

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis



ELIANA ROMINA MEZA MIRANDA

TESIS DOCTORAL 2014

TITULO: *Modulación por la dieta del estrés oxidativo en tejido adiposo en personas de edad avanzada*

AUTOR: *Eliana Romina Meza Miranda*

© 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

**MODULACIÓN POR LA DIETA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO
ADIPOSO EN PERSONAS DE EDAD AVANZADA**

Trabajo presentado por

Eliana Romina Meza Miranda

Licenciada en Nutrición, para optar al grado de

Doctor

Dirigido por

Prof. Dr. José López Miranda

Dr. Antonio Camargo García





TÍTULO DE LA TESIS: MODULACIÓN POR LA DIETA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO EN PERSONAS DE EDAD AVANZADA.

DOCTORANDA: Eliana Romina Meza Miranda

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS.

D JOSÉ LÓPEZ MIRANDA Y D ANTONIO CAMARGO GARCÍA,

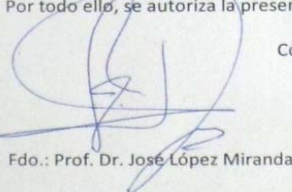
El trabajo de tesis realizado por Eliana Romina Meza Miranda, bajo nuestra dirección en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba/Universidad de Córdoba, se ha basado en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el estrés oxidativo postprandial en tejido adiposo, en respuesta a la cantidad y tipo de grasa ingerida en la dieta en personas de edad avanzada, así como profundizar en el efecto postprandial de los compuestos fenólicos biodisponibles del aceite de oliva virgen en el endotelio vascular, mediante un abordaje genómico. 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, y su relación con el desarrollo de síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular. En cuanto a la difusión de los resultados de la tesis, la doctoranda ha participado en 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, 2 artículos SCI publicados; 1 artículo publicado y 1 artículo en vías de publicación. Las publicaciones derivadas de ésta tesis doctoral son las siguientes:

1. Meza-Miranda ER, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Tasset-Cuevas I, Tunes I, Tinahones FJ, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people. *Age (Dordr)*. 2014 Apr; 36 (2):507-17.
2. Meza-Miranda ER, Rangel-Zuñiga OA, Marin C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Haro Mariscal C, Peña-Orihuela P, Jiménez-Morales AI, Malagón MM, Tinahones FJ, Lopez-Miranda J, Camargo A, Perez-Jimenez F. Phenolic compounds from virgin olive oil modulate the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium (en vías de publicación).

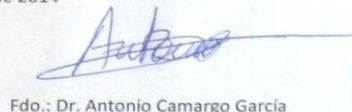
A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 12 de Mayo de 2014



Fdo.: Prof. Dr. José López Miranda



Fdo.: Dr. Antonio Camargo García

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José López Miranda que dirigió mi tesis doctoral, por sus sabios consejos que guiaron cada etapa y que junto con el Dr. Francisco Pérez Jiménez, me dieron la valiosa oportunidad de desarrollar este trabajo en tan prestigioso grupo de investigación.

Al Dr. Antonio Camargo, que también ha dirigido mi tesis doctoral, por haberme transmitido sus conocimientos y experiencia con paciencia, dedicación y por todo el apoyo y comprensión que me brindó durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Oriol Rangel, que de manera desinteresada y cordial me ayudó en la parte experimental.

A la Universidad Nacional de Asunción y la Fundación Carolina por haber valorado mi formación y dedicación académica para poder invertir mis conocimientos en el desarrollo del campo de la investigación en Paraguay otorgándome la beca para la realización de esta tesis doctoral.

A todos los miembros de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis.

Y por encima de todo a Dios, que escuchó los deseos de mi corazón y permitió materializar este sueño para poder contribuir a que mi país siga creciendo.

DEDICADA A:

Mi mamá, quien nunca dejó de creer en mí, por su apoyo y comprensión. No habría llegado hasta aquí de no ser por toda tu lucha, sos el motor de todos mis logros.

A mi papá, quien hizo posible que me formara para salir adelante. Sé que siempre estuviste presente, te llevo en el corazón siempre.

A mis hermanos Luis, Belén, Marcos Rafael y Alex, todos ustedes me ayudaron en la distancia y la hicieron llevadera. Los quiero!

A mi tía Eva, quien acompañó cada etapa de mi vida.

A los amigos que hice en mi corta pero entrañable estancia en Córdoba.

A Patty y Rafa, por todo el cariño, son como hermanos para mí.

A Marcos, tu apoyo y paciencia fueron cruciales en la última etapa que fue la más difícil. Te quiero.

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la
ciencia logra abrir”
Albert Einstein.*

*“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en
el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”
Teresa de Calcuta.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO	1
1.1 Envejecimiento y mecanismos asociados	2
1.2 Envejecimiento y alteraciones metabólicas asociadas	6
2. SÍNDROME METABÓLICO	8
2.1 Etiología y patogénesis	"9
2.2 Definición	"11
2.3 Epidemiología	"16
3. ESTRÉS OXIDATIVO Y TEJIDO ADIPOSO	18
3.1 Causas y procesos del estrés oxidativo	"18
3.2 Sistema de defensa antioxidante	21
3.2.1 Sistema antioxidante enzimático	23
3.2.2 Sistema antioxidante no enzimático	25
3.2.3 Sistema antioxidante exógeno	27
3.3 Tejido adiposo	"28
3.3.1 Generalidades del tejido adiposo blanco	29
3.3.2 Disfunción del tejido adiposo	35
3.3.3 Tejido adiposo e inflamación	36
3.3.4 Tejido adiposo y estrés oxidativo	38

3.3.5 Tejido adiposo y estrés de retículo endoplásmico	40
3.4 Resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares	41
3.5 Disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares	44
4. DIETA Y ESTADO POSTPRANDIAL	48
4.1 Lipemia postprandial	48
4.2 Dieta y estrés oxidativo postprandial	49
4.3 Dieta y Síndrome Metabólico	53
4.4 Dieta Mediterránea	56
4.5 Componentes minoritarios del aceite de oliva virgen	61
III. HIPÓTESIS	68
IV. OBJETIVOS	73
V. DISEÑO Y METODLOGÍA	76
VI. RESULTADOS	94
VII. DISCUSIÓN	127
VIII. CONCLUSIONES	150
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153
X. ANEXOS	181

ABREVIATURAS

ACV: Accidente cerebro-vascular

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGL: Ácidos grasos libres

AOV: Aceite de oliva virgen

ARE: Elemento de respuesta antioxidante

ATP III: Adult Treatment Panel III

ATF6: Activating transcription factor-6

BiP: Glucose regulated protein 78 kDa

CAT: Catalasa

CRP: Proteína C Reactiva

CNX: Calnexina

CRT: Calreticulina

CT: Colesterol total

DE: Disfunción endotelial

DM II: Diabetes mellitus tipo II

ECV: Enfermedades cardiovasculares

EDHF: Factor de hiperpolarización derivado del endotelio

EPCs: Células precursoras endoteliales

EO: Estrés oxidativo

EPIC: Estudios Prospectivos sobre Nutrición y Cáncer

GH: Hormona de crecimiento

GPx: Glutación peroxidasa

GST: Glutación transferasa

GSR: Glutación reductasa

GSSG: disulfuro de glutación

GSS: disulfuro sintetasa

GSH: Glutati3n reducido

HDL: Lipoprote3na de alta densidad

HTA: Hipertensi3n arterial

HUVEC: C3lulas endoteliales de vena umbilical humana

IMC: 3ndice de masa corporal

ICAM-1: Intracellular adhesi3n molecule 1

IDF: Federaci3n Nacional de Diabetes

IGF-1: Factor de crecimiento insul3nico tipo 1

IL-6: Interleuquina 6

IL1 β : Interleuquina β

IRE1: Inositol requiring protein 1

JNK-1: phospho c-jun NH-2 terminal kinase

LDL: Lipoprote3na de baja densidad

LPL: Lipoprote3na lipasa

MCP-1: Prote3na quimiot3ctica de monocitos 1

MUFA: 3cidos grasos monoinsaturados

NCEP: National Cholesterol Education Program

NO: 3xido n3trico

Nrf2: Factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2

NF- κ B: Factor nuclear de transcripci3n kappa B

OMS: Organizaci3n Mundial de la Salud

PA: Presi3n arterial

PAI-1: Inhibidor del activador del plasmin3geno-1

PDIA-3: Protein disulfide isomerase family A, member 3

PERK: Protein-kinase-like ER kinase

PUFA: 3cidos grasos poliinsaturados

RBP4: Prote3na unida a retinol

RE: Retículo endoplásmico
RI: Resistencia a la insulina
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SFA: Ácidos grasos saturados
SMet: Síndrome Metabólico
SOD: Superóxido dismutasa
TA: Tejido adiposo
TAB: Tejido adiposo blanco
TG: Triglicéridos
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TRL: Lipoproteína rica en triglicéridos
TrxR: Tiorredoxina reductasa
TXN: Tiorredoxina
UCP: Un-coupling Protein
UPR: Unfolded protein response
VCAM-1: Vascular cell adhesión molecule-1
VLDL: Lipoproteina de muy baja densidad

I. RESUMEN

Introducción: El envejecimiento de la población es un fenómeno mundial que se ha ido produciendo paulatina y progresivamente a lo largo de las últimas décadas. La teoría de los radicales libres señala al estrés oxidativo (EO) como el principal determinante en la biología del envejecimiento y sus patologías asociadas. Junto con el envejecimiento, se observa un progresivo aumento de los niveles de ROS y un progresivo descenso de las defensas antioxidantes. Además, el envejecimiento se asocia con un incremento en la prevalencia del Síndrome Metabólico (SMet) dadas las alteraciones metabólicas que se desarrollan en esta etapa de la vida. De hecho, ha sido propuesto que el EO sistémico es generado en tejido adiposo (TA) y no en otros órganos, de manera que este órgano podría estar involucrado en el aumento del EO en personas de edad avanzada y en el desarrollo de SMet por estas personas. Así pues, el TA se considera un órgano clave en el desarrollo del SMet en personas de edad avanzada ya que el EO que se produce localmente en este tejido, puede propagarse a nivel sistémico y afectar otros órganos como por ejemplo el endotelio vascular en donde las ROS liberadas por el TA ejercen efectos en el endotelio vascular y favorecer el desarrollo de arteriosclerosis y la progresión y ruptura de la placa arteriosclerótica con los consiguientes eventos cardiovasculares. Estudios previos han mostrado que la cantidad y la calidad de la grasa dietética pueden modular significativamente en el EO. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han evaluado el EO en estado de ayunas, pero las personas pasan la mayor parte del día en estado postprandial. En este sentido, se ha visto que una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) modula favorablemente los parámetros plasmáticos postprandiales de EO en comparación con una dieta rica en grasas saturadas (SFA) y que las dietas bajas en grasa tienen un efecto

intermedio en relación a las anteriores. Particularmente el aceite de oliva virgen (AOV), uno de los principales componentes de la dieta Mediterránea, cuyos efectos beneficiosos se atribuyen, al menos en parte, a sus componentes minoritarios como los compuestos fenólicos (CF), se consideran el componente clave de la dieta Mediterránea y sus beneficios para la salud.

Hipótesis: la ingesta de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen reduce el estrés oxidativo postprandial en tejido adiposo de personas de edad avanzada en comparación con una dieta occidental rica en grasas saturadas o una dieta baja en grasa, rica en hidratos de carbono y ácidos grasos omega n-3. Además, nos planteamos que el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen podría ser determinante en este proceso y tener efectos positivos sobre el endotelio vascular y su relación con el riesgo cardiovascular.

Objetivo principal: Evaluar el efecto de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre la expresión postprandial de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa 1 y 2, glutatión peroxidasa y tiorredoxina reductasa) en tejido adiposo de personas de edad avanzada comparado con el efecto de una dieta occidental rica en grasa saturada y una dieta baja en grasa, rica en hidratos de carbono y ácidos grasos PUFA n-3.

Objetivos secundarios:

1. Determinar el efecto de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre la expresión postprandial del complejo enzimático NADPH-oxidasa en tejido adiposo de personas de edad avanzada comparado con el efecto de una dieta occidental rica en grasa saturada y una dieta baja en grasa, rica en hidratos de carbono y ácidos grasos PUFA n-3.

2. Analizar el efecto de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre el estado oxidativo evaluado por la concentración plasmática de glutatión reducido (GSH) y total, así como por el nivel de lipoperóxidos e isoprostanos en orina de personas de edad avanzada.
3. Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos biodisponibles del aceite de oliva virgen presentes en suero humano sobre el endotelio vascular y su relación con las enfermedades cardiovasculares.

Población, diseño y metodología: Veinte personas de edad avanzada recibieron 3 tipos de dieta de forma aleatoria y cruzada durante 4 semanas cada una: **A)** dieta Med, rica en grasas monoinsaturadas con 38% de energía a expensas de grasa (de las cuales 24% MUFA); **B)** dieta SAT, rica en grasas saturadas con 38% de energía a expensas de grasa (de las cuales 22% SAT) y **C)** dieta CHO-PUFA rica en hidratos de carbono, baja en grasa, suplementada con PUFA n-3 de origen vegetal y 30% de energía a expensas de grasa (de las cuales 8% PUFA). Al término de cada periodo de intervención dietética y tras 12 h de ayuno, los voluntarios recibieron una sobrecarga grasa en forma de desayuno con la misma composición que la dieta que habían seguido durante las 4 semanas previas. Tras la ingesta, se realizaron extracciones sanguíneas a las 2 y a las 4 h y se obtuvieron muestras de TA a las 4 h tras la administración del desayuno. Se determinó la expresión génica en TA subcutáneo de las subunidades de la NADPH-oxidasa (*gp91^{phox}*, *p22^{phox}*, *p67^{phox}*, *p47^{phox}* y *p40^{phox}*) y de los genes implicados en la defensa antioxidante (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx3*, *GPx4*, *GSR*, *TXN* y *TXNRD1*) mediante PCR a Tiempo Real. Teniendo en cuenta que el aceite de oliva virgen es el componente principal de la dieta Mediterránea y con el fin de evaluar los efectos de los compuestos fenólicos biodisponibles del mismo en el

endotelio vascular, hemos incluido en el presente trabajo el estudio de cultivos realizados con una línea estable de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con suero provenientes de pacientes con diagnóstico de SMet a los que se les administró previamente dos desayunos; uno preparado con AOV con alto contenido en CF (398 ppm) y otro preparado con AOV con bajo contenido en CF (70 ppm), y se estudio la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo mediante PCR a Tiempo Real..

Resultados: Nuestro estudio mostró que el consumo de la dieta Med indujo mayores niveles postprandiales del ARNm de SOD2 que el consumo de la dieta SAT ($p=0,016$), así como mayores niveles postprandiales del ARNm de *GPx3* que el consumo de la dieta CHO-PUFA ($p=0,001$). Por otra parte, también observamos que los niveles postprandiales del ARNm de *GPx1* fueron más altos tras el consumo de la dieta CHO-PUFA que tras el consumo de la dieta SAT ($p=0,048$). Además, observaron mayores niveles de ARNm de *TrxR* tras el consumo de la dieta Med y de la dieta CHO-PUFA en comparación al consumo de la dieta SAT ($p<0,001$ para ambas). Además, el consumo de las dietas Med y CHO-PUFA indujo un incremento postprandial significativo en la concentración plasmática de la GSH ($p=0,005$ entre valores a las 2 y 4 h tras la ingesta de las comidas respecto al estado de ayuno) y un incremento postprandial del ratio GSH/GSSG a las 4 h tras la ingesta de las comidas en comparación al ratio obtenido a las 2 h tras la ingesta ($p=0,025$ y $p=0,010$ respectivamente). Por otra parte, el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido 2 h tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en CF disminuyó la expresión génica de la p65 y de la MCP-1 ($p<0,001$ y $p=0,002$, respectivamente) y aumentó la

expresión génica de la MT-CYB, SDHA y SOD1 ($p=0,004$, $p=0,012$ y $p=0,001$, respectivamente) en comparación con el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido 2 h tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en CF. Además, el tratamiento con el suero obtenido 4 h tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en CF disminuyó la expresión génica de MCP-1 y de CAT ($p<0,001$ y $p=0,003$, respectivamente) y aumentó la expresión génica de MT-CYB ($p <0,001$) en comparación con el tratamiento con el suero obtenido 4 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en CF.

Conclusión principal: Nuestros resultados muestran una reducción del estrés oxidativo postprandial en personas de edad avanzada tras el consumo de la dietas Mediterránea (Med) y alta en hidratos de carbono, baja en grasa, enriquecida con omega 3 (CHO-PUFA) en comparación con el consumo de una dieta rica en grasas saturadas (SFA) que se ve reflejada en los mayores niveles de expresión postprandial del sistema de defensa antioxidante en tejido adiposo tras el consumo de la dietas Med y CHO-PUFA en comparación con el consumo de una dieta rica en SFA.

Conclusiones secundarias:

1. La expresión génica de las subunidades del complejo enzimático NADPH-oxidada no sigue un patrón definido en bloque en respuesta a ninguno de los tres modelos dietéticos en el tejido adiposo de personas de edad avanzada.
2. El consumo de la dieta Med rica en aceite de oliva virgen ejerce un efecto adicional a la dieta CHO-PUFA ya que induce menores niveles plasmáticos de lipoperóxidos e isoprostanos en orina

3. Nuestros resultados muestran que el consumo de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos reduce la expresión de genes inflamatorios y mejora el perfil antioxidante del endotelio vascular.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento es un proceso de carácter universal, multifactorial e inevitable [2]. El ciclo de vida de los organismos multicelulares que comprende las etapas iniciales de la ontogenia, la embriogénesis, el crecimiento y la maduración reproductiva, procesos en los cuales el desarrollo del organismo alcanza un pico máximo, son seguidos por una fase de disminución de la capacidad funcional de los diversos sistemas biológicos que finalmente termina en la muerte del organismo. A este deterioro en la fase post reproductiva se le conoce como "proceso de envejecimiento"[3].

La esperanza de vida humana ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a las mejoras en la higiene y en el cuidado de la salud y en consecuencia la proporción de personas de edad avanzada crece constantemente. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 1999 el 10% de la población mundial tenía más de 60 años de edad y para el 2050 estima que este porcentaje aumentará un 20%, lo que correspondería a 2 billones de personas en todo el mundo. Siendo más acentuado el envejecimiento en los países desarrollados, Europa y Japón ya cuentan con el 20% de su población envejecida [4].

La OMS considera personas de edad avanzada a aquellas con una edad cronológica superior a 65 años para las que residen en países desarrollados y superior a 60 años para las que residen en países en vías de desarrollo [5]. La edad cronológica es muy útil para realizar clasificaciones y en estudios epidemiológicos pero no es capaz por sí sola de reflejar la capacidad física y las alteraciones biológicas que

comprenden el envejecimiento y para explicarlo se han propuesto varias teorías.

Una de ellas, descrita por Hayflick, sugiere que el envejecimiento está programado en el interior de las células dado que las mismas se dividen un número determinado de veces hasta morir [6]. Por el contrario, Harman define al envejecimiento como la acumulación progresiva de cambios perjudiciales en las células y tejidos, procesos que en la edad avanzada aumentan el riesgo de enfermedad y muerte. Posteriormente en los años 50 postuló "la teoría de los radicales libres" que sugiere que el daño celular producido por radicales libres es el mayor determinante de la esperanza de vida. Esta teoría supone que los blancos de los radicales libres son aleatorios, indiscriminados y acumulativos. No obstante, se ha demostrado que los radicales libres también actúan como moléculas de señalización en condiciones fisiológicas [7, 8].

Independientemente de la etiología del envejecimiento, este proceso comparte el mismo desenlace que la enfermedad, alteración de las funciones biológicas normales, por lo que es de esperarse que la disfunción de los tejidos resulte del envejecimiento normal y que se manifieste como enfermedad a largo plazo [9].

A pesar de que el aumento de la esperanza de vida se considera como un éxito de las políticas de salud pública y socioeconómicas, es necesario el estudio en profundidad de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al envejecimiento, ya que una población envejecida requiere de servicios sanitarios sostenidos y adecuados a su condición [10].

1.1 Envejecimiento y mecanismos asociados

El envejecimiento es considerado en la actualidad como un factor de riesgo emergente para la mayoría de las enfermedades crónico-

metabólicas en países desarrollados (como arteriosclerosis, Diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares) las cuales son consecuencia de la interacción entre el desgaste de las funciones normales de los distintos sistemas que componen el organismo y los factores ambientales externos que contribuyen a su desarrollo [11].

Varios son los mecanismos que se proponen para explicar estos procesos:

- **Senescencia celular.** Propone al envejecimiento como un proceso cooperador en la progresión de la arteriosclerosis a través de la senescencia celular, en donde las células senescentes (células envejecidas) liberan citoquinas que amplifican el medio pro-aterogénico creado por macrófagos infiltrados en el espacio vascular sub-endotelial [12].

En modelos animales de obesidad se ha observado que en presencia de diabetes mellitus tipo II (DM II) se induce la activación de marcadores de senescencia como la SA- β -Gal, p53 y p21 junto con la regulación positiva de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la MCP-1. De hecho, tanto en ratones como en humanos, se ha descubierto que los componentes pro-inflamatorios producidos por células senescentes del tejido adiposo (TA) se asocian con la presencia de DM II. Igualmente, se han mostrado los beneficios de la terapia focalizada en estas células a través de la inhibición de la senescencia mediada por p53 en pacientes pre-diabéticos que incluyen la disminución de los niveles de mediadores inflamatorios producidos en TA y mejora significativa de la resistencia a la insulina (RI), por lo tanto menor riesgo de desarrollar DM II [12, 13].

- **Telómeros y aterosclerosis.** Los telómeros son los extremos de los cromosomas y son considerados relojes o temporizadores de la célula, ya que marcan el número de divisiones celulares hasta que muere. De

hecho, se cree que el acortamiento de telómeros es el mecanismo biológico que desencadena el envejecimiento celular a través de la senescencia celular y la apoptosis que están mediadas principalmente por la vía de control celular regulada por p53/p21 [14]. El acortamiento de los telómeros es el responsable en parte del envejecimiento fisiológico y está relacionado con procesos como la senescencia de células endoteliales con placas ateroscleróticas del endotelio o en la senescencia de células beta del páncreas en presencia de DM II [14, 15].

La longitud de los telómeros no solo está determinada por la replicación celular sino que también está influida por la herencia y la exposición a factores ambientales. Así, factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, la RI y la DM II además, se asocian con un acortamiento acelerado de telómeros. Un índice de masa corporal (IMC) elevado y la obesidad de tipo visceral se relacionan directamente con la disminución de la longitud de los telómeros. Además, se ha descrito que el exceso de grasa que aparece en condiciones de obesidad es responsable de la generación de estrés oxidativo (EO) [1], proceso que también contribuye al acortamiento de los telómeros, por lo que la obesidad podría acelerar el inicio de los procesos de envejecimiento [16].

Por lo tanto, la longitud de los telómeros puede proporcionar información de la influencia combinada de la genética, del medio ambiente y del envejecimiento como un predictor de riesgo e identificador de individuos propensos a desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV) [17].

- **Envejecimiento vascular.** Datos clínicos han demostrado que el envejecimiento se asocia con alteraciones de las propiedades estructurales y funcionales de las grandes arterias y se consideran en conjunto como un

proceso normal e inevitable que se desarrolla gradualmente. Las paredes arteriales se componen de la íntima (formada por células endoteliales y lámina elástica) y de la media (formada por células musculares lisas y tejido conectivo elástico). Los cambios más consistentes que ocurren en respuesta a la adaptación que sufren las células arteriales son el engrosamiento luminal (dilatación), engrosamiento de la pared (remodelado) y reducción de la capacidad elástica [18].

El remodelado arterial ocurre de manera independiente a la presión arterial y la expansión del lumen no se relaciona estrictamente con el aumento de la presión arterial relacionada a la edad [19]. Por otra parte, el engrosamiento de la pared vascular es el resultado de la hipertrofia de las células musculares lisas y la alteración de la síntesis de colágeno y la elastina, que son proteínas implicadas en la estabilidad de la pared vascular [20].

Las células endoteliales desempeñan un papel clave en la regulación de las propiedades arteriales, que incluyen el tono vascular, la permeabilidad vascular, la respuesta a la inflamación y la angiogénesis. El endotelio es importante para la adaptación vascular normal a los cambios en el flujo sanguíneo y la presión arterial y la disfunción del mismo es una característica del envejecimiento vascular, cuya capacidad regenerativa disminuye con la edad [21]. En las arterias jóvenes, cualquier proceso patológico inicia procesos de reparación endotelial (proliferación y diferenciación de células precursoras endoteliales (EPCs), seguidos de proliferación y migración de células endoteliales). En contraste, en las arterias envejecidas se encuentra alterado el proceso de reparación endotelial y se conoce bajo el término de senescencia endotelial, que se correlaciona inversamente con el acortamiento de telómeros de las EPCs,

células que son las encargadas de la re-endotelización y neovascularización en los sitios donde hay daño endotelial [18].

1.2 Envejecimiento y alteraciones metabólicas asociadas

Sin duda, el envejecimiento es el contribuyente universal en la etiología del desgaste metabólico y las enfermedades asociadas. Cabe resaltar que en el proceso de envejecimiento confluyen dos mecanismos de opuesta dirección: el envejecimiento intrínseco y su regulación. Lo primero representa la involución (por agotamiento o desgaste) del programa previamente establecido y la regulación comprende un cúmulo de procesos genéticamente establecidos para la conservación del individuo y así asegurar su supervivencia [11].

Teniendo en cuenta estas consideraciones parece lógico que los parámetros que normalmente muestran un comportamiento ascendente a medida que avanza la edad sean la expresión de los mecanismos reguladores del envejecimiento (colesterinemia, niveles de LDL-colesterol, marcadores de colagenización o reparación, masa grasa corporal, secreción de insulina). Por el contrario, aquellos que descienden con la edad del adulto, como los parámetros de secreción hormonal y de síntesis proteica, son manifestaciones del envejecimiento intrínseco [11].

Las características metabólicas del envejecimiento incluyen: RI, cambios en la composición corporal, descenso en la producción de la hormona de crecimiento (GH), del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) y de las hormonas sexuales, así como gluconeogénesis alterada en hígado, lipogénesis aumentada en tejido adiposo y síntesis y captación de glucosa alteradas en músculo esquelético [11].

Cambios en la composición corporal. Entre la tercera y séptima década de vida la masa adiposa global tiende a aumentar. A medida que

aumenta la edad, la grasa subcutánea disminuye mientras que la visceral aumenta. Ésta última tiene una fuerte asociación con la RI y con el desarrollo de la DM II y en estudios prospectivos se ha visto que es un factor de riesgo para enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular (ACV) y muerte [22, 23]. Otro cambio fenotípico característico del envejecimiento es la sarcopenia. La pérdida de músculo esquelético se relaciona con la reducción del gasto energético y la RI, ésta última a su vez contribuye con la pérdida de cantidad y calidad del músculo, además de relacionarse con la fuerza muscular reducida y reducción de la tasa de síntesis proteica. Por lo tanto, la RI puede considerarse como consecuencia y causa de la sarcopenia, colocándola en un círculo vicioso de pérdida de músculo y disfunción metabólica [24].

Disfunción mitocondrial. El envejecimiento se asocia con la disminución de la función mitocondrial en varios tejidos, incluyendo el músculo esquelético. Cómo la función mitocondrial alterada puede incidir en la señalización de la insulina y por ende en la homeostasis de la glucosa es complejo, pero se cree que es a través de una reducción o una incompleta β -oxidación de los sustratos de ácidos grasos en los tejidos con mayor actividad metabólica. En personas de edad avanzada la actividad oxidativa mitocondrial está disminuida, lo cual se asocia con RI e intolerancia a la glucosa [25, 26].

Disminución de la función endócrina. La secreción de la GH disminuye notablemente con la edad, lo que resulta en una disminución concomitante de la concentración de IGF-1. Los bajos niveles periféricos de IGF-1 se asocian con un aumento en el riesgo para numerosas condiciones que incluyen DM II, ECV, sarcopenia y osteoporosis. Este fenómeno se ajusta a la hipótesis de pleiotropía antagónica, que sugiere

que algunas vías que son evolutivamente favorables para el desarrollo y la reproducción, se convierten en perjudiciales con el envejecimiento ya que niveles elevados y sostenidos de la GH a lo largo de la vida incrementa el riesgo de algunos cánceres, razón por la que existen aún muchas controversias en cuanto a las terapias anti-edad utilizando estas hormonas [27].

Desde un punto de vista epidemiológico, parece claro que el Síndrome Metabólico (SMet) es una entidad que aparece principalmente a partir de los 60 años de edad y su prevalencia muestra un incremento en la curva empezando en la edad adulta. Este fenómeno se explica en base a los cambios fisiopatológicos que se desarrollan durante esta etapa de los cuales el estrés oxidativo (EO) es uno de los más estudiados y que además se ha propuesto como responsable del desarrollo de este síndrome [28, 29].

2. SÍNDROME METABÓLICO

El síndrome metabólico es una condición que se asocia con el incremento de riesgo de ECV y de desarrollar DM II, lo que a su vez supone un elevado riesgo de ECV. Sus características clínicas reflejan la complejidad de este síndrome, el cual incluye varias rutas metabólicas alteradas y múltiples blancos genéticos con las consecuentes alteraciones metabólicas y vasculares [30]. Los factores que lo componen son la obesidad abdominal, resistencia a insulina, dislipemia aterogénica (niveles elevados de triglicéridos y bajos niveles de HDL-colesterol) e hipertensión, los cuales, aunque suponen factores de riesgo de forma independiente, tienen mayor impacto en conjunto [31].

2.1. Etiología y patogénesis

El SMet aparece como consecuencia de la constelación de varios factores de riesgo por lo que se hace difícil determinar una única causa. Aunque la etiología del SMet no se ha definido aún, la obesidad y la RI parecen ser los principales factores etiológicos del mismo, a los que le siguen otros factores de carácter genético, metabólico y ambiental [32].

Obesidad abdominal. La fuerte conexión entre la obesidad (especialmente la abdominal) llevó a la ATP III a definir al SMet esencialmente como una agrupación de complicaciones metabólicas de la obesidad. El aumento de la prevalencia de la obesidad se relaciona con el aumento de la tasa de prevalencia del SMet [33, 34]. La obesidad abdominal generalmente precede a la RI previa al desarrollo de DM II por lo que la evidencia emergente subraya la importancia del aumento del depósito de grasa como determinante de la RI [35]. En personas obesas aumenta la producción de citoquinas inflamatorias que interfieren con la acción de la insulina y también la síntesis de la Proteína C Reactiva (CRP), fibrinógeno en el hígado y la activación de macrófagos en placas ateromatosas. Además, la síntesis en adipocitos del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) es más alta y junto con altos niveles de fibrinógeno contribuye al estado pro-trombótico que es más evidente aún en presencia de obesidad abdominal [32]. Por otro lado, la adiponectina, hormona producida por los adipocitos y que tiene propiedades antiinflamatorias/antiateroscleróticas, se encuentra reducida en la obesidad [36]. La obesidad contempla además otros trastornos metabólicos que llevan a la manifestación del SMet los cuales se detallarán en capítulos posteriores.

