS and antioxidant enzymes is regulated by the NFE2L2 transcription factor [44], which migrates to the nucleus as a response to oxidative stress and promotes the expression of antioxidant enzymes [45,46]. However, under non-stimulating conditions, NFE2L2 interacts with KEAP1 in the cell cytoplasm and is degraded by the proteasome [47]. In line with this, the lower antioxidant gene expression found after an HSFA meal may be explained by the fact that after that meal intake we observed a higher postprandial increase in KEAP1 mRNA levels than after the other meals. Presumably, the SFA fatty acids are blocking the antioxidant gene expression and therefore causing an increase in the oxidative stress by increasing KEAP1 levels.

In conclusion, our study showed that SFA consumption increases oxidative stress as a consequence of the imbalance between ROS production and the detoxification caused by an increased expression of NADPH-oxidase and decreased expression of antioxidant enzymes in adipose tissue. Additionally, the fact that MUFA consumption induces higher postprandial expression of antioxidant enzymes in adipose tissue, and consequently reduces the oxidative stress, suggests that the replacing of SFA for MUFA may be an effective dietary strategy to reduce the oxidative stress in MetS patients. Moreover, the consumption of a MUFA-rich diet may also prevent the development of metabolic syndrome by reducing the adipose tissue oxidative stress which has been shown to be one of the main causes responsible for the development of MetS [3,13]. The current findings also agree with other harmful effects noted in previous reports from the LIPGENE study regarding HSFA diet consumption as compared to the other diets in terms of lipid management [24], and abnormalities in lipoproteins [23], postprandial TAG levels [48], and insulin sensitivity [49].

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.02.012>.

Acknowledgments

The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. We thank M^a Jose Gomez-Luna for her technical support.

References

- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009;120:1640–5.
- Eckel RH, Alberti KGMM, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2010;375:181–3.
- Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 2006;21:185–93.
- Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:473–81.
- Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 2000;404:652–60.
- Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* 2000;49:883–8.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: adipocyte biology adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007;48:1905–14.
- Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2010;17:332–41.
- Subramanian S, Chait A. The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:39–44.
- Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:785–90.
- Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, Diabetes, and cardiovascular disease? the common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816–23.
- Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int J Mol Med* 1999;4:223–30.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–61.
- Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation* 2002;106:2530–2.
- Roberts CK, Won D, Pruthi S, et al. Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. *J Appl Physiol* 2006;100:1657–65.
- Đuračková Z. Current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 2010;59:459–69.
- Scandalios JG. Oxidative stress responses—what have genome-scale studies taught us? *Genome Biol* 2002;3:1019.1–6.
- Cardona F, Tunes I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 2008;38:510–5.

- [19] Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism* 2008;57:867–70.
- [20] Ursini F, Sevanian A. Postprandial oxidative stress. *Biol Chem* 2002;383:599–605.
- [21] de Koning EJ, Rabelink TJ. Endothelial function in the post-prandial state. *Atheroscler Suppl* 2002;3:11–6.
- [22] Paniagua JA, Perez-Martinez P, Gjelstad IM, et al. A low-fat high-carbohydrate diet supplemented with long-chain n-3 PUFA reduces the risk of the metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 2011;218:443–50.
- [23] Jimenez-Gomez Y, Marin C, Peerez-Martinez P, et al. A low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with long-chain (n-3) fatty acids alters the postprandial lipoprotein profile in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 2010;140:1595–601.
- [24] Hartwich J, Malec MM, Partyka L, et al. The effect of the plasma n-3/n-6 polyunsaturated fatty acid ratio on the dietary LDL phenotype transformation – insights from the LIPGENE study. *Clin Nutr* 2009;28:510–5.
- [25] Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci* 2010;251–61.
- [26] Grundy SM, Brewer Jr HB, Cleeman Jr, et al. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:e13–8.
- [27] Shaw DI, Tierney AC, McCarthy S, et al. LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *Br J Nutr* 2009;101:750–9.
- [28] Camargo A, Rangel-Zuniga OA, Pena-Orihuela P, et al. Postprandial changes in the proteome are modulated by dietary fat in patients with metabolic syndrome. *J Nutr Biochem* 2012;24:318–24.
- [29] Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:72–7.
- [30] Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets* 2005;6:495–501.
- [31] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–808.
- [32] Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–30.
- [33] Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med* 2000;29:416–24.
- [34] Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol* 1995;6:357–65.
- [35] Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol* 2002;40:1213–32.
- [36] Faraci FM, Didion SP. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1367–73.
- [37] Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999;32:595–603.
- [38] Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ. Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:42–59.
- [39] Blokhina O, Fagerstedt KV. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiol Biochem* 2010;48:359–73.
- [40] Gago-Dominguez M, Jiang X, Castelao JE. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Res* 2007;9:201.
- [41] Yoshida T, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J. The involvement of thioredoxin and thioredoxin binding protein-2 on cellular proliferation and aging process. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1055:1–12.
- [42] Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000;267:6102–9.
- [43] Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* 2000;346:1–8.
- [44] Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1199–207.
- [45] Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:385–94.
- [46] Xu W, Hellerbrand C, Kohler UA, et al. The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab Invest* 2008;88:1068–78.
- [47] Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* 2006;38:769–89.
- [48] van Hees AMSW, Hul GB, Schaper NC, Timmerman BE, Lovegrove JA, Roche HM, Blaak EE. Effects of dietary fat modification on skeletal muscle fatty acid handling in the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2010;34:859–70.
- [49] Anneke MJ, van Hees JWEJ, Essers Y, Roche HM, Wim HM, Saris EEB. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression in subcutaneous adipose tissue is decreased after an isoenergetic low-fat high-complex carbohydrate diet in the metabolic syndrome. *Metab Clin Exp* 2012;61:1404–12.