Resistencia a la insulina. Algunos investigadores dan prioridad a la RI sobre la obesidad en la patogénesis del SMet argumentando que junto con su cómplice, la hiperinsulinemia, causa directamente otros factores de riesgo metabólicos. Dado que la RI está vinculada a la obesidad, es difícil disociar estos trastornos e identificar un papel único de la RI [37]. Aun así, cabe destacar que la RI *per se* constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de DM II y su contribución al SMet reside principalmente en procesos fisiopatológicos como los que se producen en el músculo insulino-resistente que se sobrecarga de lípidos provenientes de los niveles elevados de ácidos grasos no esterificados en plasma, que a su vez promueve el hígado graso y la dislipemia aterogénica ya que la hiperinsulinemia concomitante incrementa los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) [32].

Dislipemia aterogénica. Se caracteriza por la elevación de TG y la disminución de HDL-colesterol en plasma. Además, se presentan anormalidades en otras lipoproteínas como los remanentes de quilomicrones, elevadas concentraciones de apolipoproteína B y partículas pequeñas de HDL-colesterol, las cuales tienen efectos aterogénicos independientes entre sí [32].

Tensión arterial elevada. La obesidad se asocia fuertemente con la tensión arterial elevada y ocurre comúnmente en personas resistentes a la insulina. Por esta razón la hipertensión forma parte de los factores definitorios del SMet. Sin embargo, algunos investigadores consideran que esta alteración es menos metabólica que los otros componentes del síndrome ya que la misma tiene origen multifactorial. Por ejemplo, el incremento de la rigidez arterial contribuye significativamente al aumento de la tensión sistólica en personas de edad avanzada. Aun así, por

consenso general se incluye a la hipertensión como componente del SMet dado que es una manifestación frecuente en estos pacientes [32].

Otros factores. Como hemos dicho anteriormente, las características que definen el envejecimiento son también comunes al SMet, por lo tanto se considera a la edad avanzada un factor que contribuye al desarrollo de este síndrome ya que afecta a todos los niveles de su patogénesis [28]. Por otro lado, si bien el estado pro-inflamatorio es una característica del SMet algunos lo consideran causa indirecta del mismo por su implicancia en el desarrollo de RI, así como otros factores de carácter endócrino vinculados con anomalías en la distribución de grasa corporal [32].

2.2 Definición

La primera definición formal del SMet fué propuesta en 1998 por la OMS. Esta definición hace hincapié en la RI como el principal factor subyacente y la necesidad de evidencia de la misma para el diagnóstico y además incluye a pacientes con DM II. El diagnóstico del SMet según la OMS podría hacerse entonces en base a varios marcadores de RI y al menos 2 de los 4 factores (hipertensión, dislipemia, obesidad y microalbuminuria) (**Tabla 1**). La definición de obesidad que utiliza este criterio se basa en el índice de masa corporal (IMC) o la relación cintura/cadera [38].

Tabla 1. Definición del Síndrome Metabólico según la OMS*.

Resistencia a la insulina, identificada por:

- Diabetes tipo II
- Glucosa en ayunas alterada
- Intolerancia a la glucosa
- Índice de resistencia a la insulina (HOMA)

Y al menos 2 de los siguientes criterios:

- IMC >30 kg/m² y/o relación cintura/cadera $>0,90$ en hombres y $>0,85$ en mujeres
- Triglicéridos en plasma ≥ 150 mg/dL ($\geq 1,7$ mmol/L)
- HDL-colesterol <35 mg/dL (0,9 mmol/L) en hombres y <39 mg/dL (1,0 mmol/L) en mujeres
- Medicación anti-hipertensiva y/o presión arterial $\geq 140/90$ mmHg
- Ritmo de excreción urinaria de albúmina >20 μ g/min

*Adaptada de Alberti *et al* [38].

Los criterios definitorios de la OMS para el SMet presentan algunos puntos débiles. Por ejemplo, el IMC no es una medida fiable de obesidad en personas de edad avanzada debido a los cambios en el peso corporal con el avance de la edad y por la diferencia en la distribución de masa grasa y masa magra en comparación con los adultos jóvenes. Además, se ha demostrado que en cualquier valor para el IMC los sujetos con valores más altos para la circunferencia de cintura tienen peor perfil de riesgo que aquellos con el mismo IMC pero con una medida menor de la circunferencia de cintura debido a una mayor cantidad de tejido adiposo en el tronco, lo que sitúa a la obesidad central como el factor determinante del SMet [39], por lo tanto el IMC no predice el riesgo de alteraciones metabólicas equitativamente. Por otra parte, la frecuencia de microalbuminuria en individuos no diabéticos es baja, por lo que este criterio es relevante solo en presencia de diabetes [40].

En el 2001, el Tercer Reporte del Panel de Expertos del *National Cholesterol Education Program* de los Estados Unidos (NCEP) y Tratamiento del Colesterol Sanguíneo Elevado en Adultos (ATP III – *Adult Treatment Panel III*), propone una serie de criterios similares a los de la OMS, excepto por el hecho de que el componente clave es la obesidad visceral en lugar de la RI. El ATP III no encontró suficiente evidencia para recomendar la medida rutinaria de la sensibilidad a la insulina o la determinación de la tolerancia a la glucosa, pero incluyó la determinación de glucosa plasmática en ayunas [41].

Esta definición requiere al menos tres de los siguientes factores: circunferencia de cintura elevada, hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL-colesterol, hipertensión y glucosa en ayunas elevada (**Tabla 2**).

Tabla 2. Definición del Síndrome Metabólico según la ATP III *

Circunferencia de cintura

Hombres >102 cm

Mujeres >88 cm

Triglicéridos ≥ 150 mg/dL

HDL-colesterol

Hombres <40 mg/dL

Mujeres <50 mg/dL

Presión arterial $\geq 130/\geq 85$ mm Hg

Glucosa en ayunas ≥ 100 mg/Dl

* Adaptada de Grundy *et al* [32].

Además de estos criterios, la ATP III reconoce otros factores denominados “emergentes”, como el estado pro-inflamatorio y el pro-trombótico que aparecen asociados a este síndrome [32].

El estado pro-inflamatorio se identifica clínicamente por elevación plasmática de CRP que presentan los pacientes con diagnóstico de SMet. Son múltiples los mecanismos que subyacen a la elevación de la CRP y una de las causas es la obesidad, situación en la que el exceso de tejido adiposo libera citoquinas pro-inflamatorias que parecen inducir los altos niveles de la CRP [32].

El estado pro-trombótico está caracterizado por el incremento en plasma de PAI-1 y de fibrinógeno. El fibrinógeno, una molécula de fase aguda como la CRP, aumenta en respuesta a las altas concentraciones de citoquinas, por lo que el estado pro-inflamatorio y el pro-trombótico parecen estar interconectados metabólicamente [32].

Una característica común de las definiciones de la OMS y del ATP III es el hecho de que incluyen personas diabéticas y en general, varios estudios han demostrado que ambas definiciones identifican individuos con SMet con gran similitud [32, 42].

Ante la controversia existente entre las definiciones del SMet de las que se dispone y la necesidad de una sola definición global, llegó la iniciativa de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), la Asociación Americana del Corazón y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre (AHA/NHLBI) junto con la Federación Mundial del Corazón, la Sociedad Internacional de Aterosclerosis y la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad, de desarrollar una definición unificada (**Tabla 3**) [43]. Ambas partes acordaron que la obesidad abdominal no debe ser un requisito previo para el diagnóstico pero es uno de los 5

criterios, de modo que la presencia de 3 de los 5 factores de riesgo constituye un diagnóstico de SMet [42, 43].

.Tabla 3. Definición del Síndrome Metabólico según IDF y AHA/NHLBI

Circunferencia de cintura

-Definición específica por población y país.

Triglicéridos elevados (tratamiento farmacológico es un indicador alternativo) ≥ 150 mg/dL

HDL-colesterol disminuido (tratamiento farmacológico es un indicador alternativo)

-**Hombres** < 40 mg/dL

-**Mujeres** < 50 mg/dL

Presión arterial elevada (tratamiento farmacológico antihipertensivo es un indicador alternativo) $\geq 130/\geq 85$ mm Hg

Glucosa en ayunas elevada (tratamiento farmacológico es un indicador alternativo) ≥ 100 mg/dL

*Adaptada de Eckel, Alberti y Grundy [43].

2.3 Epidemiología

El SMet es un problema de salud que está estrechamente relacionado al estilo de vida occidental y que se ha extendido a países en vías de desarrollo debido a la globalización de la economía. Por esta razón, la alta prevalencia del SMet es un fenómeno mundial. Esta prevalencia parece aumentar en paralelo al aumento de la prevalencia de la obesidad por lo que la probabilidad de un aumento adicional en el SMet se puede anticipar por las estimaciones de una mayor prevalencia de la obesidad en el futuro [44].

Entre los estadounidenses de ≥ 20 años, el 25,2% de los hombres y el 29% de las mujeres tienen SMet según lo define la ATP III. Estos resultados son difíciles de comparar con los de estudios procedentes de países europeos debido a las diferencias metodológicas [44]. En Europa la

prevalencia es del 7 al 36% en los hombres de 40 a 55 años y del 5 al 22% en las mujeres de la misma edad de acuerdo con la definición de la OMS. En España el 22,3 al 27,7% de hombres de 35 a 64 años y el 30,7 al 33,6% de las mujeres con la misma edad padece de SMet según la definición de la ATP III y de la IDF [45].

El SMet es un problema de salud pública importante tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo que se manifiesta en hombres, mujeres y niños. Además, pone de manifiesto la importancia de los hábitos relacionados con el estilo de vida y de la necesidad de establecer normativas de salud pública y sugerencias para la práctica clínica.

3. ESTRÉS OXIDATIVO Y TEJIDO ADIPOSO

3.1 Causas y proceso del estrés oxidativo

Para mantener las funciones celulares esenciales en condiciones fisiológicas, el ser humano mantiene un delicado equilibrio entre las sustancias pro-oxidantes y anti-oxidantes que produce. Este balance se sustenta a través de la denominada homeostasis de reducción/oxidación (redox). Para ello se generan especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species* - ROS) y especies reactivas de nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species* - RNS) que a través de la señalización vía redox y a bajos niveles cumplen funciones de diferenciación celular, proliferación, apoptosis, inmunidad, defensa contra microorganismos, regulación del crecimiento, remodelado vascular y transcripción de enzimas antioxidantes [46-48].

El término ROS comprende una variedad de derivados del metabolismo del oxígeno producidos en todos los sistemas biológicos y que son altamente reactivos con otras biomoléculas, e incluyen al anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que son extremadamente inestables, y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que tiene más estabilidad pues no presenta electrones desapareados como las anteriores, y puede difundir libremente a través de las membranas. Estas especies se generan a partir de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y por otras vías que incluyen la explosión oxidativa (del inglés *oxidative burst*) que tiene lugar durante la fagocitosis y como subproductos de varias enzimas, incluidas las del complejo enzimático NADPH-oxidasa, la xantina oxidasa (XO), la óxido-nítrico sintasa (NOS), lipoxigenasa, ciclooxigenasa y hemo-oxigenasa [49, 50].

El óxido nítrico (NO) también es considerado como un radical libre que se incluye dentro de las ROS [51]. Su función principal es la de actuar como vasodilatador a bajos niveles, pero puede verse contrarrestada cuando aumenta su producción e interacciona con el $\cdot\text{O}_2^-$ originando peroxinitrito (ONOO^-), que a su vez puede interactuar con otras moléculas para formar dióxido de nitrógeno (NO_2) y trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), que forman el grupo de las RNS [52].

Aunque años atrás, las ROS eran consideradas perjudiciales para las células, hoy en día se sabe que su función principal es la regulación de procesos redox celulares críticos. Independientemente del origen de las ROS, su incremento intracelular puede tener dos efectos; activación de rutas específicas de señalización para modular procesos celulares y daño a componentes celulares que si persiste puede conducir a muerte celular [53].

Cuando se rompe el equilibrio por una producción incrementada de estas especies y/o por una disminución de las defensas antioxidantes se desencadena el proceso que se conoce como "estrés oxidativo" (EO) [54].

Una de las principales fuentes de ROS es el complejo enzimático NADPH-oxidasa, que fue descrito por primera vez en neutrófilos [55]. Este complejo está presente en células musculares lisas, fibroblastos, monocitos/macrófagos y en TA [1]. Se compone de un complejo citosólico (p47^{phox} , p67^{phox} , p40^{phox} y Rac 1/2) y del flavocitocromo b558 compuesto a la vez por dos subunidades ($\text{gp91}^{\text{phox}}$ y la p22^{phox}). Su función principal es la de catalizar la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el oxígeno con la consecuente formación del radical $\cdot\text{O}_2^-$ el cual rápidamente es convertido a H_2O_2 y $\cdot\text{OH}$ [56]. Esto ocurre cuando la subunidad p47^{phox} se fosforila y las subunidades citosólicas migran hacia

la membrana donde se unen al citocromo *b588* para empezar la oxidación y una vez generado el superóxido, éste es transportado al interior de la célula mediante la proteína gp91^{phox} que actúa como chaperona [57].

En células fagocíticas, el $\cdot\text{O}_2^-$ generado a través de la NADPH-oxidasa se utiliza para eliminar patógenos invasores [55], en cambio en células endoteliales el $\cdot\text{O}_2^-$ participa en rutas de señalización redox que además puede interactuar con el NO dando lugar a la formación de ONOO⁻ el cual está implicado en la disfunción endotelial [58].

Por otra parte, recientemente se ha demostrado que en TA la NADPH-oxidasa incrementa su actividad cuando existe un exceso de grasa, es decir, en presencia de obesidad especialmente de tipo central. El gran aumento de la actividad de este complejo en TA tiene carácter patológico y se considera como uno de los procesos fisiopatológicos clave en el desarrollo de enfermedades metabólicas como por ejemplo el SMet, DM II y ECV [1].

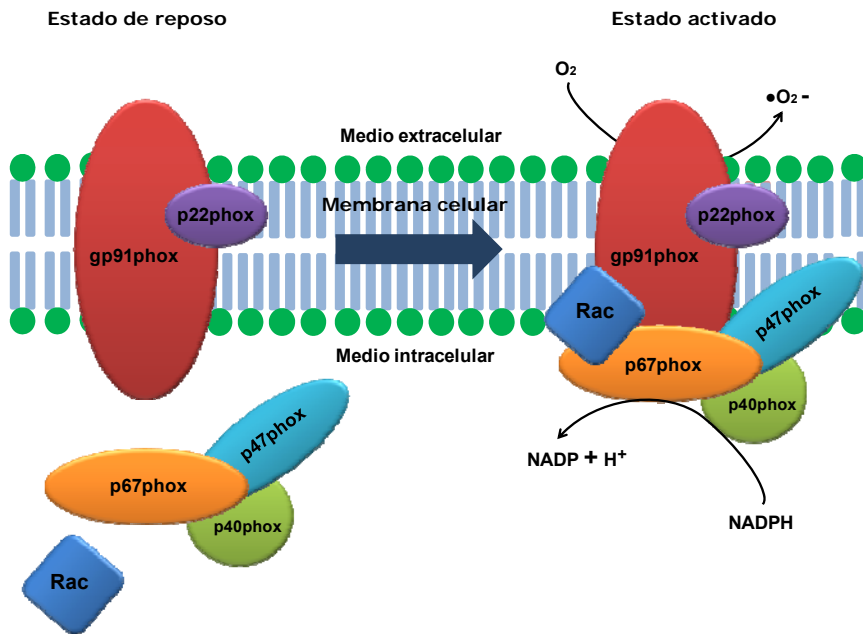


Figura 1. Esquema del complejo enzimático NADPH oxidasa. Imagen modificada de Babior, B.M [55].

3.2 Sistema de defensa antioxidante

Como consecuencia del EO se produce la modificación, alteración y daño de proteínas celulares, lípidos, carbohidratos y ADN, lo que puede conducir finalmente a muerte celular apoptótica-necrótica. La magnitud de estos procesos depende del grado de EO al que están sometidas las células, que se establece según el balance entre la producción de ROS y los mecanismos de detoxificación [59].

Para contrarrestar la excesiva producción de agentes oxidantes, el organismo posee sistemas de protección y mecanismos para luchar contra sus efectos tóxicos. Tales sistemas funcionan a tres niveles:

1) Sistemas que previenen la formación de radicales libres, como los inhibidores de enzimas que catalizan la formación de los mismos;

2) Cuando estos sistemas de protección primaria son insuficientes y los agentes oxidantes ya están formados, se activan moléculas que los captan y eliminan su alta reactividad y se las denomina antioxidantes, cuyo objetivo principal es prevenir la oxidación de importantes moléculas biológicas y

3) Cuando los sistemas de defensa antioxidantes no son suficientes y se produce daño oxidativo, se ponen en marcha mecanismos de reparación que reconocen las moléculas deterioradas y las reparan o reciclan, como en el caso de las proteínas y lípidos modificados por oxidación y ADN modificado [60].

Los antioxidantes pueden ser de origen endógeno, regulados a nivel transcripcional mediante rutas de señalización que luego se traducen en la expresión de genes de enzimas o proteínas implicadas en la detoxificación, o de origen exógeno provistos por la dieta que actúan sinérgicamente para neutralizar los radicales libres [61].

El sistema antioxidante endógeno puede ser:

a) *enzimático*: incluye las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reductasa (GSR) y glutatión sintetasa (GSS), tiorredoxina (Txn) y

b) *no enzimático*: incluye el ácido úrico, el ácido lipoico, ubiquinol, el glutatión reducido (GSH) y la albúmina [60].

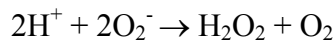
La respuesta antioxidante se desencadena cuando las ROS activan la transcripción de genes de dos formas. Una es a través del factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado al factor nuclear eritroide-2) que se encuentra en el citoplasma de la célula formando un complejo con la proteína represora-1 asociada a ECH (Keap1) y que actúa como sensor

redox y al oxidarse, cambie de conformación y libera a Nrf2, el cual se trasloca al núcleo donde se une a la secuencia promotora denominada Elemento de Respuesta Antioxidante (ARE) e induce la expresión de los genes de enzimas antioxidantes [62, 63]. Otra de las vías de la puesta en marcha de la respuesta antioxidante es la activación de la cascada de las MAP kinasas, que son proteínas citoplasmáticas que participan en la transducción de señales desde la superficie al interior de la célula [64].

3.2.1 Sistema antioxidante enzimático

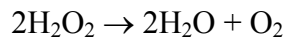
Constituye la primera y mejor línea de defensa y elimina las ROS a través de enzimas que trabajan en cadena para desactivarlas selectivamente.

- **Superóxido dismutasa (SOD):** cataliza la dismutación del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno según la siguiente reacción:



La SOD presenta 3 isoformas con distintas localizaciones subcelulares: SOD1 que se encuentra en el citoplasma y utiliza cobre (Cu) o zinc (Zn) como cofactores, la SOD2 en las mitocondrias que utiliza manganeso (Mn) como cofactor y la SOD3 que se encuentra en el líquido extracelular y también utiliza Cu o Zn como cofactores [65-67]. El H_2O_2 producido por estas y otras enzimas, a diferencia del $\cdot\text{O}_2^-$ que permanece en su sitio de producción, se difunde libremente a través del citoplasma y membranas celulares y puede convertirse en el altamente reactivo $\cdot\text{OH}$ en presencia de metales de transición reducidos [68], razón por la que las células ponen en marcha otros sistemas enzimáticos dentro de la cadena de detoxificación de radicales libres para evitar este proceso.

- **Catalasa (CAT):** es una enzima peroxidasa que se encuentra en casi todos los organismos vivos que están expuestos al oxígeno, y se encuentra principalmente en los peroxisomas. Esta enzima cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua según la siguiente reacción química:



La CAT protege a las células del H_2O_2 generado dentro de ellas y actúa cuando aumentan los niveles de esta especie, aunque también puede eliminar hidroperóxidos orgánicos y como su actividad media es corta, debe ser producida continuamente [69-71].

- **Glutación peroxidasa:** es una enzima que cataliza la reacción de oxidación del GSH utilizando para ello H_2O_2 , transformándolo en disulfuro de glutación (GSSG). Se conocen 4 isoformas. Gpx1, localizada células rojas, hígado y riñón, Gpx2, de localización gastrointestinal, Gpx3, de localización plasmática encontrado en riñón, pulmón, corazón y músculo y la Gpx4, que a diferencia de las demás isoformas además actúa en el desarrollo de las glándulas mamarias y cumple la importante función de combatir el EO generado por el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados en las células de cancer de mama [72-74]. Además, la Gpx4 puede atuar con sustratos lipofílicos tales como fosfolípidos peroxidados y colesterol reduciéndolos a compuestos de hidróxidos [75, 76].

- **Glutación reductasa:** cataliza la conversión del glutación oxidado a su forma reducida, manteniendo así el equilibrio GSH/GSSG.

Esta enzima es esencial para y evitar la acumulación de GSSG el cual es tóxico para la célula [73].

- **Glutación-S-transferasa:** La GST es una de las principales enzimas de detoxificación de fase II que se encarga de la eliminación de los productos derivados de las ROS que atacan a la membrana celular y está presente en el citosol, mitocondrias y microsomas unidos a membranas. Su función biológica es catalizar la conjugación del glutatión endógeno a una variedad de compuestos electrofilicos para proteger las macromoléculas biológicas como las proteínas y ácidos nucleicos de las consecuencias tóxicas, ya que al incrementarse la solubilidad del agresor se facilita su excreción del organismo posteriormente. Además, se ha visto que esta enzima está implicada en la detoxificación y biotransformación de muchos xenobióticos y carcinógenos [77].

- **Tiorredoxina:** es una proteína pequeña, localizada en la membrana mitocondrial, con un sitio activo redox que posee dos residuos de cisteína. Puede existir tanto en forma reducida como oxidada y participa en reacciones redox catalizadas mediante la oxidación reversible de su sitio activo. La Txn oxidada es reducida por la NADPH y una flavoproteína denominada Tiorredoxina reductasa (TrxR). Su función principal es participar en la reducción de H₂O₂, peróxidos lipídicos y proteínas con residuos sulfidrilos modificados oxidativamente [78, 79].

3.2.2 Sistema antioxidante no enzimático

Está integrado por una serie de sustancias de bajo peso molecular que en presencia de compuestos oxidables (como ADN, proteínas o lípidos), se oxidan antes que éstos y retrasan, inhiben, previenen o amortiguan su oxidación, la producción de radicales libres o sus efectos

deletéreos [80]. Constituyen un complemento de la acción de las enzimas antioxidantes, siendo una de las principales la GSH.

- **Glutathión reducido:** es el agente de detoxificación celular más abundante y sus niveles se regulan en respuesta al estatus redox. Reacciona con moléculas inestables como las ROS, donando un equivalente de reducción y se convierte en reactivo, pero reacciona rápidamente con otro glutathión reactivo para formar disulfuro de glutatión (GSSG) lo cual es posible debido a la concentración relativamente alta de glutatión en las células. El GSH se regenera a partir del GSSG, reacción catalizada por la GSR. En células y tejidos sanos, más del 90% de glutatión está en la forma reducida y menos del 10% existe como GSSG y la relación GSH/GSSG se considera un indicador del estado oxidativo [81-83].

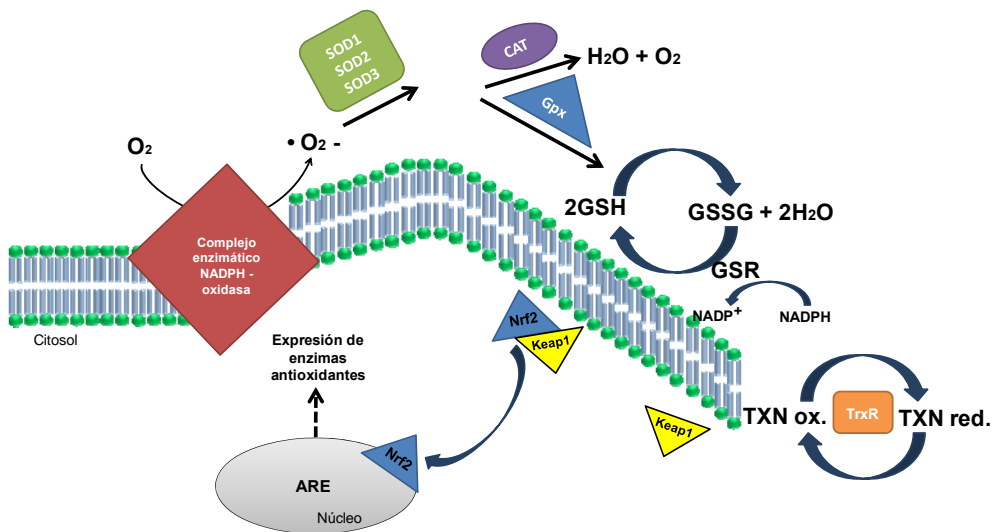


Figura 2. Mecanismo de la respuesta antioxidante desencadenada por la producción de superóxido del complejo NADPH oxidasa. Imagen modificada de Peña-Orihuela [84].

3.2.3 Sistema antioxidante exógeno

Existe un consenso científico creciente de que los antioxidantes provenientes de la dieta reducen la incidencia de enfermedades como el cáncer, las neurodegenerativas y cardiovasculares, reducen el daño al ADN y tienen propiedades anti-envejecimiento. Los antioxidantes exógenos interactúan con la red de antioxidantes endógenos, lo cual tiene un efecto sinérgico en la actividad antioxidante total del organismo. Algunos de los antioxidantes derivados de los alimentos más estudiados incluyen a las vitaminas C y E, carotenoides y a los polifenoles dentro del grupo de los flavonoides [85-87].

La vitamina C es el principal antioxidante dietético hidrosoluble cuya principal fuente son las frutas cítricas aunque también se encuentra añadido a otros alimentos como conservante. Su función principal es la de donar electrones para neutralizar los radicales libres además de facilitar la absorción de hierro. La vitamina E, abarca un grupo de compuestos como tocoferoles y tocotrienoles con diferentes actividades biológicas. Es un micronutriente esencial que se obtiene de fuentes de origen vegetal, como los aceites vegetales y sus derivados cuyas funciones principales son proteger a la membrana de la peroxidación y estabilizarla, interrumpe la cadena de reacciones de los radicales libres y neutraliza las ROS [85, 86, 88].

El grupo de los flavonoides, comprende una serie de metabolitos secundarios de las plantas, que se clasifican en chalconas, flavonoles, flavanodiones, antocianinas y taninos condensados. Algunos de estos flavonoides forman parte de los denominados compuestos fenólicos. Los polifenoles son metabolitos secundarios que se sintetizan como mecanismo de protección y defensa ante las agresiones externas en

algunos alimentos del reino vegetal que se encuentran ampliamente distribuidos en la dieta, principalmente frutas, verduras, semillas, hierbas, especias, aceites y en bebidas como el vino y el té [89].

Estudios epidemiológicos han mostrado una reducción del riesgo para desarrollar ECV cuando se ingiere una dieta rica en compuestos fenólicos, además de un efecto protector para el desarrollo de cáncer, DM II, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas. Esto se explica en base a sus propiedades antioxidantes, dado que mejora la actividad de las enzimas antioxidantes, reduce la producción de ROS y aumenta de la producción de NO [90, 91]. La reacción antioxidante de estos compuestos se basa en la donación de sus átomos de hidrógeno desde sus grupos hidroxilos formando radicales libres más estables que no inician la cascada oxidativa. Además, los polifenoles participan en conjunto con otros antioxidantes como es el caso del ascorbato, permitiendo la recuperación del radical aroxilo desde el radical [92]. Aparte de propiedades antioxidantes los compuestos fenólicos poseen otras que regulan los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de las enfermedades crónicas mencionadas anteriormente. En conclusión, el aporte de antioxidantes a través de la dieta constituye un recurso terapéutico útil tanto para la prevención como para el tratamiento coadyuvante de enfermedades crónico-metabólicas.

3.3 Tejido adiposo

La obesidad está alcanzando proporciones pandémicas tanto en países desarrollados como en países en vía de desarrollo. Este fenómeno es especialmente inquietante ya que implica un aumento en el riesgo de muerte prematura por enfermedades relacionadas como la DM II, ECV y algunos tipos de cáncer. Por si sola sin ninguna enfermedad coexistente,

además de ser un factor de riesgo, la obesidad se asocia con la alteración de la función de las arterias la cual se restablece una vez que se pierde peso, por lo tanto, también se asocia con un mayor riesgo de desarrollar arteriosclerosis [93, 94].

Al principio se creía que el TA solo realizaba funciones de almacenamiento y liberación de lípidos. Sin embargo, con el reconocimiento de la obesidad como uno de los mayores problemas de salud pública, descifrar los sistemas neuroendócrinos que regulan la homeostasis energética y la adiposidad se convirtió en una prioridad en la investigación que llevó a la identificación del extraordinario comportamiento dinámico de este tejido y su rol como un órgano endócrino extremadamente activo [95-97].

En base a su histología, distribución y funcionalidad, el tejido adiposo puede distribuirse en tejido adiposo marrón y tejido adiposo blanco (TAB). El tejido adiposo marrón es termogénico y está regulado por el sistema nervioso simpático para mantener la temperatura corporal generando calor a través de las denominadas proteínas desacoplantes (UCP, *Un-Coupling Protein*) presentes en las mitocondrias que disipan energía en forma de calor [98]. A medida que el organismo alcanza la madurez la cantidad de este tejido se reduce y aumenta la del TAB, por lo que los estudios se centran en éste último dada su marcada influencia en la homeostasis del metabolismo lipídico así como su relación con las patologías relacionadas con la obesidad [99, 100].

3.3.1 Generalidades del tejido adiposo blanco

El TAB es un tejido conectivo laxo especial del cual un 60-70% corresponde a adipocitos y el resto se compone de otros tipos de células comprendidas en la fracción vascular del estroma que incluyen

macrófagos, fibroblastos, pericitos, células sanguíneas, células endoteliales y precursoras de adipocitos, entre otros [101].

El adipocito maduro tiene forma esférica, y varía según el tamaño (100-200 micras), estando el 90% de su volumen compuesto por la "gota lipídica", formada por triacilgliceroles y en menor proporción por diacilgliceroles, además de fosfolípidos y ácidos grasos no esterificados que son continuamente movilizados y renovados. Una delgada membrana separa a la gota lipídica de la matriz citoplasmática que contiene mitocondrias y exhibe una pequeña zona de Golgi, ribosomas libres y ocasionales lisosomas [102, 103]. En la superficie de la gota lipídica se localizan unas proteínas denominadas perilipinas, las cuales crean una barrera entre la lipasa y los lípidos inhibiendo la lipólisis. No obstante, cuando las perilipinas son fosforiladas, permiten a la lipasa acceder a la gota lipídica promoviendo la lipólisis [104].

Las funciones clásicas del TAB son las de proteger los órganos internos, almacenamiento de energía y movilización de lípidos. En condiciones fisiológicas, mantiene el balance entre la síntesis de triacilgliceroles (lipogénesis) y la ruptura de los mismos (lipólisis) para suplir las necesidades del organismo. Cuando hay un exceso de calorías los adipocitos lo almacenan como triacilgliceroles que sirve de reserva para ser utilizados durante periodos de balance energético negativo como el ayuno, la inanición o el ejercicio físico prolongado [105].

Cuando se mantiene un balance energético positivo la expansión de la masa adiposa inicialmente se produce por aumento del tamaño de los adipocitos, aumentando su contenido en lípidos intracelulares (hipertrofia) y si esta condición se mantiene, aumenta el número de adipocitos (hiperplasia). Por lo tanto, el almacenamiento del exceso de energía

comienza como un proceso hipertrófico en el cual los adipocitos pueden alcanzar cuatro veces su tamaño y puede volverse hiperplásico cuando estos alcanzan un tamaño crítico. Mientras que la obesidad infantil se caracteriza por ser hiperplásica, la obesidad en el adulto tiene carácter hipertrófico [106, 107].

- **Distribución:** la distribución corporal del TAB se puede dividir en dos depósitos principales: subcutáneo (representa el 80% del total de grasa corporal) y visceral. El TA visceral rodea los órganos internos en la cavidad abdominal y mediastino, mientras que el subcutáneo forma una capa de grasa bajo la piel que está en la hipodermis [108].

El TA visceral se divide en tres depósitos principales: la grasa omental que rodea los intestinos superficialmente, la grasa mesentérica que se encuentra más adentrada alrededor de los intestinos y la grasa retroperitoneal cercana a los riñones en el lado dorsal de la cavidad abdominal. Proporciones más pequeñas de TA visceral se encuentran también en el mediastino (grasa paracardial o intratorácica) y alrededor de órganos específicos como el corazón (grasa epicárdica), estómago (grasa epigástrica) y vasos sanguíneos (grasa perivascular) [109]. Por el contrario, el TA subcutáneo se distribuye principalmente en las regiones abdominal, femoral y glútea [108].

Se considera también masa adiposa a aquella que se depositan en tejido hepático, corazón, páncreas, músculo esquelético y dentro de los vasos sanguíneos, que se denomina grasa ectópica y que aparece en estados patológicos [110].

En un contexto diferente, los depósitos de grasa pueden dividirse en androide o central (parte superior del cuerpo) y ginoide o periférico (parte inferior del cuerpo). De aquí la clasificación de la obesidad como

androide o ginoide, siendo la androide o "tipo manzana", la que más relacionada está con el riesgo cardiometabólico y por ello la circunferencia de cintura se considera una medida antropométrica válida para valorar la adiposidad central. Por el contrario, la obesidad ginoide o "tipo pera" tiene menor impacto en las alteraciones cardiometabólicas. Por lo tanto, la cantidad y distribución de este tejido en el organismo son determinantes relevantes de las enfermedades y comorbilidades asociadas a la obesidad [111, 112].

- **Función endócrina del tejido adiposo:** actualmente se sabe que el TAB participa en la regulación de varias funciones biológicas, además de desempeñar su papel en el almacenamiento de energía. De hecho es capaz de producir y secretar moléculas de señalización que afectan a múltiples órganos al mismo tiempo que expresa una amplia gama de receptores que le permiten responder a estímulos metabólicos y endócrinos. El TA está abundantemente innervado y vascularizado y contiene células inmunes especializadas que son foco de constante atención desde que se conoce la asociación entre la obesidad y la inflamación crónica de bajo grado [113, 114]. La función endócrina de este tejido está determinada por la producción y secreción de varias hormonas, principalmente las que se describen a continuación.

a. Adipoquinas

Las adipoquinas comprenden un grupo de hormonas secretadas por los adipocitos de las cuales las más estudiadas son la leptina y la adiponectina aunque se conocen más de 100 diferentes. Sus principales funciones incluyen una amplia gama de aquellas que intervienen en el metabolismo, como por ejemplo la regulación del apetito y del balance energético, sensibilidad a la insulina, regulación de la presión arterial,

homeostasis vascular, inflamación y respuesta inmune, las cuales implican al TA en múltiples interacciones con otros tejidos [115].

- **Leptina:** es una hormona secretada principalmente por los adipocitos que tiene acción central (principalmente en el hipotálamo) y en órganos periféricos. Afecta el gasto energético, actúa como una señal importante para el sistema reproductor e interviene en la angiogénesis y el sistema inmunitario. Además de influir en estos sistemas, afecta a un amplio espectro de procesos metabólicos que van desde la inhibición de la secreción de insulina por las células β -pancreáticas hasta la estimulación del transporte de azúcares y la agregación plaquetaria. Su expresión y concentración se asocia directamente con la cantidad de masa grasa y los cambios en el peso corporal, cuando existe una cantidad excesiva de adipocitos y de TG almacenados en los mismos aumentan sus niveles e informa al cerebro con el fin de inhibir el apetito, razón por la cual también se le confiere la propiedad de actuar como saciante ya que también aumenta después de la ingesta de una comida [105, 116].

Adiponectina: es una proteína de 30 kDa de peso molecular, sintetizada y secretada exclusivamente por el TA, representando el 0,01% de la proteína total en suero, siendo así, la más abundante en este biofluido. Sus tejidos diana son principalmente hígado, músculo esquelético, páncreas y endotelio vascular [117].

Tiene propiedades anti-inflamatorias, anti-ateroscleróticas y cardioprotectoras asociadas a su capacidad de inhibir la formación de células espumosas (derivadas de macrófagos) que pueden producir grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias e inducir a la formación de la placa aterosclerótica. También actúa sobre células

miocárdicas impidiendo su muerte, atenúa el daño isquémico y promueve la revascularización [117, 118].

En el páncreas, su mayor efecto reside en promover el funcionamiento y la supervivencia de las células β . Además, aumenta la sensibilidad a la insulina y disminuye los niveles de glucosa plasmática [119].

Así mismo, en el propio TA tiene actividad parácrina, cuando aumentan sus niveles aumenta la masa adiposa por hiperplasia y reduce la expresión de los genes implicados con la inflamación [118, 119].

Otras adipocinas producidas por este tejido son la resitina, que se libera durante la adipogénesis, contribuye a la respuesta inflamatoria y está asociada a la resistencia a la insulina y a la DM II; la vifastina, cuyos niveles aumentan en personas obesas, la proteína unida a retinol 4 (*RBP-4*), que también se asocia con la resistencia a la insulina por alteración de la homeostasis de la glucosa y la apelina, que al contrario de las anteriores, contribuye favorablemente a la función cardiovascular al aumentar la contractibilidad cardíaca y disminuir la presión arterial [116].

b. Citoquinas pro-inflamatorias

Las principales son la interleukina-6 (IL-6), la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), TNF- α y la IL1 β , que son producidas y secretadas por el TAB. La IL-6 participa en la homeostasis energética pero cuando sus niveles aumentan en paralelo con el grado de obesidad tiene efectos pro-inflamatorios y se vincula con intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. Mientras que el TNF- α ejerce efectos inflamatorios, la MCP-1 contribuye a la infiltración de células en el TA cuando se produce en exceso en este tejido [103, 120]. Por otro lado, la IL1 β es una citoquina mediadora de la respuesta inflamatoria implicada

además en la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Niveles plasmáticos elevados de esta citoquina se relaciona con obesidad visceral y desarrollo de SMet. Además, se ha visto que la IL1 β inhibe el transporte de la glucosa al inhibir la señalización de la insulina por lo que también está asociada a la RI [121, 122] . Cuando aumenta la producción de estas citoquinas en TA, principalmente de la MCP-1, éstas promueven la infiltración de macrófagos, que son las principales responsables de la producción de citoquinas inflamatorias en TA [123].

3.3.2 Disfunción del tejido adiposo

La hipertrofia de los adipocitos y la acumulación de grasa visceral resultan en trastornos endócrinos. La adiposopatía o disfunción del TA se caracteriza por cambios anatómicos patogénicos producidos en respuesta a un balance energético positivo crónico, sedentarismo y predisposición genética que dependiendo de su interacción con otros tejidos del cuerpo, conduce a alteraciones metabólicas relacionadas con la RI, alteraciones vasculares y otros factores de riesgo que son componentes del SMet [124]. La relación entre el exceso de tejido adiposo y los problemas de salud observados hasta ahora que incluyen a la DM II, cáncer y ECV, demanda el esclarecimiento de la fisiopatología celular mediante la cual la adiposidad inicia y mantiene los efectos nocivos para la salud.

La disfunción del TA, puede iniciar el desarrollo de la disfunción endotelial (DE) a través de una serie de mecanismos. La DE constituye el primer paso en el desarrollo de la arteriosclerosis y de las ECV. Entre estos mecanismos se encuentran la disminución en la producción de adipocinas vasoprotectoras como es el caso de la adiponectina que ejerce efectos anti-aterogénicos y cuya concentración plasmática es menor en personas obesas [125]. Las adipocinas producidas por el depósito de grasa

subcutáneo afectan localmente al desarrollo y función de los adipocitos y ejercen efectos sistémicos como por ejemplo en el músculo esquelético y aquellas de carácter inflamatorio inducen a la RI y a la inflamación sistémica que a largo plazo lleva a la acumulación de grasa ectópica en hígado y músculo [126]. Estos y otros mecanismos que subyacen a la disfunción del TA se agrupan en aquellos relacionados con los procesos de inflamación, estrés de retículo endoplásmico y estrés oxidativo que se describen a continuación.

3.3.3 Tejido adiposo e inflamación

La inflamación se desencadena a través de vías de señalización de las cuales la dominante es la del factor nuclear de transcripción Kappa B (NF- κ B), que está formado por 5 subunidades de la familia Rel; p50, p52, p65, c-Rel-Rel y RelB que forman homo y heterodímeros para configurar el NF- κ B y se unen a secuencias promotoras de una gran cantidad de genes. Además, tienen en común una región de 300 aminoácidos en el extremo N-terminal que contiene las regiones responsables de la dimerización, unión a ADN, señal de localización nuclear y de interacción con las proteínas I κ B. La p50 y p65 se expresan en la mayoría de las células, en cambio la p52, c-Rel-Rel y RelB se expresan exclusivamente en células hematopoyéticas [127].

La activación de este factor de transcripción es un proceso secuencial de múltiples pasos, el cual es controlado principalmente por el inhibidor κ B (I κ B), proteína que se une a él y lo retiene en el citosol [127]. Para que se produzca su activación es necesaria la fosforilación del I κ B mediada por el complejo IKK, con lo cual NF- κ B migra al núcleo en donde se une a sitios específicos del ADN de manera que activa la transcripción de genes diana [128].

En condiciones de obesidad, el factor transcripcional NF- κ B aumenta su nivel basal de activación en adipocitos, hepatocitos e inclusive en neuronas. En TA, esta activación de NF- κ B ha sido relacionada con una disminución de la sensibilidad a la insulina a través de la supresión del PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) y con el aumento de la expresión de mediadores inflamatorios como el TNF- α , IL-1, IL-6 y MCP-1. Además, el aumento de la expresión de su subunidad p65 en células mononucleares se relaciona con obesidad y RI [129, 130]

Los mediadores inflamatorios son moléculas encargadas de intercambiar señales entre tejidos para integrar la respuesta inflamatoria e incluyen proteínas (como citoquinas y enzimas), lípidos (como diglicéridos y ceramidas) y ROS. Particularmente, las citoquinas pro-inflamatorias aumentan local o sistemáticamente en la obesidad, estado en el que el TA es la mayor fuente de citoquinas pro-inflamatorias circulantes por lo cual los adipocitos y macrófagos del TA constituyen el principal tipo celular responsable de su producción [97, 131].

La MCP-1 secretada por el TA de personas obesas promueve la infiltración y acumulación de macrófagos en el propio TA y en el espacio sub-endotelial. Estos macrófagos además, están implicados en la secreción constante de otras citoquinas inflamatorias que causan finalmente un estado de inflamación crónica de bajo grado [126].

La inflamación afecta al TA de varias maneras. En los adipocitos inhibe la secreción de adiponectina, la adipogénesis, la sensibilidad a la insulina, la captación de glucosa, la síntesis de TG y su acumulación lo cual explica el aumento de la lipólisis y la disminución del almacenamiento de grasa. En la matriz extracelular la inflamación estimula el proceso de remodelación, como la angiogénesis (aumento de

vasos sanguíneos), la constricción/dilatación de los vasos, la irrigación sanguínea, la digestión de colágeno y la fibrosis [129].

3.3.4 Tejido adiposo y estrés oxidativo

Recientemente se ha propuesto que la obesidad *per se* puede inducir al estrés oxidativo sistémico y que el exceso de la masa adiposa es responsable de la alteración de las funciones de las adipocinas y en consecuencia del desarrollo del SMet [1].

En personas obesas, los niveles plasmáticos y urinarios de biomarcadores de peroxidación lipídica se asocian positivamente con el IMC y con la circunferencia de cintura, y por el contrario, los niveles de adiponectina se relacionan negativamente con todos estos parámetros [132]. Además, los individuos obesos presentan niveles plasmáticos más altos de otros biomarcadores de estrés oxidativo como isoprostanos y proteínas carboniladas, así como disminuida la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD1 y Gpx [133-135]. Por otro lado, la pérdida de peso en personas obesas mejora el perfil oxidativo plasmático, más aun cuando la pérdida es a expensas de TA central [136].

Los niveles plasmáticos de H_2O_2 aumentan tanto en la obesidad acompañada de DM II como en la obesidad sin ninguna enfermedad coexistente, lo que sugiere que el EO presente en la obesidad es independiente de la hiperglucemia, entre otros factores de riesgo para el desarrollo de ECV [137, 138]. Además, la producción de esta especie reactiva y la peroxidación lipídica es más alta en TA en comparación con otros tejidos como el hepático y el músculo esquelético, lo que sitúa al TA como principal productor de ROS [1].

El complejo NADPH-oxidasa, como fuente principal de ROS en distintos tejidos, tiene una participación importante en la patogénesis de la

hipertensión y la arteriosclerosis cuando aumenta su actividad. En presencia de obesidad se incrementa la activación de las subunidades de este complejo enzimático en TA, mientras que el hígado y el músculo esquelético exhiben una menor actividad que es similar a la que presentan estos tejidos en una población no obesa. A la sobreactivación de este complejo en TA le acompaña una menor expresión génica de las enzimas antioxidantes SOD, Gpx y CAT, resultados que sumados a los anteriormente mencionados indican que la grasa acumulada en la obesidad es la principal productora de ROS a través de la activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa, proceso que se acompaña de una actividad antioxidante reducida que finalmente se traduce en EO sistémico (**figura 3**) [1].



Figura 3. Esquema de la hipótesis de la obesidad como causa del SM propuesta por Furukawa y colaboradores [1].

3.3.5 Tejido adiposo y estrés de retículo endoplásmico

El retículo endoplasmático (RE) además de ser la organela responsable de la síntesis, plegamiento y maduración de proteínas, biosíntesis de lípidos y almacenamiento de calcio, actúa como el principal centro de control de calidad y como entidad de transducción de señales que puede detectar y responder a los cambios en la homeostasis celular [139, 140].

El RE es muy sensible a los cambios y responde rápidamente para mantener la integridad celular y la función normal, la cual se ve amenazada cuando los polipéptidos desplegados emergentes exceden la capacidad de procesamiento del RE. Ante esta situación, la célula responde activando un intrincado conjunto de vías de señalización integradas que proporcionan información al citosol y al núcleo con el objetivo de restaurar las funciones celulares normales [141].

Ante la presencia de factores de estrés como señales inflamatorias, elevados niveles de ROS, hipoxia o exceso de lípidos en TA, se altera la homeostasis del RE y en consecuencia se produce un estado de estrés o congestión proteica que se conoce con el nombre de estrés de RE. Para contrarrestar este proceso se activa la respuesta a las proteínas mal plegadas (UPR: *unfolded protein response*) que disminuye o detiene la síntesis de proteínas transmitiendo información del estado de plegamiento de las mismas e intentando restablecer la homeostasis del RE, pero si el estrés persiste la respuesta adaptativa de la UPR falla y el RE inicia la señalización apoptótica [142-144].

Los 3 principales transductores transmembrana que activan la UPR frente al estrés de RE son: 1) PERK (*protein-kinase-like ER Kinase*) 2) IRE1 (*inositol requiring protein-1*) y 3) ATF6 (*activating transcription*

factor-6) [141]. La UPR responde a nivel transcripcional aumentando la síntesis de chaperonas como la BiP (glucose-regulated protein 78 kDa), calnexina (CNX), calreticulina (CRT), PDIA-3 (protein disulfide isomerase family A, member 3) a través de la ATF6, con lo que se detiene la producción de proteínas y se desnaturalizan las mal plegadas [145, 146]. Además, la ATF6 activa la transcripción del gen que expresa la proteína XBP-1 (X-box binding protein 1) cuya función es hacer más efectiva la actividad de la UPR y la IRE1 se encarga de la activación de esta proteína [147, 148]. Por otra parte, la PERK activa la UPR mediante la fosforilación de la eIF2 α (eukaryotic translational initiation factor 2 α) a eIF2B que resulta en una disminución global de la síntesis de proteínas con la consecuente reducción de carga de trabajo del RE [149].

Son varios los estudios que sustentan el concepto de que hay una estrecha y dinámica relación entre la obesidad y el estrés de RE en humanos. Se ha demostrado que en el TA de personas obesas insulino-resistentes no diabéticas existe estrés de RE, en donde parámetros como BiP, XBP-1 y eIF2 fosforilado se encuentran incrementados y disminuyen significativamente tras perder peso y reducir la ingesta de calorías [150]. Además, la JNK-1 (phospho c-jun NH2-terminal kinase) también se hiperactiva e inhibe la acción de la insulina y activa vías de señalización proinflamatorias, lo cual vincula a la obesidad, RI, estrés de RE e inflamación [151].

3.4 Resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares

La insulina es una hormona pluripotencial cuya acción se extiende desde la regulación del metabolismo intermedio hasta efectos anabólicos [152]. La identificación de la acción de la insulina y su

habilidad para modular el metabolismo de la glucosa tienen relación con su funcionamiento normal, sensibilidad o resistencia que los tejidos presentan a ella. Según Reaven [153] la RI es la capacidad alterada del músculo esquelético para promover la utilización de glucosa. Esto se refleja en la noción de que el músculo esquelético se considera como el tejido que más utiliza glucosa en respuesta a un incremento de la concentración plasmática de insulina. Este concepto es más limitado que el propuesto por Kahn [154], quien definió la RI como cualquier condición en la que la concentración normal de la insulina provoca una menor respuesta biológica. La RI se refiere por tanto a la concomitancia del defecto en la sensibilidad a la insulina y la respuesta a la misma por parte de los tejidos [153, 154].

La RI se caracteriza por un número de condiciones patológicas (captación de glucosa alterada, hiperglicemia, hiperinsulinemia y aumento de la síntesis hepática de TG y VLDL). Bajo estas condiciones la RI se puede desarrollar como un defecto primario, secundario a otras patologías o como consecuencia de defectos específicos como por ejemplo las mutaciones de genes involucrados en las vías de señalización de la insulina. No obstante, la condición más habitual de la RI es el Síndrome Metabólico [155].

Se considera que los principales factores etiológicos del SMet son la obesidad y la RI, sin olvidar que el componente lipídico y la presión sanguínea también tienen influencia en el desarrollo de este síndrome [156]. El papel central que juega la RI en el desarrollo del SMet es uno de los mecanismos más estudiados y es indiscutible su importancia en la incidencia de ECV. Por un lado, la insulina es capaz de desarrollar aterogenicidad a través de su acción mitogénica en las arterias y por otro

la RI está relacionada con la DE en donde las adipocitoquinas tienen una influencia considerable [155, 157, 158].

La relación de la RI con la edad podría considerarse a nivel mitocondrial, cuyo deterioro funcional es uno de los determinantes de la aceleración de la frecuencia del envejecimiento y también de la RI [159, 160]. La prevalencia de aterosclerosis así como los niveles de glucosa en ayunas elevados y la tolerancia a la misma alterada están asociados positivamente con la edad. En cualquiera de los casos, se debe tener en cuenta que el envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de ECV [161].

Por otra parte, la relación entre la RI y las ECV puede explicarse a través de otro componente del SMet que es la obesidad. El TA ejerce un importante papel en la acción de la insulina en el ser humano. La RI se considera el defecto inicial en el desarrollo de la DM II y la principal característica del SMet. Además, la obesidad es el principal factor promotor del deterioro de la acción de la insulina y particularmente, cuando la adiposidad es central afecta toda la acción insulínica en músculo, hígado y vasos sanguíneos. Este efecto metabólico se debe principalmente al exceso de lipólisis y el incremento de ácidos grasos libres (AGL) en plasma que presentan las personas obesas [162, 163]. Además de los AGL, la masa adiposa secreta varias adipocitoquinas que también afectan a la acción de la insulina y consecuentemente la utilización periférica de glucosa, la producción hepática de glucosa y también la función endotelial. Por lo tanto, la obesidad y más aún la obesidad central, puede favorecer el desarrollo de la RI, DM II y en consecuencia ECV.

3.5 Disfunción endotelial y enfermedades cardiovasculares

El endotelio es un órgano autocrino/paracrino metabólicamente activo que juega un papel crucial en la homeostasis cardiovascular a través de la liberación de diversos factores vasoactivos que pueden dilatar o contraer los vasos sanguíneos dependiendo del estímulo que recibe y además regula la agregación plaquetaria, la coagulación y la fibrinólisis [164]. Entre los vasodilatadores secretados por el endotelio se encuentran el NO, el factor de hiperpolarización derivado del endotelio (EDHF) y las prostaciclina, mientras que la vasoconstricción está mediada por factores como la endotelina-1, tromboxano A2 y angiotensina II. Particularmente el NO se considera como el vasodilatador endógeno más potente y como un indicador clave de la función endotelial cuya biodisponibilidad disminuye cuando éste reacciona con el $\cdot\text{O}_2^-$ y forma el oxidante ONOO \cdot . Esta reacción cobra importancia cuando la producción vascular de $\cdot\text{O}_2^-$ aumenta en pacientes con DM II, hipertensos, hipercolesterolémicos o de edad avanzada [165].

El SMet sustancialmente altera las propiedades vasodilatadoras del endotelio que finalmente conduce a lo que se conoce como DE. Esto se debe a que los componentes del SMet constituyen por sí mismos factores de riesgo para el desarrollo de ECV y afectan al endotelio de manera tal que en conjunto constituyen estímulos dañinos y crónicos que sobrepasan los mecanismos de defensa del mismo, comprometiendo su integridad y en última instancia iniciando la disfunción del tejido. La DE se considera el primer paso en la progresión de la arteriosclerosis y de ECV. Las ECV y el SMet están conectados tan estrechamente que se propuso una hipótesis que implica que las ECV podrían no ser simplemente una consecuencia

del SMet sino que estas dos condiciones son una sola entidad que comparten una fisiopatología en común [166].

Por otra parte, la aterosclerosis es una enfermedad vascular crónica, progresiva de carácter inflamatorio que constituye el sustrato patogénico para el desarrollo de ECV en pacientes con SMet y está estrechamente relacionada con la DE [167]. De hecho, la DE se considera como uno de los principales nexos fisiopatológicos entre la exposición a los factores de riesgo cardiovascular y el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica [168]. Esta conexión se explica a través de la respuesta fisiopatológica del endotelio desde la primera etapa del desarrollo de la aterosclerosis que se caracteriza por el transporte de partículas de LDL-colesterol a través de la pared endotelial, lo cual desencadena la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de citoquinas proinflamatorias que conducen al reclutamiento, activación y fijación de linfocitos y macrófagos. Estos últimos fagocitan las partículas de LDL-colesterol, generan ROS que las transforman en células espumosas que van formando la estría grasa y posteriormente la placa aterosclerótica [169-171].

Una vez instalada la DE se produce un desequilibrio entre la vasodilatación y la vasoconstricción, volviéndose dominante esta última que es el estado que desencadena todos los cambios fisiopatológicos que se conocen como la triada activación - disfunción - lesión endotelial [172, 173].

En conjunto todos los cambios que se producen en el endotelio exhiben características pro-inflamatorias, pro-oxidantes, y proliferativas [164, 174]. De hecho, el estrés oxidativo se considera un factor clave en la patogénesis de ECV dado el papel que juega en el desarrollo de la DE. Las reacciones de oxidación son cruciales en todos los procesos que conducen

a la aterosclerosis y a la DE. El efecto de las ROS en las funciones vasculares depende críticamente de la cantidad en que se producen. En pequeñas cantidades, cumplen funciones fisiológicas como regulación de los procesos de diferenciación celular, proliferación, apoptosis, inmunidad, defensa contra microorganismos, remodelado vascular y transcripción de enzimas antioxidantes, pero cuando se produce un desbalance entre la producción y la detoxificación de ROS, estas pueden llegar a acumularse y provocar EO, condición que puede ocasionar daño al ADN, toxicidad significativa e incluso apoptosis. Las células vasculares pueden producir ROS que regulan la expresión de genes que incluyen moléculas de adhesión, factores quimioatrayentes y sustancias vasoactivas. La expresión incrementada de moléculas de adhesión vascular como la VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) e ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) y de moléculas quimioatrayentes como la MCP-1 por mecanismos sensibles a oxidantes es de particular relevancia dado que estas moléculas promueven la adhesión y migración de monocitos a la pared vascular [175, 176].

Cuando la vasculatura del endotelio es dañada se produce la estimulación de varias enzimas que producen ROS, como las de la cadena de electrones mitocondrial, la xantina oxidasa, ciclooxigenasas, lipooxigenasas, mieloperoxidasas, la citocromo P450 monooxigenasa, NOS desacoplada, hemooxigenasas, peroxidasas y NADPH-oxidasas [177]. De entre estas enzimas, es particularmente relevante el complejo enzimático NADPH-oxidasa dado que se considera la mayor fuente de ROS celular [178]. Varios estudios han demostrado que la actividad de este complejo enzimático tiene una fuerte correlación con los factores de riesgo ateroscleróticos y con la DE. Además se ha visto que la actividad

de la NADPH-oxidasa aumenta no solo en presencia de factores que dañan el endotelio sino también por la propia insulina, lo que sugiere que este complejo juega un papel determinante en el EO que se produce en presencia de resistencia a la insulina [179, 180].

Por otra parte, el EO regula otras vías de señalización, entre ellas la del NF- κ B que juega un papel crítico en la respuesta inflamatoria y la apoptosis que a su vez aumenta la producción de ROS y consecuentemente, el EO. El balance alterado por la inflamación hace que el endotelio se vuelva más susceptible a la formación del ateroma y aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias que inician el proceso de formación de la lesión aterosclerótica [181].

En resumen, uno de los procesos fisiopatológicos principales que determina la aparición del SMet es el EO, el cual además, provoca lesión vascular, DE y finalmente arteriosclerosis que constituye un factor de riesgo para el desarrollo de ECV [169].

4. DIETA Y ESTADO POSTPRANDIAL

4.1 Lipemia postprandial

El estado postprandial es la situación metabólica que se genera tras la ingesta de alimentos, y durante este, se llevan a cabo los procesos de digestión y captación de nutrientes además de otros principalmente anabólicos. En el transcurso del día se realizan al menos 3 comidas, por lo que esta situación metabólica es en la que el ser humano se encuentra la mayor parte del tiempo [182]. Estas comidas pueden llegar a contener entre un 20-70% de grasa de manera que tras la ingesta los niveles de TG en sangre aumentan, alcanzando sus niveles máximos a las 3-4 horas y no retornan al estado basal hasta las 8-12 horas después [183].

La lipemia postprandial fisiológica comprende modificaciones sucesivas en la concentración y composición de las lipoproteínas plasmáticas (aumento en las concentraciones de TG, LDL-colesterol, disminución en las concentraciones de HDL-colesterol y descenso de la aclaración de las VLDL-colesterol y de los remanentes de quilomicrones) [184]. Después de la absorción en el intestino los lípidos dietéticos son empaquetados dentro de los quilomicrones, secretados en la linfa y posteriormente en la sangre a través del conducto torácico. La lipólisis mediada por la lipoproteína lipasa (LPL) en capilares extrahepáticos convierte a los quilomicrones en remanentes de quilomicrones más pequeños que son aclarados luego por el hígado y de esta manera los ácidos grasos pueden ser utilizados por el propio hígado o para resintetizar TG y volver al torrente sanguíneo dentro de las VLDL junto con el colesterol y fosfolípidos. Por lo tanto quilomicrones, remanentes de quilomicrones y VLDL también contribuyen a la lipemia postprandial y en conjunto se conocen como lipoproteínas ricas en TG (TRL) de las cuales

los quilomicrones y sus remanentes contienen la apolipoproteína B48 y las VLDL la apolipoproteína B100 [185, 186].

La magnitud de la lipemia postprandial se considera un factor independiente para el desarrollo de ECV e incluso se sugiere como factor predictivo para el infarto de miocardio [187, 188]. Dicha magnitud se estima por el incremento en los niveles plasmáticos de TG que se considera como el principal mecanismo proaterogénico cuando su metabolismo se encuentra alterado independientemente del colesterol total, LDL-colesterol o HDL-colesterol [184, 189].

La prolongación de la lipemia postprandial se asocia con numerosos factores no modificables como la edad avanzada, sexo masculino, postmenopausia, RI y DM II, y con otros modificables como dieta pobre en ácidos grasos poliinsaturados, monoinsaturados y fibra o alta en carbohidratos simples, además del sedentarismo y alto consumo de alcohol [190-197].

4.2 Dieta y estrés oxidativo postprandial

El EO postprandial se caracteriza por un aumento de la susceptibilidad del organismo al daño oxidativo tras la ingesta de una comida rica en grasas y/o hidratos de carbono. Por lo tanto los macronutrientes pueden tener un efecto en el balance redox del organismo siendo blanco de modificaciones oxidativas tras su absorción o presentándose en forma de pro-oxidantes en la dieta [198, 199].

Hay cada vez más evidencia de que el EO y la lipemia postprandial son más importantes que la lipemia del estado de ayuno dado que los seres humanos se encuentran en ayunas solo las últimas horas de la noche. Los niveles postprandiales de lípidos, el colesterol oxidado y el EO oxidativo que siguen a una comida rica en grasa, son los factores que más afectan al

endotelio, por lo tanto, la dieta es mucho más relevante que los niveles de lípidos del estado de ayuno a la hora de predecir efectos sobre el endotelio [134, 200].

Una comida rica en grasa altera la función endotelial durante varias horas, proceso que puede mitigarse con el consumo de vitaminas con propiedades antioxidantes como las C y E, lo que a su vez indica que el EO provocado por radicales libres es uno de los mecanismos fisiopatológicos de la disfunción endotelial inducida por comidas altas en grasas [201-204]. Esto se explica en base a que una vez digeridas y absorbidas, las grasas provenientes de la dieta son blanco directo de los procesos del EO postprandial el cual es uno de los procesos fisiopatológicos más estudiados de la lipemia postprandial alterada como factor de riesgo para el desarrollo de la arteriosclerosis. Un elevado consumo de lípidos (oxidables u oxidados) da lugar a un aumento de los niveles postprandiales de peróxidos lipídicos, lo cual se asocia con la elevada susceptibilidad a la oxidación de las partículas de LDL, y por lo tanto, la cantidad y el tipo de grasa que se ingiere en cada comida tienen una marcada influencia en estos procesos, puesto que proporcionan los principales sustratos para el desencadenamiento del EO [198, 199, 205-207]. Tanto la glucólisis y posterior oxidación de acetil-CoA, como la beta oxidación de ácidos grasos generan especies reactivas de oxígeno como subproductos del metabolismo aerobio en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, como consecuencia de la acumulación de los electrones que se donan al oxígeno molecular se forman los radicales $\cdot O_2^-$ que afectan indirecta o directamente a la biodisponibilidad de NO del endotelio vascular, lo cual constituye un estado pro-oxidante acompañado

de un grado de oxidación activo que favorece en parte el desarrollo de la DE y posterior lesión vascular [208].

Como hemos visto anteriormente, los antioxidantes exógenos son compuestos que pueden consumirse en forma de suplementos (comprimidos o cápsulas) aunque son provistos principalmente por la dieta y que son capaces de eliminar ROS directamente. Entre ellos se incluyen tocoferoles, vitamina C, carotenoides, tioles, polifenoles y otros micronutrientes. Desde un punto de vista epidemiológico, la ingesta de dietas ricas en antioxidantes se asocia con una reducción del riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cancerígenas. Los antioxidantes dietéticos son por tanto responsables, al menos en parte, de los efectos beneficiosos asociados al consumo de dietas con alto contenido de frutas y verduras, que se recomienda en las distintas campañas de prevención de enfermedades alrededor del mundo [209, 210]. La cantidad de antioxidantes que se puede consumir con la dieta está influenciada por factores externos relacionados con la fuente de los mismos, así como por el procesamiento y almacenamiento de que sufren los alimentos y que puede alterar la cantidad y actividad de esos antioxidantes. También factores endógenos como el nivel de absorción, distribución, metabolismo y excreción, tienen efecto sobre la biodisponibilidad de los antioxidantes dietéticos [211].

Son varios los estudios que han demostrado los efectos positivos del consumo de antioxidantes dietéticos. La administración simultánea de vitaminas E y C antes de la ingesta de una comida rica en ácidos grasos saturados provoca una menor producción plasmática postprandial de Proteína C Reactiva y de PAI-1 en pacientes con DM II [212]. Además, el consumo de α -tocoferol disminuye los niveles plasmáticos de peróxidos

lipídicos en pacientes con DM II [213]. Otros antioxidantes como el resveratrol, presente en el vino y uvas, reduce la expresión génica postprandial de citoquinas inflamatorias tras la ingesta de una comida con alto contenido de grasas y carbohidratos en células mononucleares. [214]. Dentro del grupo de los polifenoles también se encuentran el ácido gálico presente en vegetales como el brócoli, espárragos y berenjena, el cual se ha demostrado reduce el EO a través del aumento de la Gpx y GSH y las catequinas del té, las cuales tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en condiciones de obesidad [215, 216].

Estudios *in vivo* como el de Pérez-Martínez y colaboradores demostraron que la cantidad y calidad de grasa tiene un efecto en el EO postprandial. Este estudio demostró que una dieta rica en MUFA mejora el estrés oxidativo postprandial aumentando los niveles de GSH y el cociente GSH/GSSG. Además, tras el consumo de una dieta rica en MUFA se encontraron menores niveles postprandiales de lipoperóxidos, proteínas carboniladas y una menor actividad del sistema enzimático SOD en comparación con el consumo de una dieta rica en SFA, la que provocó el aumento de los niveles postprandiales de H_2O_2 . Por otro lado, una dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono tiene un efecto intermedio sobre el EO postprandial en comparación con las dos dietas mencionadas anteriormente [217]. De acuerdo con estos resultados el estudio de Marín *et al* también demostró que una dieta rica en MUFA modula positivamente el EO postprandial a través de la reducción de los niveles de isoprostanos en orina y de nitrotirosina en plasma, una menor actividad de la SOD plasmática y una mayor concentración de β -carotenos plasmáticos [218].

Igualmente, los carbohidratos tienen un efecto sobre la lipemia postprandial pero dependiente de su índice glicémico y contenido en fibra.

Una dieta rica en hidratos de carbonos complejos e integrales con alto contenido de fibra mejora el perfil lipídico al disminuir los niveles postprandiales de TG (menor absorción intestinal) y de colesterol total. Por el contrario, un aporte muy elevado de carbohidratos simples puede aumentar la síntesis hepática de TG y disminuir la síntesis de LPL. Sin embargo, este efecto adverso puede atenuarse si este tipo de dieta se acompaña de la suplementación de PUFA n-3.

Como hemos visto, la dieta es un factor modificable que juega un papel clave en la modulación del EO postprandial, siendo las grasas los macronutrientes más relevantes en este sentido.

4.3 Dieta y Síndrome Metabólico

Una de las características principales del SMet es una acentuada dislipemia que comprende principalmente el descenso del HDL-colesterol acompañado del aumento de TG. La dislipemia en pacientes con SMet puede ser causada por una combinación de la sobreproducción de VLDL, el descenso del catabolismo de las partículas que contienen apoB (quilomicrones) y el aumento del catabolismo de las partículas de HDL. Estas alteraciones pueden ser consecuencia del efecto metabólico global de la RI ya que bajo estas condiciones el efecto antilipolítico de la insulina en tejido adiposo es débil con lo cual se explica el aumento postprandial de los niveles plasmáticos de AGL que pueden mantenerse hasta 8 horas por encima de los valores en estado de ayuno [219, 220].

Además, la RI tiene dos potenciales efectos en el metabolismo de los remanentes de quilomicrones: disminuye la expresión del receptor para las LDL y aumenta la síntesis hepática de colesterol y la secreción de VLDL. Estos efectos aumentan la competencia entre los quilomicrones y VLDL por los receptores hepáticos, por lo tanto altera la captación de los

remanentes de quilomicrones por esta vía [221]. Otra posible explicación es que las alteraciones postprandiales de los TG pueden estar relacionadas con la homeostasis del colesterol. La síntesis hepática de colesterol y su absorción intestinal son responsables del contenido hepático del mismo. El aumento de la absorción intestinal de colesterol reduce la síntesis hepática y en consecuencia la secreción de VLDL disminuye y los receptores de LDL se activan. La activación de estos receptores puede aumentar la eliminación de los remanentes de quilomicrones y de VLDL. En el estado postprandial de pacientes con SMet el aumento de la síntesis hepática de colesterol y la disminución de su absorción intestinal detiene el catabolismo de los TG y esta alteración también se observa en pacientes con enfermedad coronaria y con otras condiciones relacionadas con las ECV [196, 221-225].

La grasa dietética cumple un papel importante en el proceso aterogénico y va de la mano con la lipemia postprandial, la cual supone una medida indirecta de la capacidad metabólica de las personas. Una comida con alto contenido de grasas saturadas, característica de las dietas occidentales, puede provocar una lipemia postprandial de hasta 18 horas con la ingesta de 3 comidas diarias. El consumo elevado de este tipo de ácidos grasos puede resultar en la alteración de la función vascular y en un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias además de otras características asociadas al SMet como la elevación de los niveles plasmáticos de LDL [226].

Por otro lado, las grasas poliinsaturadas tienen un efecto más positivo en la lipemia postprandial en pacientes con SMet. El aumento de la ingesta de PUFA n-3 dietético de origen marino o como suplemento reduce la acumulación de ácidos grasos en músculo e hígado. Además los

PUFA reducen los niveles postprandiales plasmáticos de TG y modulan favorablemente los procesos de inflamación, activación plaquetaria, función endotelial y presión arterial. A pesar de los efectos beneficiosos de los PUFA, se debe tener en cuenta que su ingesta está limitada a <10% ya que el consumo en grandes cantidades se ha demostrado que reduce los niveles de HDL e incrementa la susceptibilidad de las LDL a la oxidación[227, 228].

En cuanto a los MUFA, su consumo tiene efectos beneficiosos en pacientes con SMet son los MUFA. Se ha descrito que el consumo de una dieta rica en MUFA aumenta la velocidad de digestión, absorción y secreción de quilomicrones, produce un aclaramiento más rápido de los TG plasmáticos, menores concentraciones de TRL postprandiales y además aumenta los niveles plasmáticos de HDL-colesterol en pacientes con SMet. [229-231]. Los cambios en la concentración de LDL y su susceptibilidad frente a la oxidación están determinados por el tipo de grasa dietética que se consume. De esta manera, los cambios causados por la dieta en el contenido de PUFA y MUFA contenidos en la LDL y la biodisponibilidad de antioxidantes en plasma pueden modular la formación de LDL modificadas que posteriormente se depositan en la placa aterosclerótica. En este sentido las lipoproteínas ricas en MUFA muestran una menor susceptibilidad frente a la oxidación que aquellas ricas en n-6 y en n-3 PUFA [232, 233]. Adicionalmente, otros hallazgos demuestran que las partículas LDL ricas en MUFA expuestas a EO provocan menor reclutamiento y adhesión de monocitos, y suprimen significativamente los efectos proinflamatorios, lo que sugiere que el consumo de estos ácidos grasos protege el endotelio vascular y mejora la disfunción endotelial [234, 235].

En base a los estudios mencionados anteriormente es evidente que la dieta juega un papel fundamental en la modulación de los procesos postprandiales que son clave en el desarrollo de las ECV. Fundamentalmente la calidad y cantidad de grasa en la dieta son las características más relevantes en la prevención de la aparición de factores de riesgo cardiovascular, siendo los factores dietéticos que más influencia tienen en ellos.

4.4 Dieta Mediterránea

El aumento en las tasas de obesidad y sus patologías asociadas han hecho que el tratamiento dietético forme parte de la atención médica integral y aunque existen algunos planes de alimentación comerciales que hacen afirmaciones sin fundamento sobre sus beneficios, existen otros que han sido estudiados de forma aleatoria, controlada y en un marco epidemiológico que comprueban tales bondades para la salud [236].

Entre los planes de alimentación más estudiados y publicitados hoy en día se encuentra la Dieta Mediterránea (Med), la cual ha despertado un especial interés por sus múltiples beneficios para la salud y su fuerte relación con la baja tasa de mortalidad cardiovascular en países Mediterráneos en donde también se observa la mayor esperanza de vida a nivel mundial [237, 238].

Los beneficios del consumo de la dieta Med fueron demostrados por primera vez en el estudio de Siete Países que se llevó a cabo entre los años 1950 y 1960 en el sur de Europa donde la esperanza de vida adulta era más alta y las tasas de enfermedad coronaria, de ciertos tipos de cáncer y de otras enfermedades crónicas relacionadas a la nutrición se encontraban entre las más bajas [239]. La dieta Med no es un patrón específico sino un conjunto de hábitos alimentarios característicos de

poblaciones de la cuenca Mediterránea que son los que definen la "Dieta Mediterránea tradicional". Esta dieta se caracteriza por el consumo abundante de vegetales, frutas, cereales integrales, patatas, legumbres, frutos secos, semillas, aceite de oliva tanto como para cocinar como para aliñar los alimentos, consumo moderado de productos lácteos, vino principalmente durante las comidas, consumo moderado de pescado en función de la proximidad al mar y bajo consumo de carne roja, mantequilla, cremas, margarina y de grasas saturadas en general [240].

No existe una dieta Mediterránea única sino varias definiciones de ella porque los hábitos alimentarios varían considerablemente entre los países Mediterráneos que bordean el mar [241]. No obstante, se han llevado a cabo evaluaciones de dietas de estilo Mediterráneo para desarrollar calificaciones o índices llamados "Mediterranean Diet Scale", "Mediterranean Diet Score", "Mediterranean Adequacy Index" o "Mediterranean-Style Dietary Pattern Score" con el objetivo de acercarse a la dieta tradicional y cuya utilidad reside en las comparaciones que se realizan en diferentes poblaciones según su adherencia y en el seguimiento de estudios de intervención dietética [242-244]. Un meta-análisis de estudios prospectivos basado en 1,5 millones de personas y 40.000 eventos fatales y no fatales demostró que una mayor adherencia a este estilo de dieta se asocia a una reducción significativa de la mortalidad en general, reducción de la mortalidad por ECV y cáncer, reducción de la incidencia de cáncer y de las enfermedades de Parkinson y Alzheimer [245]. Una reciente evaluación transversal de datos basales de participantes del estudio PREDIMED, un estudio de intervención dietética a gran escala de prevención cardiovascular primaria, mostró que la adherencia a la dieta Med se asocia inversamente con la DM II, obesidad,

hipertensión e hipercolesterolemia [246]. El seguimiento de otras grandes cohortes pero de poblaciones sanas que viven en países Mediterráneos como las cohortes griegas y españolas del EPIC (Estudios Europeos Prospectivos sobre Nutrición y Cáncer) y los estudios de ATTICA y SUN está proporcionando nueva información que sugiere que la adherencia a la dieta Med reduce la prevalencia de factores de riesgo para el desarrollo de ECV y cáncer [247-252].

En cuanto a los componentes de la dieta Med, ésta es rica en grasas monoinsaturadas representadas principalmente por el aceite de oliva virgen, baja en grasas saturadas, alta en carbohidratos complejos representados por legumbres y cereales integrales, y rica en fibra representada mayormente por frutas y vegetales. El aporte total de grasas es elevado (aproximadamente 40% del total de la ingesta de energía) y la relación grasas monoinsaturadas/grasas saturadas debe ser alrededor de 2, es decir, el aporte total de grasas es a través de grasas monoinsaturadas principalmente. El alto contenido de vegetales, frutas frescas y aceite de oliva garantiza una alta ingesta de beta-carotenos, vitaminas C y E, polifenoles y otros minerales importantes los cuales se consideran elementos claves y responsables de los efectos beneficiosos de la dieta sobre la salud humana especialmente sobre las ECV [253].

El papel protector y modulador de esta dieta se atribuye a varios efectos sobre los mecanismos fisiopatológicos que subyacen al desarrollo de la arteriosclerosis. Entre ellos se encuentran la reducción de la presión arterial, modulación favorable del perfil lipídico (especialmente LDL-colesterol y triglicéridos), reducción de la oxidación de lípidos y reducción del riesgo de trombosis, y todos estos cambios conducen al mejoramiento de la función endotelial [239].

Son varios los mecanismos propuestos para explicar los efectos beneficiosos de la dieta Med. Se ha visto que la dieta Med es capaz de modular favorablemente los procesos de inflamación, EO y DE, condiciones que se asocian a la patogénesis de la obesidad, SMet, DM II, ECV, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento los cuales se resumen en la **Tabla 4** [254-256].

Tabla 4. Mecanismos moduladores y protectores de la dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre las enfermedades metabólicas *.

Enfermedades metabólicas	Efecto
Obesidad	<ul style="list-style-type: none"> - Disminuye las tasas de obesidad - Efecto de saciedad - Reduce la circunferencia de cintura
Síndrome Metabólico	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce la incidencia y la prevalencia - Reduce la circunferencia de cintura - Previene la redistribución de la grasa de tejido periférico a visceral - Mejora la lipemia postprandial
Diabetes Mellitus II	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce la incidencia - Mejora la sensibilidad a la insulina - Mejora la lipemia postprandial - Mejora la homeostasis de la glucosa - Se relaciona favorablemente con la secreción de insulina de las células β
Mecanismos protectores	Efecto
Inflamación	<ul style="list-style-type: none"> - Previene la activación del NF-κB - Disminuye los niveles plasmáticos de CRP e interleukinas 6, 7 y 18 - Reduce la expresión génica de TNF-α - Reprime la expresión de genes pro-inflamatorios
Moléculas de adhesión	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce la expresión génica de VCAM-1 y E-selectina - Reduce los niveles plasmáticos de ICAM-1
Oxidación	<ul style="list-style-type: none"> - Reduce los niveles plasmáticos de LDL oxidadas - Mejora los parámetros postprandiales de EO
Función endotelial	<ul style="list-style-type: none"> - Atenúa marcadores plasmáticos de activación endotelial - Mejora la vasodilatación dependiente del endotelio - Mejora la función vasomotora

* Adaptada de Pérez-Martínez *et al* [257].

Tras décadas de investigación epidemiológica, clínica y experimental ha quedado claro que el consumo de modelos dietéticos Mediterráneos ricos en aceite de oliva virgen tiene efectos profundos en la salud. Por lo tanto, existe un buen apoyo científico para recomendar dietas de estilo Mediterráneo, especialmente aquellas basadas en aceite de oliva virgen como un método alternativo para el tratamiento médico-nutricional de la obesidad, SMet, DM II y como método preventivo de ECV, enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

4.5 Componentes minoritarios del aceite de oliva virgen

El consumo de la dieta Med conlleva una serie de efectos beneficiosos para la salud que se atribuyen a su componente principal: el aceite de oliva virgen (AOV), que actualmente es uno de los alimentos grasos más estudiados por sus múltiples propiedades. El aceite de oliva se produce principalmente en España e Italia y se compone de una fracción saponificable o glicérica rica en MUFA constituida principalmente por ácido oleico y una fracción insaponificable o no glicérica la cual contiene componentes minoritarios representados por esteroides, tocoferoles, escualenos, carotenoides, pigmentos clorofílicos y compuestos fenólicos que impiden la oxidación o enranciamiento del aceite y que son la base de su excepcional estabilidad, pero que además, le confieren su aroma y sabor característicos [258]. Además, el aceite de oliva virgen es el que tiene mayor cantidad de compuestos antioxidantes en comparación con los demás aceites vegetales, que por su excesivo sometimiento al proceso de refinado pierden gran cantidad de los mismos [259].

Los efectos beneficiosos del aceite de oliva virgen sobre el riesgo cardiovascular a menudo se atribuyen solo a los altos niveles de MUFA. Sin embargo, actualmente se reconoce que sus componentes minoritarios

también son biológicamente activos, y que son responsables, al menos parcialmente de los beneficios saludables asociados al consumo de aceite de oliva [260]. Los componentes minoritarios más estudiados y caracterizados del aceite de oliva virgen son los compuestos fenólicos, cuya composición varía ampliamente dependiendo de factores como las condiciones ambientales de crecimiento del olivo, el tipo de cultivo, métodos de extracción y condiciones de almacenamiento del aceite. Los fenoles del aceite de oliva virgen pueden agruparse en tres categorías: fenoles simples, secoiridoides y lignanos cuya concentración total varía entre 100 a 800 mg/Kg dependiendo del grado del proceso de refinado al que se somete el aceite [261, 262].

Entre los efectos biológicos más conocidos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen podemos mencionar la inhibición de la oxidación de las partículas de LDL y del daño al ADN, reducción de los niveles de moléculas proinflamatorias y de adhesión vascular, mejora de la transcripción de enzimas antioxidantes, incrementa la producción de NO vascular, mejora de la disfunción endotelial, del estado protrombótico, de los marcadores de oxidación y modulación favorable del sistema inmune y de la presión arterial (**Figura 4**) [260, 263-265].

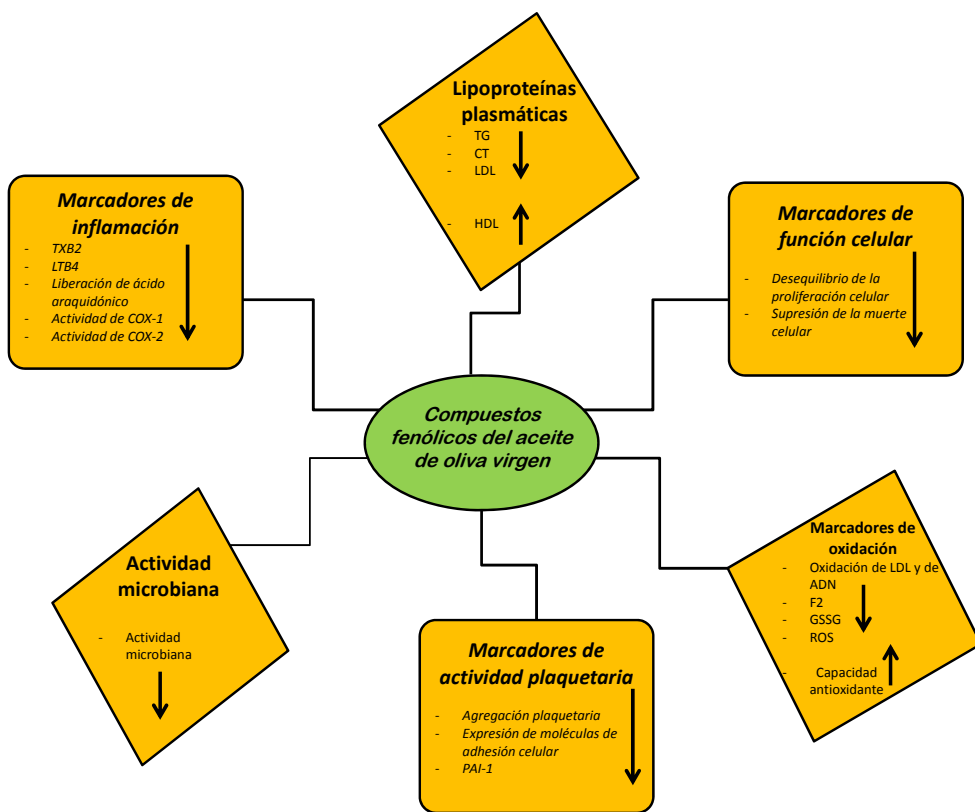


Figura 4. Efectos biológicos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen. Imagen modificada de Cicerale *et al* [262].

Actualmente es cada vez mayor la evidencia científica que sustenta los beneficios del consumo de compuestos fenólicos a través del aceite de oliva virgen. Por un lado, algunos estudios *in vivo* han demostrado que el consumo de un aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos mejora la DE, reduce los parámetros plasmáticos de EO y además tiene efectos positivos en la respuesta inflamatoria a través de una menor activación del factor de transcripción nuclear Nf-κB en células mononucleares. Además, los compuestos fenólicos también modulan favorablemente los cambios en la expresión de genes relacionados con el

cáncer, daño al ADN, EO, apoptosis y metabolismo de lípidos [263, 266-272].

Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen reprimen la expresión de génica de moléculas de adhesión proaterogénicas a través de la inactivación del NF- κ B en células endoteliales. Además tienen una potente actividad detoxificadora de ROS en presencia de un marcado EO, previene el daño al ADN y mejora la actividad antioxidante en células endoteliales y mononucleares [258, 273-277].

Estudios *ex vivo* demostraron que los compuestos fenólicos tienen actividad antioxidante más alta que otros compuestos como por ejemplo la vitamina E sobre la oxidación de lípidos y de ADN [278].

Además, los compuestos fenólicos previenen la DE al disminuir la expresión de moléculas de adhesión vascular, aumentar la producción de NO y al inactivar los radicales libres que se forman en el estado postprandial [279, 280]. Algunos estudios realizados en modelos animales demostraron por su parte que los compuestos fenólicos retardan la progresión de la arteriosclerosis [264, 281].

La magnitud de los efectos de los compuestos fenólicos sobre la salud humana depende de la biodisponibilidad de los mismos en el organismo. Ésta depende a su vez de la concentración de compuestos fenólicos que tenga el aceite de oliva virgen cuya ingesta se refleja en la aparición de los mismos en plasma como metabolitos de fase II y alcanzan su máxima concentración plasmática entre la hora y las dos horas tras la ingesta del aceite y a las dos horas en orina [282, 283]. No obstante, si bien los estudios *in vitro* demuestran gran parte de los efectos beneficiosos de los compuestos fenólicos y su proporcionalidad con la concentración de

los mismos, la mayoría de ellos se han realizado utilizando compuestos fenólicos comerciales y no reflejan el efecto de los biodisponibles en el organismo, razón por la cual son necesarios estudios que evalúen los efectos de compuestos fenólicos biodisponibles en el ser humano.

Por último, los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen lo hacen mucho más resistente a condiciones de fritura en comparación con otros aceites vegetales que carecen de estos compuestos bioactivos. Además de conferirle resistencia, esta propiedad hace que el aceite de oliva virgen sometido a procesos de calentamiento conserve sus efectos beneficiosos para la salud del consumidor, como por ejemplo la disminución de la expresión de genes relacionados con la inflamación postprandial y la disminución del EO postprandial reflejado en la disminución de la expresión de Nrf2 y en consecuencia de las enzimas antioxidantes en células mononucleares [284, 285].

III.HIPÓTESIS

La obesidad, componente central del SMet ha sido propuesta como responsable de su desarrollo a través del EO que en condiciones de obesidad es causado por el desequilibrio entre la producción y detoxificación de ROS producidas en TA exclusivamente y no en otros tejidos. Esto ocurre como consecuencia del aumento de la expresión del complejo enzimático NADPH-oxidasa acompañado de una disminución de la expresión de las enzimas antioxidantes, de manera que los elevados niveles de ROS en el TA inducen una respuesta inflamatoria, alteran la producción y liberación de citoquinas, disminuyen la producción de adiponectina y aumenta la liberación de las inflamatorias[1, 286] .

En condiciones de obesidad se observa una alteración de la función vasomotora de las arterias que puede conducir a DE como consecuencia del EO producido en la masa adiposa. La disfunción del TA provoca además inflamación sistémica crónica de bajo grado que induce el reclutamiento e infiltración de monocitos en las paredes de los vasos sanguíneos, lo cual produce inflamación vascular local, disminuye la producción de NO y cuando se sobrepasan los mecanismos de defensa, se induce la apoptosis con la consecuente formación de la neointima y daño endotelial. Otro de los factores que influyen en la alta prevalencia del SMet es la edad ya que el envejecimiento está asociado a un aumento del EO y a la progresión de la DE dependiente de la edad [93, 287-289].

Por otro lado, en regiones mediterráneas existe una baja tasa de mortalidad por ECV que podría explicarse en base a los efectos antiaterogénicos de la dieta Med cuyo componente graso principal es el aceite de oliva virgen. Entre sus efectos beneficiosos destaca la reducción del EO a través de la disminución de biomarcadores del mismo en plasma, así como la disminución en la expresión de genes de inflamación y

moléculas de adhesión endotelial y como resultado la prevención y mejora de la DE. La dieta Med mejora la función endotelial asociada a una mayor capacidad regenerativa del endotelio como resultado de un mejor balance entre daño y reparación. Los mecanismos implicados en estos procesos pueden estar asociados a una liberación reducida de radicales libres y a un menor EO debido a al efecto protector de los componentes antioxidantes del aceite de oliva [218, 269, 272].

Buena parte de los efectos beneficios del aceite de oliva virgen, se atribuyen a componentes minoritarios del mismo denominados compuestos fenólicos. De hecho, a nivel de endotelio vascular varios estudios han demostrado que tras la ingesta de una comida rica en aceite de oliva virgen con alto contenido de estos compuestos aumenta la capacidad antioxidante plasmática, disminuye la agregación plaquetaria y los factores de procoagulación [268, 290].

Por todo esto, nuestra hipótesis es que la ingesta de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva reduce el EO postprandial en el TA de personas de edad avanzada en comparación con una dieta occidental rica en grasa saturada o una dieta baja en grasas, rica en hidratos de carbono y ácidos grasos omega n-3, lo que a su vez explicaría la mejora de la función endotelial observada tras la ingesta de dieta Med, debido a una disminución de la producción de EO en TA. Además, existe suficiente base científica para pensar que el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva podría ser determinante en este proceso y su efecto inducir una mejora en la función endotelial.

IV.OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Evaluar el efecto de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre la expresión postprandial de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa 1 y 2, glutatión peroxidasa y tioredoxina reductasa) en tejido adiposo de personas de edad avanzada comparado con el efecto de una dieta occidental rica en grasa saturada y una dieta baja en grasa, rica en hidratos de carbono y ácidos grasos PUFA n-3.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- a. Determinar el efecto de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre la expresión postprandial del complejo enzimático NADPH-oxidasa en tejido adiposo de personas de edad avanzada comparado con el efecto de una dieta occidental rica en grasa saturada y una dieta baja en grasa, rica en hidratos de carbono y ácidos grasos PUFA n-3.
- b. Analizar el efecto de una dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen sobre el estado oxidativo evaluado por la concentración plasmática de glutatión reducido (GSH) y total, así como por el nivel de lipoperóxidos e isoprostanos en orina de personas de edad avanzada.
- c. Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos biodisponibles del aceite de oliva virgen presentes en suero humano sobre el endotelio vascular y su relación con las enfermedades cardiovasculares.

V. DISEÑO Y METODOLOGÍA

1. MODULACIÓN POR LA DIETA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO EN PERSONAS DE EDAD AVANZADA

1.1 Selección de la población.

Los voluntarios fueron reclutados utilizando las bases de datos de pacientes atendidos en consultas de atención primaria, de consultas de Medicina Interna y mediante la difusión de la información del proyecto con carteles anunciadores y notas de prensa. Se contactó finalmente con 63 voluntarios, de los cuales 20 (10 hombres y 10 mujeres) cumplieron los criterios de inclusión y exclusión del estudio, siendo la presencia de diversas patologías la causa principal de esta exclusión inicial. A todos los voluntarios, previo a la inclusión en el estudio, se les realizó una historia clínica detallada y una analítica completa junto con un examen físico exhaustivo, recogiendo datos antropométricos (peso, altura, IMC, perímetro de cintura y de cadera) y medidas de presión arterial (PA).

1.2 Criterios de inclusión

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

- Hombres y mujeres con edad igual o superior a 65 años.
- Sin patología grave crónica asociada. Se permite la concomitancia de patologías tales como HTA y DM sin micro ni macroangiopatía, dislipemia, artropatías degenerativas, obesidad, hiperplasia benigna de próstata o insuficiencia venosa crónica.
- Índice de masa corporal comprendido entre 20-40 kg/m².
- Concentración de colesterol total igual o inferior a 8.0 mmol/L.
- No fumadores

1.3 Criterios de exclusión

De la misma forma, se establecieron los siguientes criterios de exclusión:

- Edad inferior a 65 años.
- Presencia de enfermedades crónicas tales como broncopatía, cardiopatía, hepatopatía, nefropatía, desórdenes endocrinos, enfermedades neurológicas, patología psiquiátrica que impida el correcto seguimiento del estudio o enfermedades inflamatorias de cualquier etiología.
- Anemia por deficiencia de hierro (hemoglobina <12 g/dL en hombres y <11 g/dL en mujeres).
- Prescripción de hipolipemiantes y anti-inflamatorios.
- Suplementos de ácidos grasos incluidos aceite de pescado.
- Consumidores de altas dosis de vitaminas antioxidantes (A, C, E, β -carotenos).
- Tabaquismo.
- Realización de ejercicio físico intenso más de tres veces en semana.
- Cambios en el peso iguales o superiores a 3 kg en los últimos 3 meses.
- Consumo de alcohol superior a 20 gramos/día.
- Consumo de drogas (según criterio clínico).

1.4 Cálculo del tamaño muestral.

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó utilizando la calculadora de tamaño muestral GRANMO (Versión 7.12 abril 2012) teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- **Variable principal del estudio:** expresión génica postprandial de la enzima antioxidante Catalasa en tejido adiposo tras la ingesta de una dieta Mediterránea.
- **Desviación estándar de la variable principal del estudio:** 1,9.
- **Diferencia mínima esperada:** 1,3 unidades ($H_0=3,20$; $H_1=4,50$).
- **Riesgo alfa:** 0,05.
- **Potencia ($1-\beta$):** 0,80.
- **Pérdidas estimadas:** 5%.

En base a estas premisas se necesitan al menos 18 sujetos.

1.5 Diseño de las dietas administradas

Los 20 voluntarios fueron aleatorizados para recibir, de forma sucesiva, y con un diseño cruzado, tres tipos de dietas isocalóricas y de diferente composición grasa, durante un periodo de cuatro semanas de duración cada una.

La composición de las tres dietas fue la siguiente:

- **Dieta Mediterránea rica en aceite de oliva virgen** (Dieta Med): con un 15% del aporte calórico total como proteínas, 47% como carbohidratos y 38% como grasa (24% de grasa

monoinsaturada (MUFA), <10% de grasa saturada (SAT) y 4% de grasa poliinsaturada (PUFA) con 0,4% de ácido α -linolénico).

- **Dieta rica en grasa saturada** (Dieta SAT): con un 15% del aporte calórico total como proteínas, 47% como carbohidratos y 38% como grasa (12% de MUFA, 22% de SAT y 4% de PUFA con 0,4% de ácido α -linolénico).
- **Dieta alta en carbohidratos y baja en grasa rica en PUFA** (Dieta CHO-PUFA): con un 15% del aporte calórico total como proteínas, 55% como carbohidratos y 30% como grasa (10% de SAFA, 12% de MUFA y 8% de PUFA con 2% de ácido α -linolénico).

La ingesta de colesterol se mantuvo constante a lo largo de los tres periodos de intervención dietética (<300 mg/día). La fuente principal de MUFA fue el aceite de oliva virgen. El enriquecimiento de la dieta CHO-PUFA en poliinsaturados se realizó a través del uso de componentes naturales de alimentos ricos en ácido α -linolénico de origen vegetal (*Juglans Regia L*) y la ingesta de carbohidratos se basó en el consumo de galletas, mermelada y pan. El 80% de MUFA de la dieta Med fue provista por aceite de oliva virgen, que se utilizó para cocinar y como aderezo de ensaladas. La principal fuente de grasa saturada de la diet SAT fue la mantequilla.

Las dietas se realizaron en base a 20 menús rotatorios, establecidos previamente, utilizando alimentos naturales y calibrados para administrar las proporciones establecidas en cada periodo de dieta. El cálculo de los nutrientes de cada una de las dietas del estudio se realizó de acuerdo a las tablas de alimentos del United States Department of Agriculture (USDA) (Human Nutrition Information Service, Department of Agriculture (1987) Composition of foods. US Government Printing Office, Washington, DC) y a las tablas españolas de composición de los alimentos[291].

Previo al inicio de cada periodo de intervención del estudio, todos los voluntarios completaron durante tres días un diario de consumo de alimentos en los que había que incluir pesos específicos de cada alimento ingerido y un extenso cuestionario de frecuencia de consumo de los alimentos, que permitía la identificación de posibles errores en la ingesta para ser corregidos. Al inicio de cada periodo de intervención a cada paciente se le proporcionó un cuaderno con información sobre la dieta a la que habían sido randomizados y se les dieron las pautas a seguir sobre el consumo de alimentos fuera del hogar, los cuales debían ser anotados en el cuaderno proporcionado con el fin de detectar incidencias en la alimentación. En este mismo momento, se les proporcionó también a los voluntarios los alimentos para las dos semanas siguientes (aceite de oliva virgen extra para la dieta Med y mantequilla para la dieta SAT).

Un día antes del momento de iniciar cada periodo de alimentación específico, se realizó una llamada telefónica a cada voluntario con el fin de recordar las pautas a seguir y motivarles en el cumplimiento correcto de la alimentación.

Los voluntarios tuvieron que completar el diario de tres días de consumo de los alimentos al inicio de cada periodo de intervención, a las dos semanas y a las cuatro semanas del inicio. La visita de las dos semanas también sirvió para motivar a los voluntarios, proporcionarles nuevos alimentos y para detectar posibles errores en el cumplimiento de las pautas de alimentación. Con el fin de determinar exactamente el consumo de alimentos de cada paciente se utilizó el programa informático Dietsource versión 2.0; Novartis, Barcelona, España.

Al final de cada periodo de intervención a todos los voluntarios se les administró una sobrecarga grasa en forma de desayuno con la misma composición que la dieta que habían seguido las 4 semanas previas. Para ello los voluntarios acudieron a nuestra Unidad a las 8:00 horas de la mañana, con un ayuno de 12 horas y una abstinencia alcohólica de al menos 7 días. A su llegada, a cada voluntario se le canalizó una vía venosa periférica y se extrajo una analítica basal. Posteriormente los voluntarios ingirieron el desayuno en un tiempo máximo de 20 minutos bajo supervisión. Tras la ingesta, se realizaron extracciones sanguíneas a las 2 y a las 4 horas.

1.6 Toma de muestras de sangre y orina

La sangre fue recogida en tubos que contenían 1 gramo de ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA)/L o en 3,8% de citrato, y fueron depositadas en contenedores con hielo y mantenidos en la oscuridad. Se tuvo especial cuidado en evitar la exposición de la muestra a la luz, al aire y a la temperatura ambiente. El plasma se separó de los glóbulos rojos por

centrifugación a 1500 g durante 15 minutos a 4°C en la primera hora tras la extracción.

Las muestras de orina se obtuvieron al final de cada período de intervención en el estado de ayunas y 4 horas después de la ingesta del desayuno.

1.7 Análisis de los parámetros lipídicos en sangre

La concentración de las diferentes variables lipídicas fue determinada utilizando un autoanalizador modular (DDPPII Hitachi; Roche®, Basel, Switzerland), utilizando agentes reactivos específicos suministrados por Boehringer-Mannheim®. El colesterol total (CT), TG y las fracciones lipoproteicas fueron determinados mediante procedimientos enzimáticos [292, 293]. Los niveles de Apo A1 y de Apo B se determinaron mediante inmunoturbidimetría. El HDL-c se determinó analizando el sobrenadante obtenido tras la precipitación de una alícuota con dextrano sulfato-Mg²⁺. Los niveles de LDL-c se determinaron mediante la fórmula de Friedewald basada en las concentraciones de CT, TG y c-HDL.

1.8 Toma de muestras de tejido adiposo subcutáneo

Las muestras de tejido adiposo subcutáneo se obtuvieron de la región abdominal lateral al ombligo con el instrumento Bard ® Magnum (ref. MG1522) y agujas Bard ® Core Magnum (ref. MN1410) (Sales M & I Medical, Inc., Miami, Florida, EE.UU.). Se obtuvieron muestras para el estudio de la función postprandial de los adipocitos a las 4 horas luego de la administración del desayuno. Inmediatamente después de la extracción, las muestras fueron almacenadas en tubos eppendorf con ARN later hasta la extracción de ARN.

1.9 Aislamiento de ARN del 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 obtenido se realizó usando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 v3.5.2 (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK).

1.10 Determinación de parámetros de estrés oxidativo en plasma y orina

Se calcularon los niveles de GSH y GSSG para determinar el GSH / GSSG en las muestras de plasma utilizando Bioxytech ® GSH-400 (Oxis International Inc., Portland, OR, EE.UU.) y GSH-412 Kit (Oxis International Inc., Portland, OR, EE.UU). El contenido de isoprostanos se midió en muestras de orina mediante el uso de BIOXYTECH 8-Isoprostane Assay Immunoassay for 8-epi-Prostaglandin F2a (OXIS International, Portland, OR). Las concentraciones plasmáticas de los productos de peroxidación lipídica (LPO) se midieron mediante el Bioxytech LPO-586 Kit (Oxis International Inc).

2. EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS BIODISPONIBLES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR

Dado que el aceite de oliva virgen es el componente principal de la dieta Mediterránea, y con el fin de evaluar los efectos de los compuestos fenólicos biodisponibles del mismo en el endotelio vascular, se ha incluido en el presente estudio una población con características diferentes y a la que se sometió a otro tipo de intervención dietética, las cuales se describen a continuación.

2.1 Selección de la población

La población de esta sección del presente trabajo procedió de un estudio perteneciente al Plan Andaluz de Investigación 2005-2006 titulado: *“Interacción entre el polimorfismo Glu/Val en el gen de la óxido nítrico sintasa y la ingesta de aceite de oliva virgen en personas con riesgo cardiovascular”*. Formó parte de este estudio una subpoblación de 20 voluntarios que asistió a las consultas externas de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía con criterios definitorios de SMet a los cuales se les administraron dos diferentes tipos de desayuno basados en aceite de oliva virgen con distintas concentraciones de compuestos fenólicos.

2.2 Criterios de inclusión

Se establecieron los siguientes criterios de selección para participar en el estudio:

- Edad entre 18 y 80 años
- Al menos 3 de los siguientes criterios:
 - a. $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ o perímetro de cintura $> 88 \text{ cm}$ (mujeres) ó $>102 \text{ cm}$ (hombres);
 - b. concentración plasmática de glucosa en ayunas $\geq 110 \text{ mg/dL}$;
 - c. concentración plasmática de triglicéridos en ayunas $\geq 150 \text{ mg/dL}$ ó concentración plasmática de HDL-colesterol $\leq 40 \text{ mg/dL}$ (hombres) y $\leq 50 \text{ mg/dL}$ (mujeres);
 - d. cifras de tensión arterial sistólica/diastólica mayores a 130 y 85 mmHg respectivamente.

2.3 Criterios de exclusión

- Mujeres embarazadas o en período de lactancia.
- Diabetes mellitus tipo 1 ó 2.
- Concentración plasmática de colesterol total en ayunas $\geq 200 \text{ mg/dL}$.
- Consumo habitual de tabaco, complejos vitamínicos o más de 30 g (hombres) ó 20 g (mujeres) de alcohol.
- Mostrar evidencia de enfermedad crónica o consumo de medicamentos.

2.4 Diseño de la intervención

Antes de la intervención, los participantes siguieron un período de lavado de 6 semanas de duración en el que fueron instruidos para no tomar vitaminas, suplementos de soja o cualquier medicamento. Para eliminar el efecto potencial que pudieran tener sus hábitos alimentarios normales, todos los sujetos siguieron una dieta baja en grasa y rica en carbohidratos hasta el final del estudio. El cumplimiento de la dieta fue evaluado después de dos y cuatro semanas utilizando un cuestionario de frecuencia de alimentos. 24 horas antes de cada desayuno, los participantes recibieron instrucciones para evitar el consumo de alimentos ricos en fenoles como frutas o zumos, vino, zumo de uvas, chocolate, café, té, aceite de oliva o soja, y para abstenerse de hacer ejercicio físico intenso. Al finalizar el período de lavado y tras un ayuno de 12 horas, los sujetos recibieron dos desayunos consistentes en 60 gr de pan blanco, 40 ml de aceite de oliva virgen (CANOLIVA ®, Antonio Cano e hijos TM, Córdoba-España) con alto (398 ppm), intermedio (200 ppm) o bajo (70 ppm) contenido en compuestos fenólicos y 60.000 UI de vitamina A por m² de superficie corporal. Durante las 4 horas de estudio, los participantes no realizaron actividad física ni consumieron nada más que agua.

La administración de los aceites se realizó en días diferentes separados por intervalo de 24 horas. Los participantes se asignaron a tres grupos de intervención de forma aleatorizada y cruzada siguiendo un modelo de cuadrados latinos. De este modo, se les administró tres desayunos basados en aceite de oliva virgen con diferente contenido en compuestos fenólicos según el siguiente esquema:

	Aceites		
	70 ppm	200 ppm	398ppm
Grupo A	1 ^{er} día	2 ^{do} día	3 ^{er} día
Grupo B	3 ^{er} día	2 ^{do} día	1 ^{er} día
Grupo C	1 ^{er} día	3 ^{er} día	2 ^{do} día

Para este estudio hemos seleccionado solo los grupos que recibieron los desayunos preparados con los aceites con alto y bajo contenido en compuestos fenólicos de manera a analizar el efecto de la concentración de los mismos en el endotelio vascular.

2.5 Características de los aceites

El aceite de oliva con bajo contenido en compuestos fenólicos se obtuvo por extracción física de la mayoría de los del aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos, de manera que los aceites conservaron una composición similar en cuanto a macro y micronutrientes a excepción del contenido. El contenido de hidroxitirosol fue de 0,2 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ y 45,4 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ en el aceite de bajo y alto contenido en compuestos fenólicos respectivamente.

2.6 Toma de muestras de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre venosa en estado de ayunas, a las 2 y 4 horas tras la ingesta de cada desayuno que se recogieron en tubos que contenían 1 g de EDTA/L y heparina y se almacenaron en contenedores con hielo en la oscuridad. Se tuvo especial cuidado para evitar la exposición al aire, a la luz y a la temperatura ambiente. El suero se separó de la sangre entera por centrifugación a baja velocidad a 1500 $\times g$ por 15 minutos a 4 °C dentro de la hora después de la extracción.

Se prepararon *pools* que contenían 0,5 ml de cada muestra de suero según el aceite y por tiempos: en ayunas, 2 y 4 horas tras la ingesta de los desayunos.

2.7 Cultivos celulares y tratamiento de las células con suero de pacientes

Para evaluar de qué modo afecta al endotelio vascular el contenido en compuestos fenólicos biodisponibles del aceite de oliva virgen presentes en el suero humano, se procedió al cultivo de células de vena umbilical humana (HUVEC) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc) .

Las células fueron cultivadas en medio basal de cultivo endotelial (EMB, Lonza Walkersville, Inc) suplementado al 10% de suero FBS, hEGF, hidrocortisona, GA-1000, VEGF, hFGF- β , R³-IGF-1 y heparina en atmósfera humidificada (37°C, 5% CO₂). El medio de cultivo se cambió cada 2 días y antes de alcanzar la confluencia, se recogieron las células utilizando tripsina-EDTA (Lonza Walkersville, Inc) para despegarlas del matraz de cultivo. Las células recogidas de esta forma, se sembraron en placas de 24 pocillos para tratarlas posteriormente con los *pools* preparados con los sueros obtenidos de la población tras la ingesta de los desayunos.

En las placas de 24 pocillos, y una vez las HUVEC alcanzaron la confluencia, el medio fue reemplazado por uno suplementado al 10% con los *pools* de sueros obtenidos de la población (5,4 ml de EBM no suplementado y 0,6 ml de *pool* de suero por cada tiempo y aceite). El tratamiento de las células con suero humano se realizó durante 24 horas bajo las mismas condiciones ambientales mencionadas anteriormente. Cada tratamiento según aceite y tiempo, se realizó por triplicado. La

viabilidad celular se comprobó a través del ensayo 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT).

2.8 Aislamiento de ARN

La extracción de ARN total se realizó utilizando trizol (TRI Reagent, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) y se purificó utilizando el kit RNeasy MiniElute Cleanup (Qiagen, Hilden, Germany). El ARN obtenido se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 v3.5.2 (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK).

2.9 Expresión génica mediante PCR en tiempo real

La reacción de retrotranscripción se realizó a partir de 1 µg de ARN total con el kit comercial iScript® Kit de Síntesis de ADNc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el ciclador OpenArray™ NT (Applied Biosystems, San Diego, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis de expresión génica se llevó a cabo en las muestras de los sujetos por duplicado.

2.9.1 Análisis en tejido adiposo

Los cebadores fueron seleccionados de los ensayos de base de datos de expresión genética TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.) <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>, para los siguientes genes: superóxido dismutasa 1 (SOD1), superóxido dismutasa 2 (SOD2), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa 1 (GPX1), glutatión peroxidasa 3 (GPx3), glutatión peroxidasa 4 (GPx4), tiorredoxina (TXN) y tiorredoxina reductasa 1 (TrxR) y para las subunidades de la NADPH oxidasa (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y p40^{phox}). La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando la

proteína ribosómica, P0 (RPLP0) como gen constitutivo. Los datos fueron analizados mediante el OpenArray® Real-Time Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU).

2.9.2 Análisis en HUVEC

Los cebadores fueron seleccionados de los ensayos de base de datos de expresión genética TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU.), <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>, para los siguientes genes: genes inflamatorios *IKKa* (*Hs00175141_m1*), *IKKb* (*Hs00233287_m1*), *p65*(*Hs00153294_m1*), *IkBa*(*Hs00153283_m1*), *MCP-1*(*Hs00234140_m1*), *IL-6*(*Hs00174131_m1*) y *CXCL1*(*Hs00236937_m1*), enzimas pro-oxidantes *p22^{phox}* (*Hs03044361_m1*), *gp91^{phox}* (*Hs00166163_m1*), *COX4I1* (*Hs00971639_m1*), *MT-CYB* (*Hs02596867_s1*), *NADH* (*Hs00942568_m1*) y *SDHA* (*Hs00188166_m1*), y enzimas antioxidantes *SOD1* (*Hs00916176_m1*), *SOD2* (*Hs00167309_m1*), *CAT* (*Hs00156308_m1*), *Gpx1* (*Hs00829989_g1*), *Gpx4* (*Hs00989766_g1*) y *TXNRD1* (*Hs00917067_m1*). La expresión relativa de cada gen se calculó utilizando *GADPH* como gen constitutivo. Los datos fueron analizados mediante el OpenArray® Real-Time Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU).

2.10 Análisis estadísticos

Para las comparaciones estadísticas se utilizó el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 17.0 for Windows Inc., Chicago, Illinois). La distribución normal de las variables fue evaluada a través del test de Kolmogorov-Smirnov.

La expresión génica postprandial en tejido adiposo se analizó utilizando el análisis de varianza (ANOVA), para el análisis de la expresión génica postprandial, y ANOVA para medidas repetidas para determinar el efecto de las dietas sobre los niveles de GSH, ratio GSH:GSSG y niveles de lipoperóxidos e isoprostanos.

La expresión génica de las HUVEC fue analizada mediante el ANOVA de un factor. Se realizaron análisis post-hoc utilizando el test de Bonferroni para detectar variaciones significativas entre los tratamientos.

Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Todos los datos presentados en el texto y tablas son medias \pm el error estándar de la media (\pm ES).

VI. RESULTADOS

1. MODULACIÓN POR LA DIETA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO

Para llevar a cabo este estudio se seleccionaron 20 voluntarios (10 hombres y 10 mujeres) de edad avanzada (edad igual o mayor a 65 años) los cuales completaron satisfactoriamente cada uno de los periodos de intervención dietética descritos anteriormente.

Las características antropométricas y parámetros lipídicos basales de la población se muestran en la **tabla 5**.

Tabla 5. Características antropométricas y parámetros lipídicos basales de los voluntarios que completaron el estudio.

	<i>n=20</i>
IMC (kg/m ²)	31,85±5,51
Perímetro de cintura (cm)	101±12,90
Tensión arterial sistólica (mmHg)	147,20±16,57
Tensión arterial diastólica mmHg	87,50±16,42
Glucosa (mg/dL)	97,32±14,78
Insulina (mU/ml)	9,44±4,04
Colesterol total (mg/dL)	181,42±21,86
Triglicéridos (mg/dL)	90,36±33,22
LDL-colesterol (mg/dL)	110,94±22,53
HDL-colesterol (mg/dL)	51,98±9,23

1.1 Expresión génica del complejo enzimático NADPH-oxidasa en tejido adiposo

En primer lugar hemos analizado el efecto de cada uno de los tres modelos de dieta en la expresión génica de las sub-unidades del complejo enzimático NADPH-oxidasa (p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y gp91^{phox}) 4 horas tras de la ingesta de una comida test con composición grasa similar a la del período dietético finalizado **Tabla 6**.

El consumo de la dieta Med disminuyó los niveles postprandiales del ARNm de la sub-unidad p47^{phox} en comparación con el consumo de las dietas SAT y CHO-PUFA (p=0,022 y p=0,044 respectivamente) y que incrementó los niveles de ARNm de la sub-unidad p22^{phox} en comparación con el consumo de la dieta CHO-PUFA (p=0,001). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles postprandiales del ARNm de las sub-unidades p40^{phox}, p67^{phox} y gp91^{phox} tras el consumo de las distintas dietas.

Tabla 6. Niveles postprandiales de expresión génica de las subunidades del complejo enzimático NADPH-oxidasa en tejido adiposo*.

Genes	Dieta SAT	Dieta Med	Dieta CHO-PUFA	p⁺
gp91phox	0.016 ± 0.004	0.029 ± 0.006	0.017 ± 0.006	0.293
p22phox	0.029 ± 0.007 ^{a,b}	0.062 ± 0.010 ^a	0.016 ± 0.002 ^b	0.001
p47phox	0.003 ± 0.001 ^a	0.000 ± 0.000 ^b	0.002 ± 0.001 ^a	0.008
p40phox	0.012 ± 0.001	0.034 ± 0.004	0.034 ± 0.017	0.205
p67phox	0.003 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.756

* Todos los valores están presentados como media ± ES de los niveles de RNAm 4 horas luego de la ingesta de un desayuno con composición grasa similar al período dietético finalizado. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con n-3 PUFA.

⁺ ANOVA de un factor. Las filas con superíndices diferentes corresponden a diferencias estadísticamente significativas entre dietas en el análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni ($p < 0,005$).

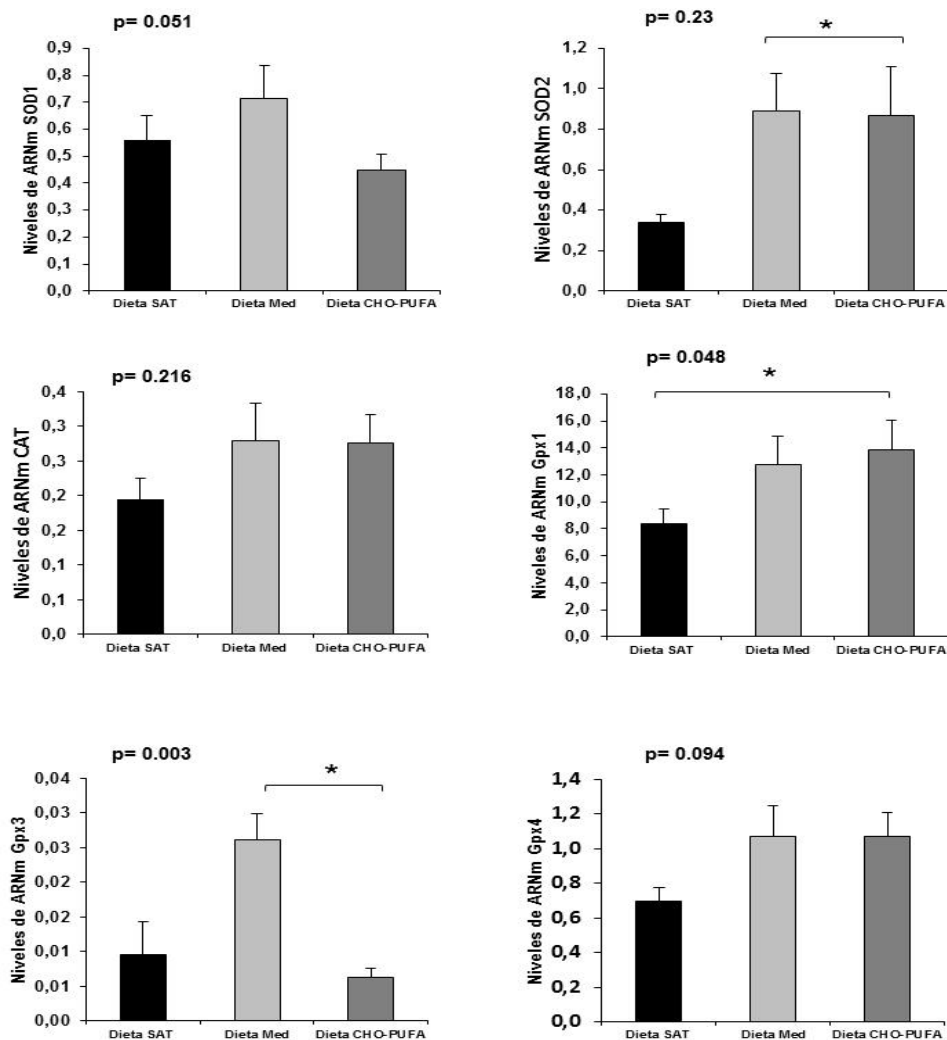
1.2 Expresión génica de enzimas antioxidantes en tejido adiposo

Hemos estudiado el efecto de cada uno de los tres modelos de dieta en la expresión génica postprandial de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, CAT, GPx1, GPx3 y GPx4 (**Figura 5**). Las enzimas antioxidantes SOD, Gpx y Catalasa son consideradas como la primera línea de defensa contra las ROS que se generan durante el EO. La SOD convierte el $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 que a su vez se convierte en agua y oxígeno molecular por acción de la Catalasa o Gpx.

Tras el consumo de la dieta Med hemos observado mayores niveles postprandiales de ARNm de SOD2 que tras el consumo de la dieta SAT. ($p=0,016$), así como mayores niveles postprandiales de ARNm de GPx3 tras el consumo de la dieta CHO-PUFA que tras el consumo de la dieta CHO-PUFA ($p=0,001$). Por otra parte, se encontraron que los niveles postprandiales de ARNm de GPx1 fueron más altos tras el consumo de la dieta CHO-PUFA que tras el consumo de la dieta SAT ($p=0,048$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión génica postprandial de SOD1, CAT y GPx4 entre las dietas.

Figura 5. Niveles postprandiales de expresión génica de enzimas antioxidantes en tejido adiposo ⁺.



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES de los niveles de RNAm 4 horas luego de la ingesta de un desayuno con composición grasa similar al período dietético finalizado. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con n-3 PUFA.

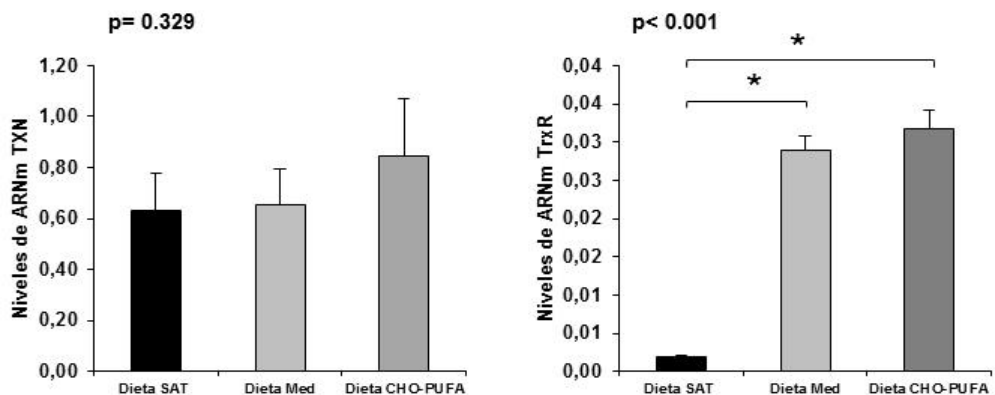
* ANOVA de un factor. $p < 0,005$ entre las dietas en el análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni.

1.3 Expresión génica de proteínas antioxidantes y de regulación redox en tejido adiposo

Nuestro estudio también estudió la expresión génica de la TXN, una proteína redox pequeña envuelta en la detoxificación de las ROS y de la TrxR, la enzima que reduce la tiorredoxina de su forma oxidada a su forma reducida, la cual se activa en presencia de ROS (**Figura 6**).

Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ARNm de TXN entre dietas, se observaron mayores niveles de ARNm de *TrxR* tras el consumo de la dieta Med y de la dieta CHO-PUFA en comparación al consumo de la dieta SAT ($p < 0,001$ para ambas).

Figura 6. Niveles postprandiales de expresión génica de proteínas antioxidantes y de regulación redox en tejido adiposo ⁺.



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES de los niveles de RNAm 4 horas luego de la ingesta de un desayuno con composición grasa similar al período dietético finalizado. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con n-3 PUFA.

* ANOVA de un factor. $p < 0,005$ entre las dietas en el análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni.

1.4 Dieta y parámetros plasmáticos de estrés oxidativo

Con el fin de evaluar el efecto de las diferentes dietas sobre los parámetros de estrés oxidativo, hemos determinado los niveles plasmáticos de GSH y el ratio GSH/GSSG, los cuales son parámetros que reflejan el estado redox [294].

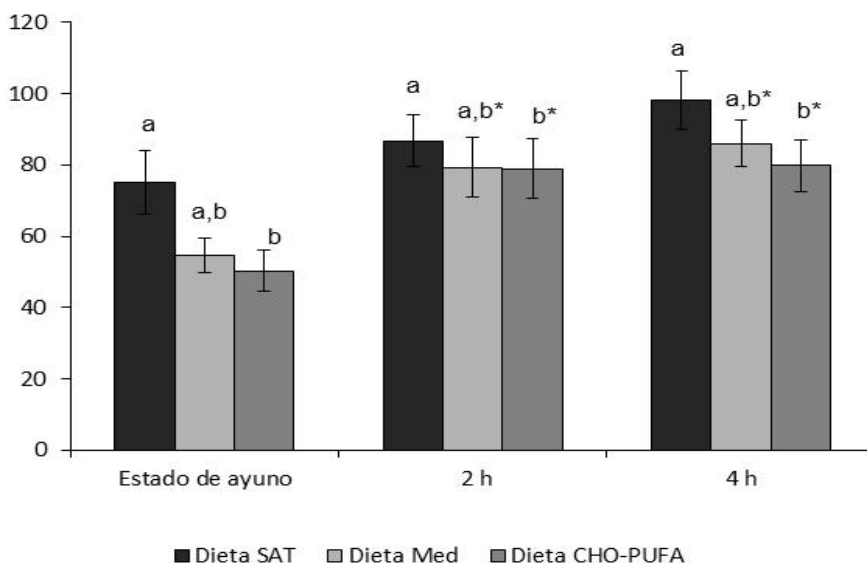
Tras la ingesta de las comidas test correspondientes a las dietas Med y CHO-PUFA hemos observado un incremento postprandial en la concentración plasmática de la GSH ($p=0,005$ entre valores a las 2 y 4 horas tras la ingesta de las comidas respecto al estado de ayuno), mientras que no encontramos ningún cambio tras la ingesta del desayuno correspondiente a la dieta SAT (**Figura 7**).

Figura 7. Niveles plasmáticos de GSH (μM) ⁺.

P1=0.012

P2<0.001

P3=0.490

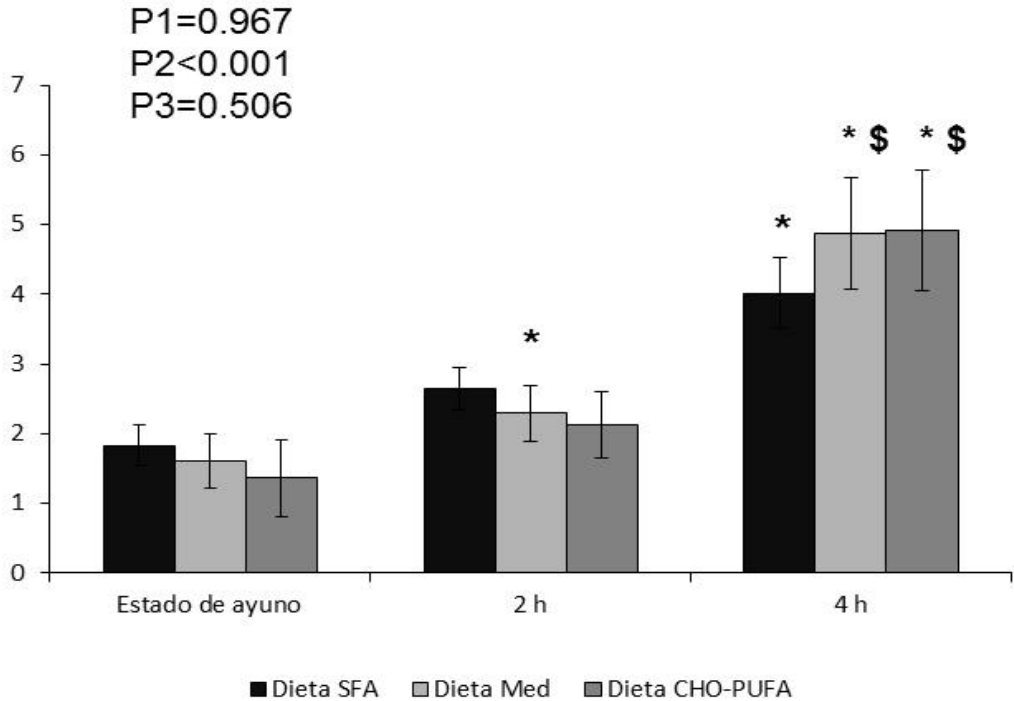


⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES. ANOVA para medidas repetidas. Valores de *p* globales: P1: efecto de la dieta; P2: efecto del tiempo; P3: interacción dieta-tiempo. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con *n*-3 PUFA.

* $p < 0,005$ vs el estado de ayuno. Barras con diferentes letras difieren significativamente entre sí en el análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni ($p < 0,005$).

Además, la relación GSH/GSSG aumentó a las 2 horas tras la ingesta del desayuno de la dieta Med ($p=0,024$) respecto al estado de ayuno, mientras que no mostró cambios significativos tras la ingesta de las comidas test de las dietas SAT y CHO-PUFA. Sin embargo, la relación GSH/GSSG aumentó a las 4 horas tras la ingesta de todas las comidas test ($p=0,004$, $p=0,002$ y $p=0,004$ para las dietas SAT, Med y CHO-PUFA respectivamente). Igualmente, tras la ingesta de las comidas test correspondientes a las dietas Med y CHO-PUFA hemos observado un mayor incremento de la relación GSH/GSSG a las 4 horas que de la relación obtenida a las 2 horas ($p=0,025$ y $p=0,010$ respectivamente) (**Figura 8**).

Figura 8. Relación GSH/GSSG ⁺.

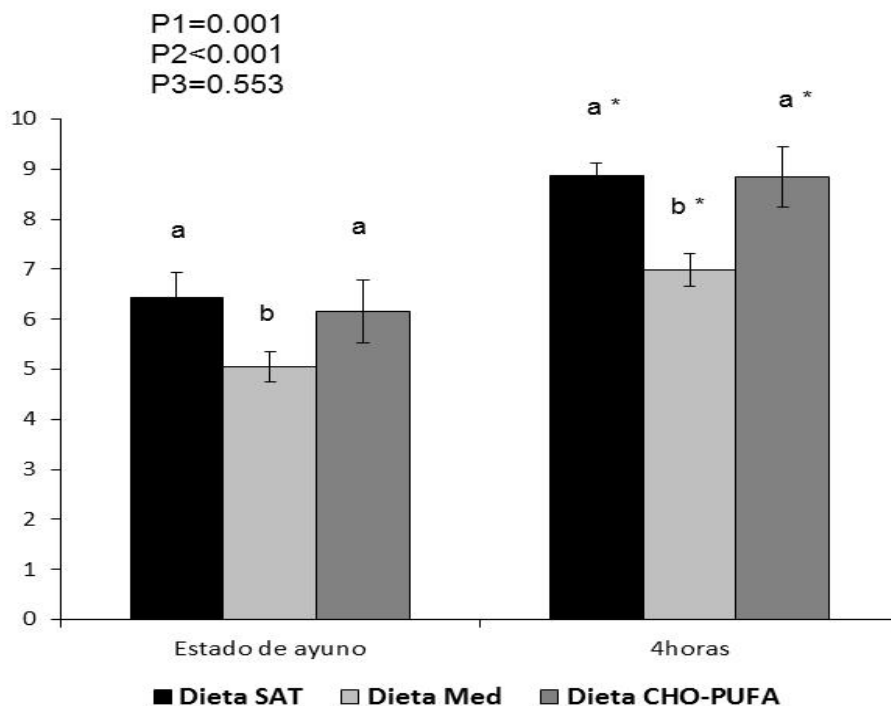


⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES. ANOVA para medidas repetidas. Valores de p globales: P1: efecto de la dieta; P2: efecto del tiempo; P3: interacción dieta-tiempo. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con n-3 PUFA.

Análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0,005$ vs el estado de ayuno. $^{\$}$ $p < 0,005$ vs 2 hs luego de la ingesta del desayuno.

También se analizaron los niveles en orina de isoprostanos y los niveles plasmáticos de lipoperóxidos al término de cada período de intervención dietética en los estados de ayuno y postprandial. Hemos observado que los niveles en orina de isoprostanos aumentaron en el estado postprandial tras el consumo de cualquiera de las dietas ($p < 0,001$) y el análisis estadístico post hoc, mostró que tomando los valores de los estados de ayuno y postprandial, el consumo de la dieta Med indujo menores niveles de isoprostanos que el consumo de las dietas SAT y CHO-PUFA ($p = 0,001$ y $p = 0,025$ respectivamente) (**Figura 9**).

Figura 9. Niveles en orina de isoprostanos (ng/L) ⁺.

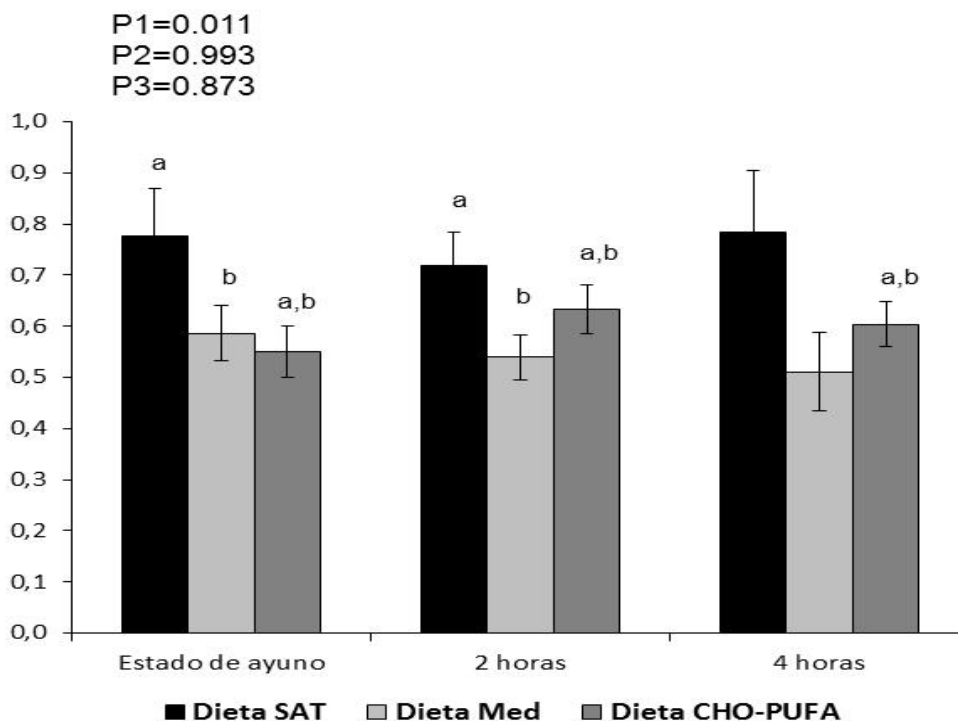


⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES. ANOVA para medidas repetidas. Valores de *p* globales: P1: efecto de la dieta; P2: efecto del tiempo; P3: interacción dieta-tiempo. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con *n*-3 PUFA.

* *p*<0,005 vs el estado de ayuno. Barras con diferentes letras difieren significativamente entre sí en el análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni (*p*<0,005).

Comparando los valores del estado de ayuno y los valores postprandiales, hemos observado menores niveles plasmáticos de lipoperóxidos tras el consumo de la dieta Med que tras el consumo de la dieta SAT ($p=0,031$) (**Figura 10**).

Figura 10. Niveles plasmáticos de lipoperóxidos (nmol/L) ⁺.



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES. ANOVA para medidas repetidas. Valores de p globales: P1: efecto de la dieta; P2: efecto del tiempo; P3: interacción dieta-tiempo. Dieta Med; dieta Mediterránea rica en MUFA; Dieta SAT: dieta rica en grasas saturadas; Dieta CHO-PUFA: dieta alta en carbohidratos, baja en grasa y enriquecida con $n-3$ PUFA.

* $p < 0,005$ vs el estado de ayuno. Barras con diferentes letras difieren significativamente entre sí en el análisis post hoc utilizando el test de comparación múltiple de Bonferroni ($p < 0,005$).

1.5 Relación entre la expresión génica postprandial de enzimas antioxidantes en tejido adiposo y biomarcadores de estrés oxidativo

En nuestro estudio también hemos analizado la relación entre la expresión génica de enzimas antioxidantes en tejido adiposo (niveles de ARNm de CAT, SOD1, SOD2, GPx1, GPx3, GPx4, TXN y TxrR) y la concentración postprandial de isoprostanos y lipoperóxidos, y el ratio GSH/GSSG (**Tabla 7**).

Los análisis de correlación mostraron una correlación negativa entre la expresión génica postprandial de la GPx3 y la concentración en orina de isoprostanos ($r: -0,536, p < 0,001$), una correlación negativa entre la expresión génica postprandial de la TxrR y la concentración plasmática de lipoperóxidos ($r: -0,261, p = 0,053$) y una correlación positiva entre la expresión génica postprandial de la GPx4 y la relación GSH/GSSG ($r: 0,324, p = 0,011$).

Tabla 7. Correlación entre la expresión génica de enzimas antioxidantes en tejido adiposo y biomarcadores de estrés oxidativo en estado posprandial (hora 4)*.

	<i>Isoprostanos</i>	<i>Lipoperóxidos</i>	<i>GSH:GSSG</i>
<i>CAT</i>	0.016 <i>p=0.899</i>	-0.127 <i>p=0.355</i>	0.156 <i>p=0.234</i>
<i>SOD1</i>	-0.212 <i>p=0.102</i>	0.021 <i>p=0.878</i>	-0.025 <i>p=0.847</i>
<i>SOD2</i>	0.196 <i>p=0.133</i>	-0.143 <i>p=0.294</i>	-0.098 <i>p=0.454</i>
<i>GPx1</i>	-0.048 <i>p=0.714</i>	0.186 <i>p=0.174</i>	0.009 <i>p=0.946</i>
<i>GPx3</i>	-0.536 <i>p<0.001</i>	0.044 <i>p=0.786</i>	-0.037 <i>p=0.816</i>
<i>GPx4</i>	0.029 <i>p=0.824</i>	-0.026 <i>p=0.845</i>	0.324 <i>p=0.011</i>
<i>TXN</i>	0.019 <i>p=0.885</i>	-0.118 <i>p=0.390</i>	0.034 <i>p=0.799</i>
<i>TxrR</i>	-0.173 <i>p=0.184</i>	-0.261 <i>p=0.053</i>	0.074 <i>p=0.570</i>

* Coeficiente de correlación lineal de Pearson

2. EFECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS BIODISPONIBLES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR

Teniendo en cuenta que el aceite de oliva virgen es el componente principal de la dieta Mediterránea y con el fin de evaluar los efectos de los compuestos fenólicos biodisponibles del mismo en el endotelio vascular, hemos incluido en el presente trabajo el estudio de cultivos realizados con una línea estable de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratadas con suero provenientes de pacientes con diagnóstico de SMet a los que se les administró previamente dos desayunos; uno preparado con aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos y otro preparado con aceite de oliva virgen con bajo contenido en compuestos fenólicos.

Las características antropométricas y los parámetros lipídicos basales de la población se muestran en la **tabla 8**.

Tabla 8. Características basales de los pacientes con SMet que completaron el estudio.

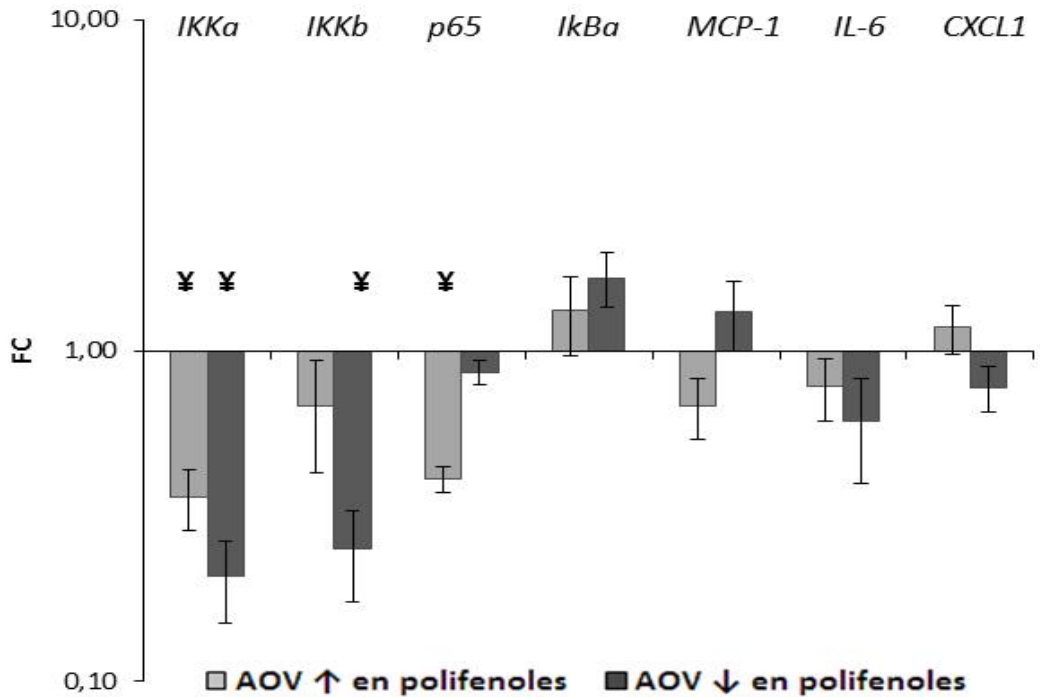
	n=20
IMC (kg/m²)	38,98 (27,95-44,42)
Perímetro de cintura (cm)	132,2 (103-137)
Tensión arterial sistólica (mmHg)	146 ±19
Tensión arterial diastólica mmHg	89±10
Glucosa (mg/dL)	102,8±17
Insulina (mU/ml)	11,5±6,5
Colesterol total (mg/dL)	201,7±27,1
Triglicéridos (mg/dL)	185±78
LDL-colesterol (mg/dL)	120,3±19,7
HDL-colesterol (mg/dL)	50,7±11,8

2.1 Efecto de los compuestos fenólicos en la expresión de genes inflamatorios

En primer lugar, hemos analizado la expresión de genes relacionados con la inflamación que tienen marcada implicación en los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de la arteriosclerosis [295].

Nuestro estudio mostró que el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de IKKa, p65 y MCP-1 ($p=0,001$; $p=0,001$ y $p=0,053$ respectivamente) en comparación con las células tratadas con el suero obtenido en estado de ayunas. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con el suero obtenido a las 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos se observó una disminución en la expresión génica de IKKa e IKKb ($p=0,001$ en ambos casos) (**Figura 11**).

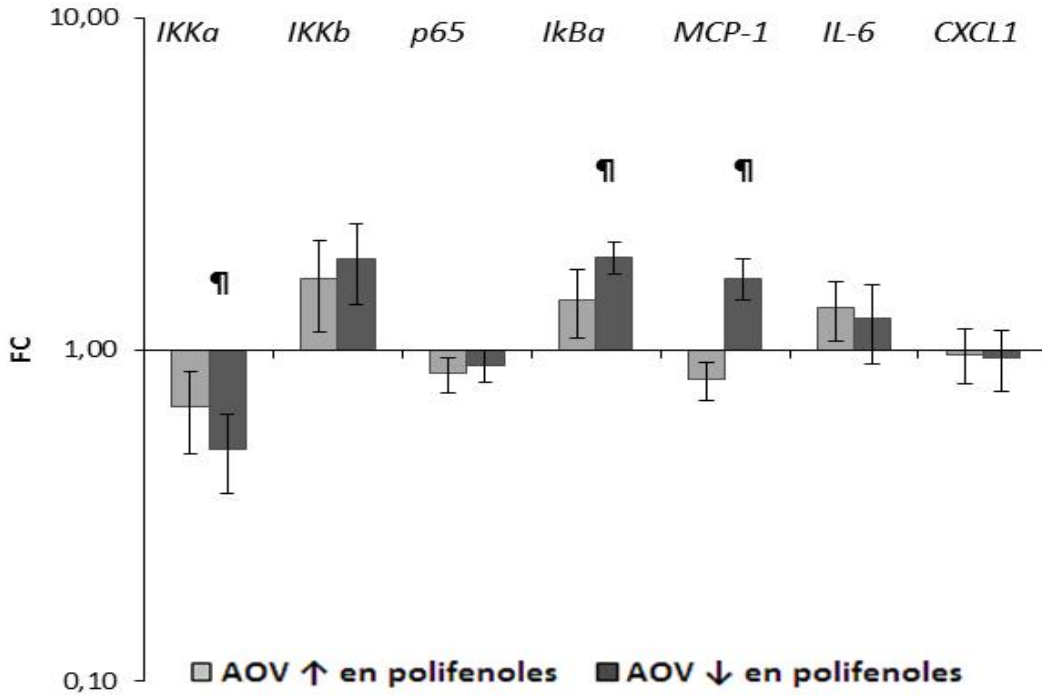
Figura 11. Expresión de genes inflamatorios en células endoteliales (2 horas vs estado de ayunas)⁺.



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica luego del tratamiento de las células con los sueros obtenidos de los pacientes a las 2 hs post-desayuno en comparación con el estado de ayunas que se calculó dividiendo la expresión génica a las 2 hs por la obtenida en el estado de ayunas. ANOVA de un factor. ¥ $p < 0,005$ 2 hs vs el estado de ayunas.

Además, cuando las HUVEC fueron tratadas con el suero obtenido a las 4 horas luego de la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos, se observó un incremento en la expresión génica de *IκBα* y *MCP-1* ($p=0,002$ y $p=0,024$ respectivamente) y una disminución en la expresión génica de *IKKα* ($p=0,006$) en comparación con las células tratadas con el suero obtenido en estado de ayunas (**Figura 12**).

Figura 12. Expresión de genes inflamatorios en células endoteliales (4 horas vs estado de ayunas)⁺.



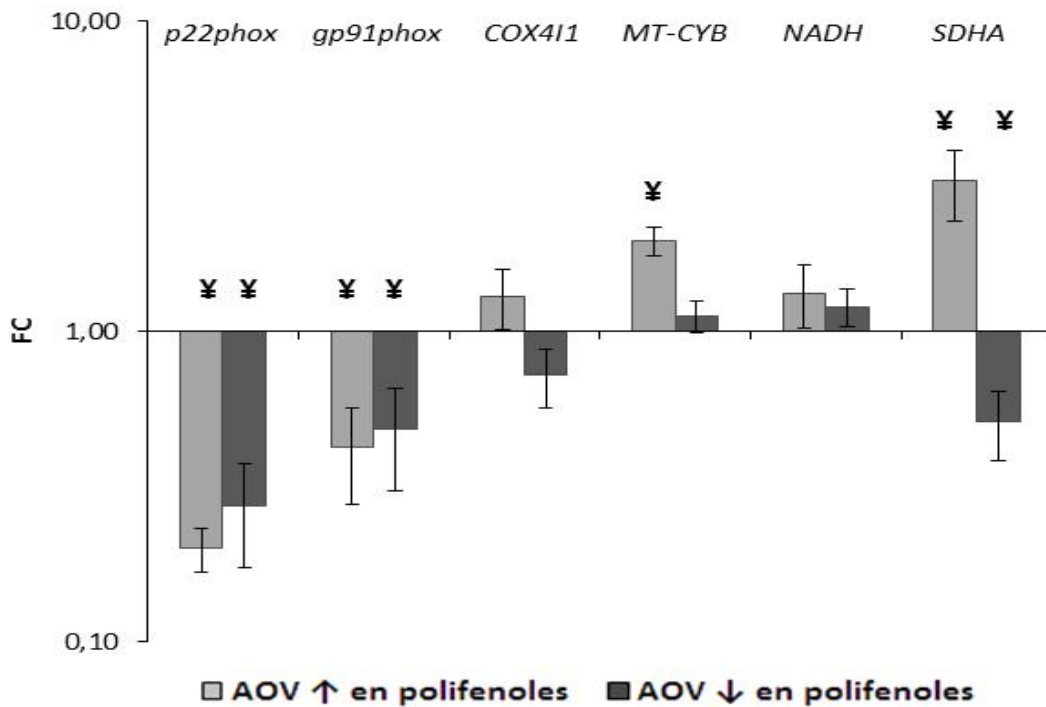
⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica luego del tratamiento de las células con los sueros obtenidos de los pacientes a las 4 hs post-desayuno en comparación con el estado de ayunas que se calculó dividiendo la expresión génica a las 4 hs por la obtenida en el estado de ayunas. ANOVA de un factor. ¶ $p < 0,005$ 4 hs vs el estado de ayunas.

2.2 Efecto de los compuestos fenólicos en la expresión génica de enzimas pro-oxidantes y genes de la cadena respiratoria.

Otros grupos de genes cuya expresión hemos analizado en este trabajo fueron el de las subunidades del complejo enzimático NADPH-oxidasa y aquellos implicados en la cadena mitocondrial de los electrones.

Nuestro estudio mostró que el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido a las 2 horas tras la ingesta de ambos tipos de desayuno disminuyó la expresión génica de las sub-unidades p22^{phox} y gp91^{phox} del complejo enzimático NADPH-oxidasa en comparación con las tratadas con el suero obtenido en estado de ayunas ($p < 0,001$ y $p = 0,004$ respectivamente para el suero obtenido tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido en compuestos fenólicos; $p < 0,001$ y $p = 0,018$ respectivamente para el suero obtenido tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos). Además, observamos un aumento de la expresión génica de MT-CYB y SDHA cuando las células fueron tratadas con el suero obtenido a las 2 horas después de la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido en compuestos fenólicos en comparación con las tratadas con el suero obtenido en estado de ayunas ($p = 0,002$ y $p = 0,030$ respectivamente), mientras que aquellas tratadas con el suero obtenido a las 2 horas luego de la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de SDHA en comparación con las tratadas con el suero obtenido en estado de ayunas ($p = 0,006$) (**Figura 13**).

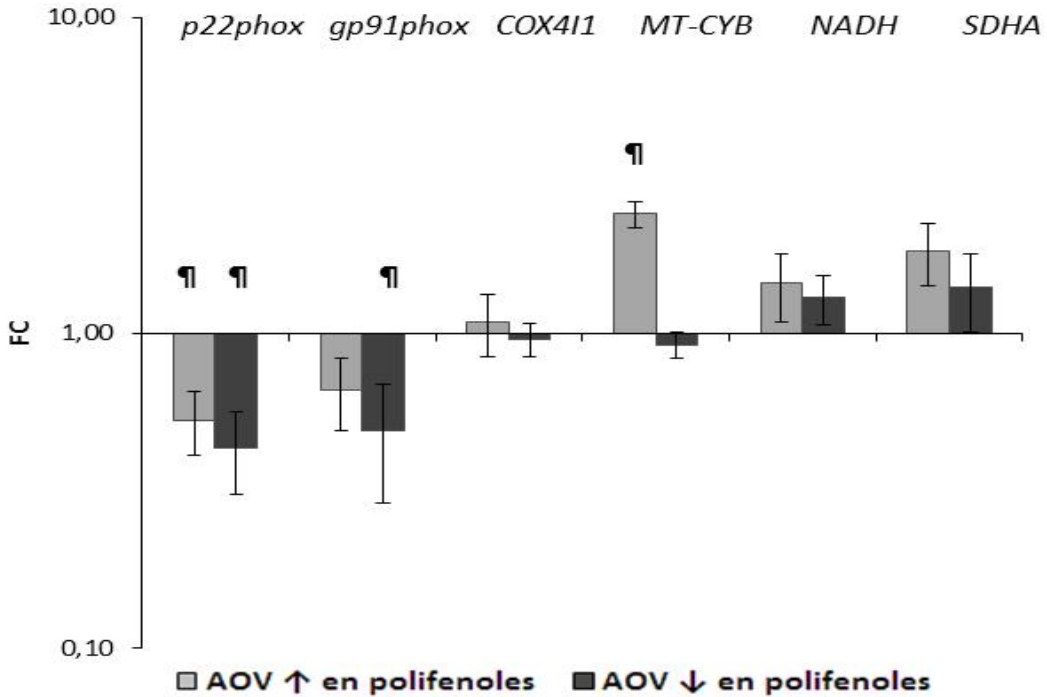
Figura 13. Expresión génica de enzimas pro-oxidantes y de genes de la cadena respiratoria en células endoteliales (2 horas vs estado de ayunas)



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica luego del tratamiento de las células con los sueros obtenidos de los pacientes a las 2 hs post-desayuno en comparación con el estado de ayunas que se calculó dividiendo la expresión génica a las 2 hs por la obtenida en el estado de ayunas. ANOVA de un factor. ¥ $p < 0,005$ 2 hs vs el estado de ayunas.

Por otra parte, las HUVEC tratadas con el suero obtenido a las 4 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de la sub-unidad p22^{phox} del complejo enzimático NADPH-oxidasa y aumentó la de MT-CYB (p=0,005 y p=0,001 respectivamente) mientras que las HUVEC tratadas con el suero obtenido a las 4 horas tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de las sub-unidades p22^{phox} y gp91^{phox} (p=0,004 y p=0,033 respectivamente) en comparación a las células tratadas con el suero obtenido en estado de ayuno (**Figura 14**).

Figura 14. Expresión génica de enzimas pro-oxidantes y de genes de la cadena respiratoria en células endoteliales (4 horas vs estado de ayunas)



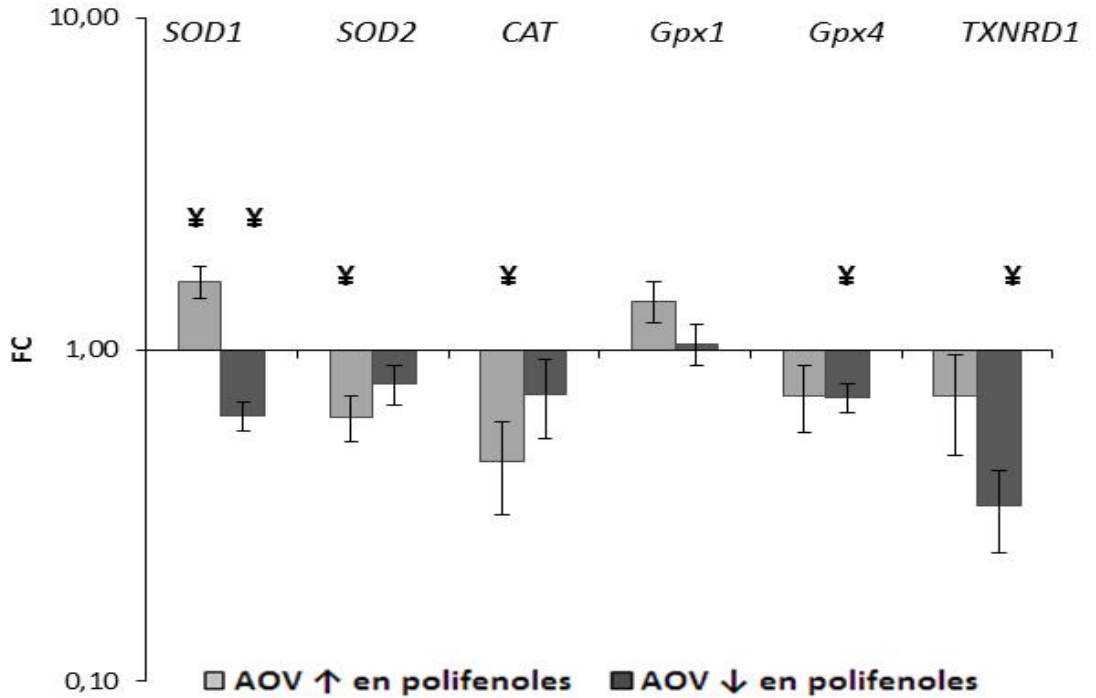
⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica luego del tratamiento de las células con los sueros obtenidos de los pacientes a las 4 hs post-desayuno en comparación con el estado de ayunas que se calculó dividiendo la expresión génica a las 4 hs por la obtenida en el estado de ayunas. ANOVA de un factor. $\text{¶ } p < 0,005$ 4 hs vs el estado de ayunas.

2.3 Efecto de los compuestos fenólicos en la expresión génica de enzimas antioxidantes.

También hemos evaluado la respuesta de la maquinaria antioxidante del endotelio a través del análisis de la expresión génica de enzimas antioxidantes que se consideran como la primera línea de defensa como lo son las isoformas de la SOD, la Catalasa y las isoformas de la Gpx [296].

El tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido a las 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos aumentó la expresión génica de SOD1 y disminuyó la de SOD2 y CAT ($p=0,009$; $p=0,005$ y $p=0,006$ respectivamente) mientras que las tratadas con el suero obtenido a las 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de SOD1, Gpx4 y TXNRD1 ($p<0,001$; $p=0,005$ y $p<0,001$ respectivamente) en comparación con las HUVEC tratadas con el suero obtenido en estado de ayuno (**Figura 15**).

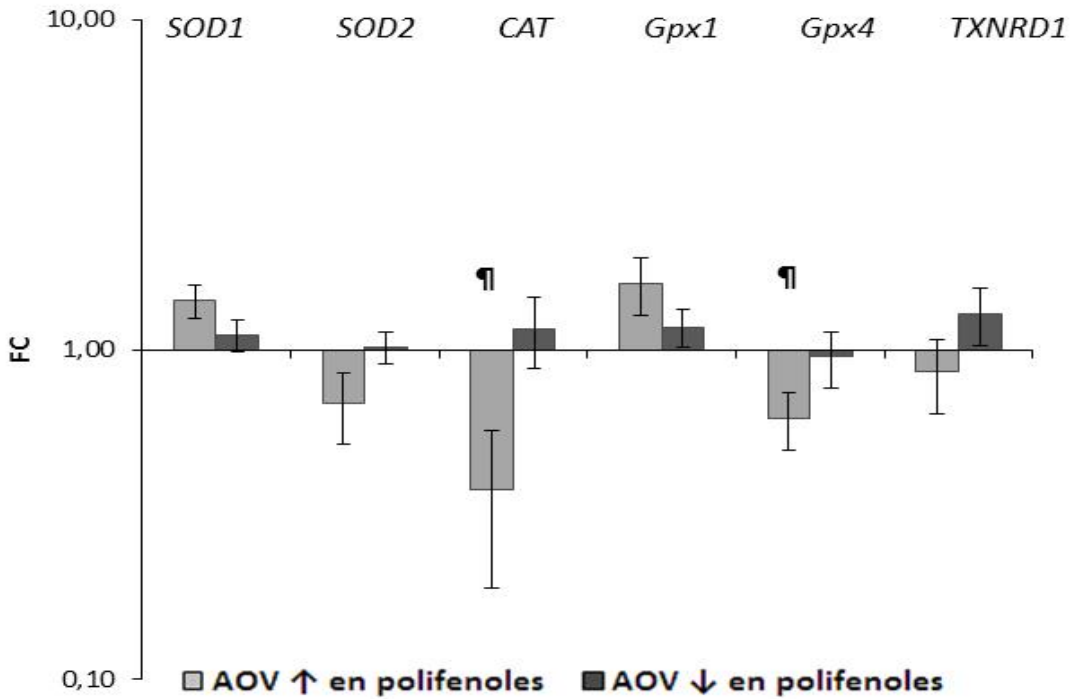
Figura 15. Expresión génica de enzimas antioxidantes en células endoteliales (2 horas vs estado de ayunas) ⁺.



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica luego del tratamiento de las células con los sueros obtenidos de los pacientes a las 2 hs post-desayuno en comparación con el estado de ayunas que se calculó dividiendo la expresión génica a las 2 hs por la obtenida en el estado de ayunas. ANOVA de un factor. ¥ $p < 0,005$ 2 hs vs el estado de ayunas.

Además, el tratamiento de las células con el suero obtenido a las 4 horas luego de la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de CAT y Gpx4 ($p=0,011$ y $p=0,016$ respectivamente) en comparación a las tratadas con el suero obtenido en estado de ayuno (**Figura 16**).

Figura 16. Expresión génica de enzimas antioxidantes en células endoteliales (4 horas vs estado de ayunas) ⁺.



⁺ Todos los valores están presentados como media \pm ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica luego del tratamiento de las células con los sueros obtenidos de los pacientes a las 4 hs post-desayuno en comparación con el estado de ayunas que se calculó dividiendo la expresión génica a las 4 hs por la obtenida en el estado de ayunas. ANOVA de un factor. $\forall p < 0,005$ 4 hs vs el estado de ayunas.

2.4 Comparación entre la ingesta de los aceites en el estado postprandial

Finalmente, hemos comparado la expresión génica obtenida tras los distintos tratamientos a los que se sometieron las HUVEC para evaluar el efecto final de ambos y hemos encontrado el tratamiento de las células con el suero obtenido a las 2 horas tras la ingesta del desayuno con alto contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de p65 y MCP-1 ($p < 0,001$ y $p = 0,002$ respectivamente) e incrementó la expresión génica de MT-CYB, SDHA y SOD1 ($p = 0,004$, $p = 0,012$ y $p = 0,001$ respectivamente en comparación con las células tratadas con el suero obtenido a las 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos (**Tabla 8**).

También hemos observado que el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido a las 4 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos disminuyó la expresión génica de MCP-1 y CAT ($p < 0,001$ y $p = 0,003$ respectivamente) en comparación con las HUVEC tratadas con el suero obtenido a las 4 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos (**Tabla 9**).

Tabla 9. Efecto final de los compuestos fenólicos en el endotelio vascular

Genes	FC a las 2 hs	p	FC a las 4hs	p
<i>IKKa</i>	1.74±0.34	0.075	1.34±0.35	0.389
<i>IKKb</i>	2.70±0.95	0.131	0.87±0.25	0.631
<i>P65</i>	0.48±0.04	<0.001 ^a	0.94±0.11	0.614
<i>IκBa</i>	0.79±0.20	0.368	0.74±0.16	0.170
<i>MCP-1</i>	0.52±0.10	0.002 ^a	0.50±0.06	<0.001 ^a
<i>IL-6</i>	1.28±0.26	0.343	1.08±0.21	0.737
<i>p22phox</i>	0.73±0.11	0.050	1.22±0.26	0.445
<i>gp91phox</i>	0.88±0.28	0.691	1.35±0.33	0.338
<i>COX4II</i>	1.81±0.37	0.076	1.13±0.24	0.609
<i>MT-CYB</i>	1.75±0.18	0.004 ^a	2.60±0.23	<0.001 ^a
<i>NADH</i>	1.10±0.24	0.696	1.11±0.26	0.694
<i>SDHA</i>	5.98±1.44	0.012 ^a	1.30±0.27	0.327
<i>SOD1</i>	2.54±0.26	0.001 ^a	1.27±0.14	0.102
<i>SOD2</i>	1.03±0.12	0.139	0.59±0.15	0.079
<i>Catalasa</i>	0.63±0.19	0.096	0.33±0.15	0.003 ^a
<i>Gpx1</i>	1.34±0.18	0.109	1.36±0.25	0.218
<i>Gpx4</i>	1.02±0.22	0.945	0.65±0.12	0.029
<i>TXNRDI</i>	2.13±0.68	0.155	0.66±0.16	0.081

⁺ Todos los valores están presentados como media ± ES y como Fold Change, que corresponde a cuantas veces cambió la expresión génica entre un tratamiento y otro que se calculó dividiendo la expresión génica de las células tratadas con el suero obtenido a las 2 y 4 hs luego de la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos por la expresión génica de las células tratadas con el suero obtenido a las 2 y 4 horas luego del consumo del desayuno preparado con el AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos. ANOVA de un factor. $p < 0,005$. Los valores con superíndices difieren significativamente entre sí en el análisis post hoc usando el test de comparación múltiple de Bonferroni.

VII. DISCUSIÓN

MODULACIÓN POR LA DIETA DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO

El envejecimiento es un proceso inevitable que compromete la función normal de los sistemas biológicos y que finalmente conduce a la disfunción de órganos y tejidos. Además, el envejecimiento constituye un factor de riesgo importante e independiente para el desarrollo de enfermedades crónico-metabólicas debido a la interacción entre el desgaste biológico del organismo y los factores ambientales externos. Uno de los procesos descritos como causa y efecto del proceso de envejecimiento es el EO el cual es mayor en personas de edad avanzada [2].

Las ROS, además de generarse como subproductos del metabolismo, tienen funciones fisiológicas como participar en mecanismos de defensa frente a patógenos en células fagocíticas, en la adaptación muscular al ejercicio, en la transducción de señales como respuesta proliferativa y en la señalización molecular en mitocondrias [297-300]. El EO se genera cuando hay un desequilibrio entre la producción y detoxificación de oxidantes celulares. Dicho desequilibrio puede producirse de dos formas, por el aumento en la producción de ROS que sobrepasa a al sistema de detoxificación o por la disminución de la producción de enzimas antioxidantes mientras que la de oxidantes se mantiene. Ambos procesos finalmente exponen a las células al daño oxidativo [49]. En este sentido, estudios en modelos de animales con obesidad han demostrado que el EO sistémico es causado por una menor producción de enzimas antioxidantes en TA, que además puede acompañarse por una producción excesiva de ROS a través de la

activación del complejo enzimático NADPH-oxidasa. [55, 57]. La más reciente propuesta es que el EO sistémico observado en TA de personas que padecen obesidad conduce a la disfunción de este tejido provocando alteraciones metabólicas que conducen finalmente al desarrollo del SMet [1].

El EO aumenta particularmente en el estado postprandial, lo que constituye en general, una condición de estrés para el organismo, dado que es más susceptible al daño oxidativo y además ocurren procesos como la lipemia postprandial, la respuesta inflamatoria postprandial y absorción de lipopolisacáridos (LPS). [198, 301, 302]. La importancia del estudio del estado postprandial radica en el hecho de que debido a los hábitos alimenticios actuales los seres humanos pasan la mayor parte del tiempo en esta situación [303]. Además, se ha demostrado que el EO puede modularse a través de la dieta según la cantidad y la calidad de grasa de la misma [304, 305]. Por lo tanto, la dieta podría afectar a la prevalencia del SMet ya que se ha demostrado que el EO es posiblemente el responsable de su desarrollo [1, 286]. Un estudio previo de nuestro grupo en la misma población a la que hace referencia esta tesis apoya esta teoría al demostrar que el consumo de una dieta rica en MUFA es capaz de modular favorablemente el EO postprandial a través de una reducción de las LDL-colesterol y nitrotirosina plasmáticos, un aumento de los niveles de β -caroteno plasmático y una reducción de los niveles de isoprostanos en orina en comparación con el consumo de una dieta rica en SFA, que por el contrario aumenta los niveles de LDL-colesterol y además aumenta los niveles plasmáticos postprandiales de lipoperóxidos y los niveles de isoprostanos en orina [218].

Aunque las ROS se generan como subproductos del metabolismo, son varias las enzimas que participan en su producción, siendo uno de los principales productores y por lo tanto desencadenantes del EO, el complejo enzimático NADPH-oxidasa [306]. En nuestro estudio hemos observado que la expresión postprandial de los genes que codifican para las subunidades de la NADPH-oxidasa no ha mostrado un patrón definido de mayor o menor expresión génica tras el consumo de ninguna dieta específica. De hecho, aunque los niveles de ARNm de la subunidad p22^{phox} fueron más altos tras el consumo de la dieta Med en comparación con el consumo de las dietas SFA y CHO-PUFA, y los niveles de ARNm de la subunidad p47^{phox} fueron más bajos tras el consumo de la dieta Med en comparación con el consumo de las dietas SFA y CHO-PUFA, no encontramos un patrón definido para la expresión génica de la NADPH-oxidasa. Además, no observamos cambios en la expresión génica de las subunidades p91^{phox}, p40^{phox} y p67^{phox}. Por lo tanto, aunque en modelos animales se ha mostrado que el complejo NADPH-oxidasa es el responsable, en parte, del incremento en la producción de ROS a través de su activación en TA [1], en nuestro estudio podría ser descartado como el mecanismo responsable del mayor EO observado tras el consumo de una dieta rica en SFA.

Para contrarrestar los efectos dañinos causados por niveles elevados de ROS, el organismo pone en marcha mecanismos de defensa representados principalmente por las enzimas antioxidantes, entre las que destacan la SOD, Gpx y Catalasa, que son consideradas como la primera línea de defensa contra las ROS en condiciones de EO [296]. La SOD convierte el $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 que a su vez se convierte en agua y oxígeno molecular por acción de la Catalasa o Gpx. Además, la isoforma Gpx4

está implicada principalmente en la detoxificación de hidroperóxidos lipídicos generados por acción del $\cdot\text{O}_2^-$ [307, 308]. Si bien nuestro estudio no mostró cambios significativos en cuanto a la expresión génica postprandial de las subunidades del complejo enzimático NADPH-oxidasa tras el consumo de ninguna de las dietas, la expresión génica postprandial del sistema de defensa antioxidante en el TA sí que parece verse afectada por la grasa dietética. Nuestros resultados sugieren que la expresión de la isoforma mitocondrial de la SOD (SOD2), parece ser más susceptible a ser modulada por la grasa dietética que la isoforma citoplasmática, la SOD1, dado que los niveles de ARNm de la SOD2 fueron más elevados tras el consumo de la dieta Med y por el contrario más reducidos tras el consumo de la dieta SFA, mientras que no se encontraron cambios significativos en la expresión de la SOD1. El hecho de que los niveles de la SOD2 fueran más elevados tras el consumo de la dieta Med sugiere que esta es la enzima que cataliza la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 que luego es convertido a agua y oxígeno molecular por la siguiente línea de defensa antioxidante compuesta por las enzimas CAT y Gpx, por lo tanto detoxifica en mayor medida las ROS que el consumo de las otras dietas. Si bien no hemos observado diferencias entre las dietas respecto a la CAT si hemos encontrado que dos isoformas de la Gpx son moduladas por la grasa dietética: la Gpx1 y la Gpx3, ambas de localización citoplasmática [72, 74]. Los niveles de Gpx1 son elevados tras el consumo de la dieta CHO-PUFA y bajos tras el consumo de la dieta SFA, mientras que por el contrario, los niveles del ARNm de Gpx3 son elevados tras el consumo de la dieta Med y bajos tras el consumo de la dieta CHO-PUFA, por lo tanto, en general, la actividad enzimática Gpx parece ser la principal enzima

encargada de la detoxificación de los peróxidos de hidrógeno formados por la SOD2 en TA.

La Tiorredoxina es una proteína que forma parte de un sistema oxidorreductasa encargado de reducir el H_2O_2 , para lo cual es necesaria su reducción por acción de la enzima Tiorredoxina reductasa, proceso que requiere además de la NADPH [79, 309]. Nuestro estudio no mostró cambios significativos en la expresión génica postprandial de la TXN tras el consumo de ninguna de las dietas, pero sí niveles más elevados del ARNm de la TrxR tras el consumo de las dietas Med y CHO-PUFA en comparación con el consumo de la dieta SFA. De hecho, estos resultados coinciden con los observados en otro estudio llevado a cabo por nuestro grupo, el cual mostró que la TrxR aumenta su expresión génica postprandial en TA tras el consumo de dietas ricas en MUFA y CHO-PUFA en una población de pacientes con síndrome metabólico [84], por lo que en conjunto estos resultados indican que la capacidad de reciclaje a través de la TrxR de la TXN también puede modularse a través de la grasa dietética y que particularmente dietas ricas en MUFA y CHO-PUFA son las que mejoran la respuesta antioxidante postprandial a través del aumento de esta enzima.

El glutatión se considera el antioxidante más abundante y principal agente detoxificador celular. Ante la presencia elevada de ROS, la GSH reacciona con estas donando un equivalente de reducción convirtiéndose en reactivo que luego rápidamente reacciona con otro glutatión reactivo para formar GSSG. Además, la GSH y la GSSG se utilizan para determinar la relación GSH/GSSG, el cual es un parámetro que refleja el estado redox biológico [81, 294]. De acuerdo con los resultados de expresión génica observados en TA, nuestro estudio sugiere que el

consumo de las dietas Med y CHO-PUFA reducen el EO postprandial en personas de edad avanzada, al menos parcialmente, en base a los niveles plasmáticos más elevados de GSH y del ratio GSH/GSSG observados tras el consumo de estas dietas en comparación con los niveles observados tras el consumo de la dieta SFA. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos con otros biomarcadores de EO como los lipoperóxidos plasmáticos e isoprostanos en orina, ambas moléculas derivadas de la oxidación de lípidos [310], y cuyos niveles también fueron menores tras el consumo de la dieta Med en comparación con lo observado tras el consumo de la dieta SFA.

La relación entre el TA, la expresión génica de las enzimas antioxidantes y el estado redox se sustenta en base a las relaciones que hemos encontrado entre estos parámetros mediante estudios de correlación. Por un lado, la expresión génica postprandial de la Gpx3 y de la TxrR se relaciona negativamente con los niveles de isoprostanos en orina y con los lipoperóxidos plasmáticos respectivamente. Además, la expresión postprandial de la Gpx4 se relaciona positivamente con la relación GSH/GSSG. Por lo tanto, a medida que aumenta la expresión postprandial de las enzimas antioxidantes en TA los valores de los biomarcadores de EO disminuyen y la relación GSH/GSSG aumenta, lo que se traduce en un menor EO sistémico.

Nuestros resultados demuestran que el proceso de detoxificación postprandial de las ROS en TA se reduce tras el consumo de la dieta SFA pero no luego del consumo de las dietas Med y CHO-PUFA, por lo tanto el consumo de una dieta con elevado contenido en ácidos grasos saturados conduce a un desequilibrio entre la producción de ROS y su inactivación y como consecuencia un mayor EO. Por el contrario, tanto la dieta Med

como la dieta CHO-PUFA aumentan la expresión postprandial del sistema de defensa antioxidante en TA en comparación con la dieta SFA, y por lo tanto la tasa de detoxificación de las ROS.

Se ha demostrado que durante el envejecimiento en el TA el EO tiende a aumentar por aumento en la producción de ROS y disminución del ratio GSH/GSSG en consecuencia de su disfunción [311]. Así pues, el EO es uno de los procesos fisiopatológicos más estudiados en el envejecimiento y en la obesidad dado que es capaz de activar otros mecanismos como la inflamación crónica de bajo grado y estrés de RE, los cuales pueden estimular aún más la producción de ROS y generar en paralelo una respuesta sistémica, situando a estos procesos dentro de un círculo vicioso y crónico [312].

Los ciclos de causa y efecto en la obesidad respecto al EO, inflamación y estrés de RE son complejos, es decir, el aumento de estos procesos resultan en su propia amplificación. La inflamación podría ser una manifestación del aumento del EO en TA que se traduce en un aumento de la producción local de citoquinas proinflamatorias que a su vez estimulan aún más la producción de ROS, procesos que sobrepasan la capacidad antioxidante y de resolución inflamatoria de este tejido y que ponen en marcha mecanismos relacionados al estrés de RE. Además de tener un efecto local, la disfunción del TA tiene un efecto sistémico provocando alteraciones metabólicas características del SMet y otras a nivel vascular conduciendo finalmente a la DE que constituye uno de los primeros pasos en el desarrollo de la arteriosclerosis [313-315].

Otros estudios realizados en la misma población a la que hace referencia este trabajo, han demostrado que los procesos de inflamación y de EO son susceptibles de ser modulados por la cantidad y calidad de

grasa dietética. Los resultados de tales estudios respaldan los obtenidos en esta tesis al demostrar que la dieta Med es la que más efectos positivos tiene sobre estos procesos y que por el contrario la dieta rica en SFA es la que más los acentúa. La dieta Med reduce la expresión génica postprandial de genes pro-inflamatorios en células mononucleares, reduce el daño y la disfunción del endotelio, mejora la capacidad regenerativa del endotelio, provoca una menor producción intracelular de ROS endotelial, además de una menor apoptosis y senescencia celular [218, 316, 317].

En conjunto todos estos resultados sumados a los presentados en esta tesis sitúan a la dieta Mediterránea como uno de los mejores modelos dietéticos para la modulación de los procesos fisiopatológicos que acompañan al proceso de envejecimiento. Además, este tipo de intervención dietética puede ser una nueva, interesante y prometedora alternativa en el tratamiento y prevención de los procesos que conducen al aumento del EO, inflamación y estrés de RE como lo son las ECV, enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento propiamente dicho, proporcionando una opción alternativa para un envejecimiento más saludable que además protegería a esta población contra el desarrollo del SMet.

EFEECTO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS BIODISPONIBLES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR

El SMet es un trastorno asociado a un elevado riesgo para el desarrollo de ECV y que se caracteriza por la presencia de hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL-colesterol, resistencia a la insulina, obesidad abdominal e hipertensión. La exposición crónica a estos factores afectan al endotelio vascular lo cual conduce a la disfunción de este tejido y finalmente al desarrollo de la arteriosclerosis [32, 42, 44] la cual es considerada como el sustrato patogénico para las ECV en pacientes con SMet [169].

El estadio temprano del desarrollo de la arteriosclerosis se caracteriza por el transporte de partículas de LDL-colesterol a través de la pared endotelial lo cual genera varias respuestas como la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de citoquinas. Estas respuestas provocan el reclutamiento, activación y adhesión de linfocitos y macrófagos que luego fagocitan las LDL, generan ROS, se transforman en células espumosas, forman la estría grasa y finalmente la placa aterosclerótica [169-171].

La DE es uno de los primeros pasos en el desarrollo de la arteriosclerosis, de hecho es un predictor temprano de ella y se asocia a alteraciones fisiopatológicas como la inflamación y el EO, procesos que a su vez están estrechamente relacionados entre sí. La DE se caracteriza por un incremento en la expresión de moléculas de adhesión en respuesta a la liberación de citoquinas pro-inflamatorias con la consecuente reducción de la disponibilidad de NO en los vasos sanguíneos y un excesivo incremento

de la producción de ROS que excede la capacidad de las defensas antioxidantes del endotelio [142, 143, 318-320].

Los procesos involucrados en el desarrollo de la arteriosclerosis pueden ser modulados y son susceptibles particularmente a la dieta. En este sentido, la dieta Med es una de las más estudiadas debido a la baja tasa de mortalidad por ECV en países Mediterráneos lo cual podría explicarse al menos en parte, en base a las propiedades antiaterogénicas asociadas a su consumo. Aunque en un principio se atribuyó que los efectos beneficiosos de la dieta Med se deben en parte a su alto contenido en aceite de oliva virgen y por lo tanto, en ácidos grasos monoinsaturados, actualmente existe un creciente nivel de evidencia de que gran parte de estos efectos se deben a los componentes minoritarios del aceite de oliva virgen de los cuales los más estudiados son los compuestos fenólicos [260, 321-324]. Tras muchos años de investigación epidemiológica, clínica y experimental se ha demostrado que el consumo de aceite de oliva virgen tiene efectos profundos en la salud tanto en la prevención como en el tratamiento de patologías como la obesidad, SMet y DM II [257]. En estudios de intervención dietética en humanos, el consumo del aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos produjo mejora de la DE, reducción de los parámetros plasmáticos de EO y efectos positivos en la respuesta inflamatoria. Además, se ha visto que el consumo de aceite de oliva virgen se asocia con cambios favorables en la expresión de genes relacionados con el cáncer, daño al ADN, EO, apoptosis y metabolismo de lípidos [263, 267-272].

Asimismo, existe considerable evidencia *in vitro* sobre los efectos positivos de los compuestos fenólicos [258, 273-277], pero las conclusiones respecto a su potencial preventivo o paliativo siguen sin

resolverse debido a algunas limitaciones que tienen estos estudios. En primer lugar, la biodisponibilidad de estos compuestos se ve afectada por varios factores, entre ellos los procesos del metabolismo intestinal y hepático tras los cuales aparecen en plasma alrededor de un 5 % del total ingerido no como los compuestos de origen, sino como metabolitos de fase II (conjugados glucurónidos), el resto pasa al colon donde son degradados por la microbiota intestinal [283]. Por lo tanto, la bioactividad de los compuestos fenólicos deriva principalmente de sus metabolitos biológicos. Además, la concentración de los metabolitos activos de los compuestos fenólicos en plasma también depende de la concentración de partida que tiene el aceite [282].

Las investigaciones respecto a la bioactividad de los compuestos fenólicos utilizando líneas celulares han hecho un amplio uso de compuestos fenólicos comerciales y en dosis que no representan la biodisponibilidad real en el plasma humano. Por esta razón, nuestro estudio se enfocó en analizar los efectos de los compuestos fenólicos del AOV biodisponibles en suero humano sobre el endotelio vascular tras la ingesta de dos tipos de desayuno preparados con aceite con AOV, uno con alto contenido y otro con bajo contenido en compuestos fenólicos con el fin de analizar si los efectos positivos del consumo de AOV se deben a la alta concentración en compuestos fenólicos y por lo tanto a una mayor biodisponibilidad plasmática.

En términos de respuesta inflamatoria, nuestro estudio demostró que el tratamiento de HUVEC con el suero obtenido 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido en polifenoles disminuye la expresión génica de p65, una subunidad del factor de transcripción Nf- κ B involucrado en la patogénesis de la arteriosclerosis y

cuya activación produce la transcripción de genes inflamatorios[325]. También observamos que el tratamiento de las células con este suero reduce la expresión génica de MCP-1, una citoquina pro-inflamatoria que juega un papel crítico en la formación de la placa aterosclerótica durante la formación de la estría grasa [326, 327].

Por el contrario, hemos observado un incremento en la expresión de MCP-1 cuando las células fueron tratadas con el suero obtenido a las 4 horas luego del desayuno preparado con AOV con bajo contenido en polifenoles. Además, el tratamiento con este suero también provocó el aumento en la expresión de I κ B α , un miembro de la familia de la I κ B (inhibidores de κ B) que está involucrado en la inactivación del NF- κ B reteniéndolo en el citoplasma y que se activa como retroalimentación negativa cuando se activa la respuesta inflamatoria [328].

Estos resultados concuerdan con un estudio *in vivo* realizado por nuestro grupo en células mononucleares de la misma población, en el cual se demostró la represión postprandial de varios genes pro-inflamatorios tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido de polifenoles en comparación con la ingesta del desayuno preparado con el mismo aceite pero con bajo contenido fenólico [267]. Además, otro estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo en células mononucleares demostró que una dieta Med basada en AOV con alto contenido en compuestos fenólicos también disminuye la expresión génica postprandial de la subunidad p65 del factor Nf- κ B y de MCP-1 [316]. La expresión de las subunidades IKKa y IKKb del complejo I κ B quinasa disminuyó cuando las células fueron tratadas con el suero obtenido 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con bajo contenido fenólico. Además, la expresión de la IKKb también disminuyó cuando las HUVEC

fueron tratadas con el suero obtenido a las 4 horas tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con bajo contenido fenólico. Estas observaciones sugieren que la reducción de la expresión de la quinasa involucrada en la respuesta inflamatoria podría estar ocurriendo como retroalimentación negativa ante la respuesta inflamatoria que se produce [328-330].

Por otra parte, nuestros resultados también sugieren una mejor respuesta de la maquinaria antioxidante en las HUVEC al tratarlas con el suero obtenido luego de la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido fenólico. En respuesta al EO las células tienden a incrementar sus defensas antioxidantes. Entre ellas, la SOD, CAT y Gpx son consideradas como la primera línea de defensa a elevados niveles de ROS en condiciones de EO [331]. La SOD convierte $\cdot\text{O}_2^-$ en H_2O_2 que posteriormente es convertido en oxígeno molecular y agua por la CAT o Gpx [307]. En nuestros resultados hemos observado que el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido a las 2 horas de la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos reduce la expresión de la CAT y de la isoforma mitocondrial de la SOD, la SOD2, ambas involucradas en la detoxificación de ROS desde O_2^- a agua [307], lo que sugiere un menor EO bajo estas condiciones. Por el contrario, la expresión génica de la Gpx1, la principal enzima involucrada en la conversión de H_2O_2 en oxígeno molecular no fue modulada por ninguno de los sueros obtenidos tras la ingesta de los desayunos preparados con AOV con alto o bajo contenido en compuestos fenólicos.

Además, la expresión génica de la SOD1, la isoforma citoplasmática de la SOD, aumentó tras el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con AOV

con alto contenido fenólico mientras que disminuyó en las tratadas con el suero obtenido 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con bajo contenido fenólico. Estos resultados sugieren una mayor protección del endotelio vascular tras la ingesta del aceite con alto contenido en compuestos fenolicos, en base al hecho de que la SOD1 tiene acción protectora en el endotelio vascular contra la disfunción y disminuye los niveles de O_2^- que son producidos por la propia mitocondria, lo cual concuerda con la teoría del origen mitocondrial de las especies reactivas de oxígeno [307]. Esta idea es apoyada por el incremento de la expresión de dos genes involucrados en la cadena mitocondrial de transporte de electrones: la MT-CYB y la SDHA cuando las HUVEC fueron tratadas con el suero obtenido 2 horas tras la ingesta del desayuno preparado con el AOV con alto contenido en compuestos fenólicos, ya que el incremento de estas subunidades previene la formación de intermediarios pro-oxidantes a través de un mayor consumo de O_2^- [332]. Por el contrario, la expresión génica de otras fuentes de ROS (p22^{phox} y gp91^{phox}) [306], parece no ser afectada por el contenido de compuestos fenólicos de los aceites utilizados en la preparación de los desayunos.

El hecho de que el diseño del estudio es randomizado cruzado, permite comparar los tratamientos entre sí, es decir, los resultados obtenidos tras el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido en compuestos fenólicos con los resultados obtenidos tras el tratamiento de las HUVEC con el suero obtenido tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con bajo contenido en compuestos fenólicos, tanto a las 2 como a las 4 horas. De esta manera, hemos observado que las células tratadas

con el suero obtenido tras la ingesta del desayuno preparado con AOV con alto contenido en compuestos fenólicos disminuye significativamente la expresión génica de p65, MCP-1, MT-CYB, SDHA y SOD1 a las 2 horas y de MCP-1, MT-CYB y CAT a las 4 horas. Estos resultados son consistentes con los de otros estudios *in vivo* en los cuales se demostró que una concentración alta de compuestos fenólicos en el AOV, tiene efectos postprandiales antiinflamatorios y es capaz de reducir la expresión de genes relacionados con la inflamación y el estrés oxidativo en el postprandio [263, 268, 333].

En conjunto, nuestros resultados muestran que el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva consumido es crítico en cuanto a la modulación de los mecanismos fisiopatológicos que subyacen la arteriosclerosis en el endotelio, los cuales incluyen un incremento sostenido de la expresión de genes inflamatorios y la generación de EO [334, 335], procesos que causan la acumulación de ROS que a su vez provoca una respuesta inflamatoria. Por lo tanto, el consumo de aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos reduce el riesgo de desarrollo de arteriosclerosis en pacientes con SMet a través de la reducción de la inflamación y mejorando el perfil antioxidante en el endotelio vascular.

Este estudio proporciona evidencia adicional de la reducción de los factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares observada en regiones Mediterráneas, donde la principal fuente de grasa dietética es el aceite de oliva virgen.

DISCUSIÓN GENERAL

La teoría del envejecimiento por radicales libre señala al estrés oxidativo como el principal determinante en la biología del envejecimiento y sus patologías asociadas [3, 336-338]. Aunque las ROS desempeñan funciones fisiológicas tales como mecanismo de defensa en células fagocíticas, adaptación del musculo al ejercicio físico [297, 298] y transducción de señales celulares [7], elevados niveles de ROS han sido asociados al proceso de envejecimiento y sus patologías asociadas [339]. De hecho, junto con el envejecimiento se observa un progresivo aumento de los niveles de ROS, y un progresivo descenso de las defensas antioxidantes [340, 341]. Así, el EO es considerado uno de los principales determinantes de los efectos deletéreos y acumulativos en la biología del envejecimiento y se ha visto que aumenta conforme avanza la edad [3].

En términos de estrés oxidativo, el TA adiposo disfuncional reduce la defensa antioxidante, lo que puede acompañarse por el incremento de la activación de una de las fuentes principales de ROS, el complejo enzimático NADPH-oxidasa, y que finalmente genera EO [1]. En consecuencia, se altera su función endócrina, lo que conduce a alteraciones metabólicas importantes como el desequilibrio en la producción de adipoquinas y citoquinas inflamatorias [124, 126]. Además, la respuesta inflamatoria y el EO pueden actuar como estímulo uno de otro, es decir, la inflamación puede exacerbar aún más el EO y viceversa, lo que ubica a estos procesos dentro de un círculo vicioso [312].

El envejecimiento se asocia con un incremento en la prevalencia del SMet dadas las alteraciones metabólicas que se desarrollan en esta etapa de la vida [28]. De hecho, ha sido propuesto que el estrés oxidativo sistémico es generado en tejido adiposo y no en otros órganos [1], de

manera que este órgano podría estar involucrado en el aumento del EO en personas de edad avanzada y en el desarrollo de SMet por estas personas. Así pues, el TA se considera un órgano clave en el desarrollo del SMet en personas de edad avanzada ya que el EO que se produce localmente en este tejido, puede propagarse a nivel sistémico y afectar otros órganos.

Uno de los tejidos afectados como consecuencia de estas alteraciones en el tejido adiposo es el endotelio, afectando a procesos de inflamación y EO, y estos a su vez en el desarrollo de aterosclerosis [342, 343]. Las ROS liberadas por el TA actúan como mediadores y ejercen efectos en la vasculatura promoviendo el desarrollo de las etapas de la arteriosclerosis como la DE, la progresión y ruptura de la placa arteriosclerótica con los consiguientes eventos cardiovasculares [97, 288].

Nuestros resultados sugieren que el tejido adiposo juega un papel clave en los mecanismos involucrados en la modulación, por parte de la cantidad y la calidad de la grasa dietética de los procesos involucrados en el desarrollo de ECV tanto en personas de edad avanzada como en pacientes con SMet, así como en el desarrollo del propio SMet.

Estudios previos han mostrado que el estrés oxidativo sistémico [286, 344, 345] es generado en tejido adiposo, debido a un aumento de la expresión de la enzima NADPH oxidasa, generadora de ROS [56], y un descenso de la expresión de las enzimas antioxidantes [1]. Nuestro estudio mostro que, aunque no observamos un patrón definido de modulación por la dieta en los niveles postprandiales de expresión génica de las distintas subunidades de la NADPH analizadas en nuestro estudio tras el consumo de ninguna dieta específica, la expresión de los genes involucrados en la maquinaria antioxidante es susceptible a ser modulada por la dieta. En este sentido, el consumo de la dieta con alto contenido en grasas saturadas

produjo un descenso significativo de las defensas antioxidantes en este tejido en comparación con el consumo de las demás dietas, resultados que sugieren que el mecanismo por el que se produce EO oxidativo es la menor actividad de los mecanismos de defensa antioxidante. Estos resultados fueron contrastados con la medida de marcadores de estrés oxidativo en plasma, lipoperóxidos y proteínas carboniladas, que confirmaron el efecto a nivel sistémico.

Nuestros resultados sugieren que el consumo de grasa saturada reduce el proceso de detoxificación de las ROS en TA, lo que conduce a un desequilibrio entre la producción y detoxificación de ROS y como consecuencia un mayor EO en personas de edad avanzada, lo que aumenta el riesgo cardiovascular de estas personas así como el riesgo de desarrollar síndrome metabólico [1].

No obstante, en base a la medida de marcadores de estrés oxidativo en plasma, el consumo de la dieta Mediterránea parece tener un mayor efecto que la dieta baja en grasa, e independiente a la modulación de la expresión génica en tejido adiposo, en cuanto a la reducción de los niveles de estrés oxidativo.

Este efecto aditivo de la dieta Mediterránea, podría deberse al aporte de antioxidantes exógenos que conlleva el consumo de la dieta Mediterránea, y podrían atribuirse a su componente graso principal, el aceite de oliva virgen y su contenido en compuestos fenólicos, de manera que nos planteamos el estudio de su efecto en este trabajo, centrándonos en evaluar su efecto sobre el endotelio vascular, por estar directamente relacionado con el desarrollo de aterosclerosis, el sustrato patogénico responsable de la enfermedad cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico.

El consumo de un aceite con elevado contenido de compuestos fenólicos es capaz de modular positivamente los procesos que están involucrados en las respuestas inflamatoria y antioxidante del endotelio vascular. Estos resultados podrían explicarse en base a que tras el consumo de un AOV con alta concentración en compuestos fenólicos aumenta la concentración de los metabolitos bioactivos que aparecen en plasma tras los procesos de digestión y absorción. Entre estos procesos que modula el consumo de AOV con alto contenido fenólico pueden mencionarse la reducción del EO postprandial en el endotelio y en paralelo una mejor respuesta inflamatoria. Por lo tanto y en concordancia con otros estudios, los efectos positivos de la dieta Med podrían atribuirse a los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen [267, 284].

En resumen, los datos presentados en esta tesis doctoral apoyan la idea de que la dieta Mediterránea es un modelo de dieta saludable adecuada para la población de edad avanzada, lo que supone una alternativa para un envejecimiento más saludable y que además, podría proteger contra el desarrollo del SMet. Además, la importancia de nuestros resultados radica en el hecho de que muestran que la dieta es capaz de modular el estrés oxidativo en el estado postprandial, situación metabólica en la que el ser humano pasa la mayor parte del día, y que por lo tanto es de gran importancia en el desarrollo de otras alteraciones metabólicas que anteceden a las ECV, como la DE y la arteriosclerosis [315]. Nuestros resultados, junto con estudios previos, apuntan al tejido adiposo como órgano generador del estrés oxidativo sistémico y a la dieta como moduladora de los mecanismos involucrados en la generación de este estrés oxidativo, de manera que la dieta Med y la dieta CHO-PUFA aumentan la expresión de enzimas antioxidantes en comparación con el

consumo de la dieta SFA y por lo tanto provocan una mayor tasa de detoxificación de ROS y un menor estrés oxidativo. Independientemente de la modulación de la expresión génica en tejido adiposo, la dieta Mediterránea parece tener una ventaja adicional sobre la dieta baja en grasa que radica en el aporte de antioxidantes exógenos. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en los compuestos fenólicos del aceite de oliva, que parecen reducir los procesos que están involucrados en las respuestas inflamatoria y antioxidante del endotelio vascular, lo que a su vez podría reducir el riesgo de desarrollo de arteriosclerosis.

VIII. CONCLUSIONES

Conclusión principal

Nuestros resultados sugieren que la reducción del estrés oxidativo postprandial en personas de edad avanzada tras el consumo de las dietas Mediterránea y alta en hidratos de carbono, baja en grasa, enriquecida con omega 3 en comparación con el consumo de una dieta rica en grasas saturadas se debe a los mayores niveles de expresión postprandial del sistema de defensa antioxidante en tejido adiposo tras el consumo de las dietas Med y CHO-PUFA en comparación con el consumo de una dieta rica en SFA.

Conclusiones secundarias

- a. La expresión génica de las subunidades del complejo enzimático NADPH-oxidada no sigue un patrón de expresión definido en bloque en respuesta a ninguno de los tres modelos dietéticos en el tejido adiposo de personas de edad avanzada.
- b. El consumo de la dieta Med rica en aceite de oliva virgen ejerce un efecto adicional a la dieta CHO-PUFA ya que induce menores niveles plasmáticos de lipoperóxidos e isoprostanos en orina
- c. Nuestros resultados muestran que el consumo de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos reduce la expresión de genes inflamatorios y mejora el perfil antioxidante del endotelio vascular.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Furukawa, S., et al., *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1752-61.
2. Florencio, G.L., et al., [*Aging: a reflection about physical activity and oxidative stress in women*]. Acta Med Port, 2011. **24 Suppl 4**: p. 983-8.
3. Sohal, R.S. and W.C. Orr, *The redox stress hypothesis of aging*. Free Radic Biol Med, 2011. **52**(3): p. 539-55.
4. Tucker, K.L. and S. Buranapin, *Nutrition and aging in developing countries*. J Nutr, 2001. **131**(9): p. 2417S-23S.
5. Organization, W.H., *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2000. **894**: p. i-xii, 1-253.
6. Hayflick, L., *Biological aging is no longer an unsolved problem*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1100**: p. 1-13.
7. Finkel, T., *Oxygen radicals and signaling*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(2): p. 248-53.
8. Kregel, K.C. and H.J. Zhang, *An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(1): p. R18-36.
9. Burton, D.G., *Cellular senescence, ageing and disease*. Age (Dordr), 2009. **31**(1): p. 1-9.
10. Frank, E., *Aging and the market in the United States*. Int J Health Serv, 2001. **31**(1): p. 133-46.
11. Barzilai, N., et al., *The critical role of metabolic pathways in aging*. Diabetes, 2012. **61**(6): p. 1315-22.
12. Naylor, R.M., D.J. Baker, and J.M. van Deursen, *Senescent cells: a novel therapeutic target for aging and age-related diseases*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **93**(1): p. 105-16.
13. Minamino, T., et al., *A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance*. Nat Med, 2009. **15**(9): p. 1082-7.
14. Minamino, T. and I. Komuro, *Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 15-26.
15. Serrano, A.L. and V. Andres, *Telomeres and cardiovascular disease: does size matter?* Circ Res, 2004. **94**(5): p. 575-84.
16. Tzanetakou, I.P., et al., *Telomeres and their Role in Aging and Longevity*. Curr Vasc Pharmacol, 2013.

17. Demissie, S., et al., *Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study*. *Aging Cell*, 2006. **5**(4): p. 325-30.
18. Mirea, O., I. Donoiu, and I.E. Plesea, *Arterial aging: a brief review*. *Rom J Morphol Embryol*, 2012. **53**(3): p. 473-7.
19. Levy, B.I., et al., *Effect of chronic dihydropyridine (isradipine) on the large arterial walls of spontaneously hypertensive rats*. *Circulation*, 1994. **90**(6): p. 3024-33.
20. Wang, M., et al., *Proinflammatory profile within the grossly normal aged human aortic wall*. *Hypertension*, 2007. **50**(1): p. 219-27.
21. Laurent, S., *Defining vascular aging and cardiovascular risk*. *J Hypertens*, 2012. **30 Suppl**: p. S3-8.
22. Folsom, A.R., et al., *Body fat distribution and 5-year risk of death in older women*. *JAMA*, 1993. **269**(4): p. 483-7.
23. Huffman, D.M. and N. Barzilai, *Role of visceral adipose tissue in aging*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1790**(10): p. 1117-23.
24. Lee, C.G., et al., *Association between insulin resistance and lean mass loss and fat mass gain in older men without diabetes mellitus*. *J Am Geriatr Soc*, 2011. **59**(7): p. 1217-24.
25. Dirks, A.J., et al., *Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle*. *Ageing Res Rev*, 2006. **5**(2): p. 179-95.
26. Koves, T.R., et al., *Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance*. *Cell Metab*, 2008. **7**(1): p. 45-56.
27. Rincon, M., et al., *The paradox of the insulin/IGF-1 signaling pathway in longevity*. *Mech Ageing Dev*, 2004. **125**(6): p. 397-403.
28. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz, *Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey*. *JAMA*, 2002. **287**(3): p. 356-9.
29. Reaven, G., *Metabolic syndrome: pathophysiology and implications for management of cardiovascular disease*. *Circulation*, 2002. **106**(3): p. 286-8.
30. Phillips, C., et al., *Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome*. *Curr Opin Cardiol*, 2006. **21**(3): p. 185-93.

31. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(6): p. 1093-100.
32. Grundy, S.M., 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**(2): p. e13-8.
33. Grundy, S.M., *Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2595-600.
34. Haffner, S. and H. Taegtmeier, *Epidemic obesity and the metabolic syndrome*. Circulation, 2003. **108**(13): p. 1541-5.
35. Groop, L., et al., *Metabolic consequences of a family history of NIDDM (the Botnia study): evidence for sex-specific parental effects*. Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1585-93.
36. Okamoto, Y., et al., *Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2002. **106**(22): p. 2767-70.
37. Abbasi, F., et al., *Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(5): p. 937-43.
38. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, *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**(7): p. 539-53.
39. Despres, J.P., I. Lemieux, and D. Prud'homme, *Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients*. BMJ, 2001. **322**(7288): p. 716-20.
40. Reilly, M.P. and D.J. Rader, *The metabolic syndrome: more than the sum of its parts?* Circulation, 2003. **108**(13): p. 1546-51.
41. *Executive Summary of The 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)*. JAMA, 2001. **285**(19): p. 2486-97.
42. Alberti, K.G., 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**(16): p. 1640-5.
43. Eckel, R.H., et al., *The metabolic syndrome*. *Lancet*, 2010. **375**(9710): p. 181-3.
 44. Grundy, S.M., *Metabolic syndrome pandemic*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(4): p. 629-36.
 45. Lorenzo, C., et al., *Geographic variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III definitions of the metabolic syndrome in nondiabetic subjects*. *Diabetes Care*, 2006. **29**(3): p. 685-91.
 46. Burgoyne, J.R., et al., *Redox signaling in cardiac physiology and pathology*. *Circ Res*, 2012. **111**(8): p. 1091-106.
 47. Newsholme, P., et al., *Reactive oxygen and nitrogen species generation, antioxidant defenses, and beta-cell function: a critical role for amino acids*. *J Endocrinol*, 2012. **214**(1): p. 11-20.
 48. Bir, S.C., et al., *Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling*. *Semin Cell Dev Biol*, 2012. **23**(7): p. 745-57.
 49. Alfadda, A.A. and R.M. Sallam, *Reactive oxygen species in health and disease*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 936486.
 50. Khan, S.R., *Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome?* *Urol Res*, 2011. **40**(2): p. 95-112.
 51. Halliwell, B. and M. Whiteman, *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**(2): p. 231-55.
 52. Squadrito, G.L. and W.A. Pryor, *Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **25**(4-5): p. 392-403.
 53. Scandalios, J.G., *Oxidative stress responses--what have genome-scale studies taught us?* *Genome Biol*, 2002. **3**(7): p. REVIEWS1019.
 54. Tabima, D.M., S. Frizzell, and M.T. Gladwin, *Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **52**(9): p. 1970-86.
 55. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. *Blood*, 1999. **93**(5): p. 1464-76.

56. Fortunato, A., et al., *Phagocytic NADPH oxidase overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 209-15.
57. Babior, B.M., *NADPH oxidase*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 42-7.
58. Gao, L. and G.E. Mann, *Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(1): p. 9-20.
59. Gutiérrez, C.J.R.V., *DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES*. Rev Cubana Med Milit, 2002. **31**(2): p. 126-133.
60. Durackova, Z., *Some current insights into oxidative stress*. Physiol Res, 2010. **59**(4): p. 459-69.
61. Evans, P. and B. Halliwell, *Micronutrients: oxidant/antioxidant status*. Br J Nutr, 2001. **85 Suppl 2**: p. S67-74.
62. Taguchi, K., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution*. Genes Cells, 2011. **16**(2): p. 123-40.
63. Kobayashi, M., et al., *The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(2): p. 493-502.
64. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
65. Dhar, S.K. and D.K. St Clair, *Manganese superoxide dismutase regulation and cancer*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(11-12): p. 2209-22.
66. Weyemi, U., et al., *SOD2 deficiency promotes aging phenotypes in mouse skin*. Aging (Albany NY), 2012. **4**(2): p. 116-8.
67. Kwon, M.J., et al., *Role of superoxide dismutase 3 in skin inflammation*. J Dermatol Sci, 2012. **67**(2): p. 81-7.
68. Groeger, G., C. Quiney, and T.G. Cotter, *Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2655-71.
69. Nicholls, P., *Classical catalase: ancient and modern*. Arch Biochem Biophys, 2012. **525**(2): p. 95-101.
70. 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**(3): p. 134-41.

71. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* Free Radic Biol Med, 2010. **49**(11): p. 1603-16.
72. Lubos, E., J. Loscalzo, and D.E. Handy, *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.* Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(7): p. 1957-97.
73. Paskerova, H., K. Hilscherova, and L. Blaha, *Oxidative stress and detoxification biomarker responses in aquatic freshwater vertebrates exposed to microcystins and cyanobacterial biomass.* Environ Sci Pollut Res Int, 2012. **19**(6): p. 2024-37.
74. Mishra, S. and J. Imlay, *Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?* Arch Biochem Biophys, 2012. **525**(2): p. 145-60.
75. Margis, R., et al., *Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview.* FEBS J, 2008. **275**(15): p. 3959-70.
76. Drevet, J.R., *The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story.* Mol Cell Endocrinol, 2006. **250**(1-2): p. 70-9.
77. Bal, M., et al., *Immunoprophylactic potential of filarial glutathione-s-transferase in lymphatic filariasis.* Asian Pac J Trop Med, 2011. **4**(3): p. 185-91.
78. Sengupta, R. and A. Holmgren, *The role of thioredoxin in the regulation of cellular processes by S-nitrosylation.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(6): p. 689-700.
79. Mustacich, D. and G. Powis, *Thioredoxin reductase.* Biochem J, 2000. **346 Pt 1**: p. 1-8.
80. Anand, P. and J.S. Stamler, *Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease.* J Mol Med (Berl), 2012. **90**(3): p. 233-44.
81. Zhang, H. and H.J. Forman, *Glutathione synthesis and its role in redox signaling.* Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(7): p. 722-8.
82. Circu, M.L. and T.Y. Aw, *Glutathione and modulation of cell apoptosis.* Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(10): p. 1767-77.
83. Mari, M., et al., *Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2685-700.
84. Pena-Orihuela, P., et al., *Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients.* J Nutr Biochem, 2013. **24**(10): p. 1717-23.
85. Da Costa, L.A., et al., *Genetic determinants of dietary antioxidant status.* Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **108**: p. 179-200.

86. Avignon, A., et al., *Dietary antioxidants: Do they have a role to play in the ongoing fight against abnormal glucose metabolism?* Nutrition, 2012. **28**(7-8): p. 715-21.
87. Obrenovich, M.E., et al., *Antioxidants in health, disease and aging.* CNS Neurol Disord Drug Targets, 2011. **10**(2): p. 192-207.
88. Gaman, L., I. Stoian, and V. Atanasiu, *Can ageing be slowed?: Hormetic and redox perspectives.* J Med Life, 2011. **4**(4): p. 346-51.
89. Curin, Y. and R. Andriantsitohaina, *Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases.* Pharmacol Rep, 2005. **57 Suppl**: p. 97-107.
90. Andriantsitohaina, R., et al., *Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols.* Br J Nutr, 2012. **108**(9): p. 1532-49.
91. Albarracin, S.L., et al., *Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease.* Nutr Neurosci, 2012. **15**(1): p. 1-9.
92. Frade, J.G.F., N. R. · Barbosa, R. M. · Laranjinha, J., *Mechanisms of Neuroprotection by Polyphenols.* Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents, 2005. **5**(4): p. 307-318.
93. Karpoff, L., et al., *Abnormal vascular reactivity at rest and exercise in obese boys.* Eur J Clin Invest, 2009. **39**(2): p. 94-102.
94. Pardo, M., et al., *Obesidomics: contribution of adipose tissue secretome analysis to obesity research.* Endocrine, 2012. **41**(3): p. 374-83.
95. Fruhbeck, G., et al., *The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation.* Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **280**(6): p. E827-47.
96. Fruhbeck, G. and J. Gomez-Ambrosi, *Rationale for the existence of additional adipostatic hormones.* FASEB J, 2001. **15**(11): p. 1996-2006.
97. Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, and P.E. Scherer, *The adipocyte as an endocrine cell.* Endocrinol Metab Clin North Am, 2008. **37**(3): p. 753-68, x-xi.
98. Valverde, A.M. and M. Benito, *The brown adipose cell: a unique model for understanding the molecular mechanism of insulin resistance.* Mini Rev Med Chem, 2005. **5**(3): p. 269-78.
99. Smorlesi, A., et al., *The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation.* Obes Rev, 2012. **13 Suppl 2**: p. 83-96.

100. Cinti, S., *The adipose organ*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 9-15.
101. Hauner, H., et al., *Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1663-70.
102. Hirsch, J., et al., *The fat cell*. Med Clin North Am, 1989. **73**(1): p. 83-96.
103. Henry SL, B.J., Wood-Bradley RJ, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Armitage JA., *White adipocytes: more than just fat depots*. Int J Biochem Cell Biol., 2012. **44**(3): p. 435-440.
104. Londos, C., et al., *Perilipin: possible roles in structure and metabolism of intracellular neutral lipids in adipocytes and steroidogenic cells*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20 Suppl 3**: p. S97-101.
105. Trayhurn, P. and J.H. Beattie, *Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ*. Proc Nutr Soc, 2001. **60**(3): p. 329-39.
106. Rosen, E.D. and O.A. MacDougald, *Adipocyte differentiation from the inside out*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(12): p. 885-96.
107. de Ferranti, S. and D. Mozaffarian, *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences*. Clin Chem, 2008. **54**(6): p. 945-55.
108. Wronska, A. and Z. Kmiec, *Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **205**(2): p. 194-208.
109. Iozzo, P., *Myocardial, perivascular, and epicardial fat*. Diabetes Care, 2011. **34 Suppl 2**: p. S371-9.
110. Muller, M.J., et al., *Beyond the body mass index: tracking body composition in the pathogenesis of obesity and the metabolic syndrome*. Obes Rev, 2012. **13 Suppl 2**: p. 6-13.
111. Kang SM, Y.J., Ahn HY, Kim SY, Lee KH, Shin H, Choi SH, Park KS, Jang HC, Lim S., *Android fat depot is more closely associated with metabolic syndrome than abdominal visceral fat in elderly people*. PLoS One, 2011. **6**(11).
112. Lee, M.J., Y. Wu, and S.K. Fried, *Adipose tissue heterogeneity: mplication of depot differences in adipose tissue for obesity complications*. Mol Aspects Med, 2013. **34**(1): p. 1-11.
113. Wang, P., et al., *The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue*. J Cell Physiol, 2008. **216**(1): p. 3-13.

114. Rutkowski, J.M., K.E. Davis, and P.E. Scherer, *Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue*. FEBS J, 2009. **276**(20): p. 5738-46.
115. Trayhurn, P., *Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 1-21.
116. Vazquez-Vela, M.E., N. Torres, and A.R. Tovar, *White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity*. Arch Med Res, 2008. **39**(8): p. 715-28.
117. Villarreal-Molina, M.T. and B. Antuna-Puente, *Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects*. Biochimie, 2012. **94**(10): p. 2143-9.
118. Sahin-Efe, A., F. Katsikeris, and C.S. Mantzoros, *Advances in adipokines*. Metabolism, 2012. **61**(12): p. 1659-65.
119. Turer, A.T. and P.E. Scherer, *Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications*. Diabetologia, 2012. **55**(9): p. 2319-26.
120. MacDougald, O.A. and C.F. Burant, *The rapidly expanding family of adipokines*. Cell Metab, 2007. **6**(3): p. 159-61.
121. Shen, J., et al., *Interleukin1beta genetic polymorphisms interact with polyunsaturated fatty acids to modulate risk of the metabolic syndrome*. J Nutr, 2007. **137**(8): p. 1846-51.
122. Jager, J., et al., *Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression*. Endocrinology, 2007. **148**(1): p. 241-51.
123. Rasouli, N. and P.A. Kern, *Adipocytokines and the metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(11 Suppl 1): p. S64-73.
124. HE, B., *Adiposopathy, Diabetes Mellitus, and Primary Prevention of Atherosclerotic Coronary Artery Disease: Treating "Sick Fat" Through Improving Fat Function with Antidiabetes Therapies*. Am J Cardiol, 2012. **110**(9): p. 4B-12B.
125. Wong, W.T., et al., *Adiponectin is required for PPARgamma-mediated improvement of endothelial function in diabetic mice*. Cell Metab, 2011. **14**(1): p. 104-15.
126. Wajchenberg, B.L., et al., *Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2009. **53**(2): p. 145-50.
127. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.

128. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 621-63.
129. Gustafson, B., et al., *Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(11): p. 2276-83.
130. Ghanim, H., et al., *Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state*. *Circulation*, 2004. **110**(12): p. 1564-71.
131. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(6): p. 2548-56.
132. Fujita, K., et al., *Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome*. *Circ J*, 2006. **70**(11): p. 1437-42.
133. Block, G., et al., *Factors associated with oxidative stress in human populations*. *Am J Epidemiol*, 2002. **156**(3): p. 274-85.
134. Dandona, P., et al., *The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(1): p. 355-62.
135. Uzun, H., et al., *Plasma protein carbonyl and thiol stress before and after laparoscopic gastric banding in morbidly obese patients*. *Obes Surg*, 2007. **17**(10): p. 1367-73.
136. Gletsu-Miller, N., et al., *Loss of total and visceral adipose tissue mass predicts decreases in oxidative stress after weight-loss surgery*. *Obesity (Silver Spring)*, 2009. **17**(3): p. 439-46.
137. Keaney, J.F., Jr., et al., *Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(3): p. 434-9.
138. Olusi, S.O., *Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002. **26**(9): p. 1159-64.
139. Shen, X., K. Zhang, and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum*. *J Chem Neuroanat*, 2004. **28**(1-2): p. 79-92.
140. Xu, C., B. Bailly-Maitre, and J.C. Reed, *Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2656-64.
141. Schroder, M. and R.J. Kaufman, *The mammalian unfolded protein response*. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 739-89.

142. Basha, B., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress?* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 481840.
143. Popov, D., *Endoplasmic reticulum stress and the on site function of resident PTP1B.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **422**(4): p. 535-8.
144. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response.* Nature, 2008. **454**(7203): p. 455-62.
145. Reddy, R.K., et al., *Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation.* J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20915-24.
146. Harding, H.P., et al., *Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 575-99.
147. Lee, A.H., N.N. Iwakoshi, and L.H. Glimcher, *XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7448-59.
148. Hollien, J., et al., *Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells.* J Cell Biol, 2009. **186**(3): p. 323-31.
149. Nakamura, T., et al., *Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis.* Cell, 2010. **140**(3): p. 338-48.
150. Boden, G., *Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation?* Diabetes, 2009. **58**(3): p. 518-9.
151. Boden, G., et al., *Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals.* Diabetes, 2008. **57**(9): p. 2438-44.
152. Ferrannini, E., et al., *Insulin: new roles for an ancient hormone.* Eur J Clin Invest, 1999. **29**(10): p. 842-52.
153. Reaven, G.M., *Hypothesis: muscle insulin resistance is the ("not-so") thrifty genotype.* Diabetologia, 1998. **41**(4): p. 482-4.
154. Kahn, C.R., *Insulin resistance, insulin insensitivity, and insulin unresponsiveness: a necessary distinction.* Metabolism, 1978. **27**(12 Suppl 2): p. 1893-902.
155. Lteif, A. and K. Mather, *Insulin resistance, metabolic syndrome and vascular diseases: update on mechanistic linkages.* Can J Cardiol, 2004. **20 Suppl B**: p. 66B-76B.

156. Shen, B.J., et al., *Are metabolic risk factors one unified syndrome? Modeling the structure of the metabolic syndrome X*. Am J Epidemiol, 2003. **157**(8): p. 701-11.
157. Ritchie, S.A., et al., *The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(6): p. 519-32.
158. Goldstein, B.J. and R. Scalia, *Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(6): p. 2563-8.
159. Hekimi, S. and L. Guarente, *Genetics and the specificity of the aging process*. Science, 2003. **299**(5611): p. 1351-4.
160. Petersen, K.F., et al., *Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance*. Science, 2003. **300**(5622): p. 1140-2.
161. Meigs, J.B., et al., *The natural history of progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging*. Diabetes, 2003. **52**(6): p. 1475-84.
162. Groop, L.C., et al., *Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance*. J Clin Invest, 1989. **84**(1): p. 205-13.
163. Del Prato, S., et al., *Insulin regulation of glucose and lipid metabolism in massive obesity*. Diabetologia, 1990. **33**(4): p. 228-36.
164. N., C., *Endothelial dysfunction – A predictor of atherosclerosis*. . Internet J Med Update 2009. **4**(1): p. 33-41
165. Strijdom H, L.A., *Cardiac endothelium: More than just a barrier*. SA Heart 2009 **6**(3): p. 174-185.
166. Stern, M.P., *Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis*. Diabetes, 1995. **44**(4): p. 369-74.
167. Lahoz, C. and J.M. Mostaza, *[Atherosclerosis as a systemic disease]*. Rev Esp Cardiol, 2007. **60**(2): p. 184-95.
168. Yang, G., et al., *Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes*. J Cardiovasc Dis Res, 2010. **1**(2): p. 59-63.
169. Mudau, M., et al., *Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis*. Cardiovasc J Afr, 2012. **23**(4): p. 222-31.
170. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(11): p. 762-74.
171. Madamanchi, N.R., A. Vendrov, and M.S. Runge, *Oxidative stress and vascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(1): p. 29-38.

172. Bijl, M., *Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases*. Neth J Med, 2003. **61**(9): p. 273-7.
173. Rabelink, T.J., H.C. de Boer, and A.J. van Zonneveld, *Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(7): p. 404-14.
174. Bonetti, P.O., L.O. Lerman, and A. Lerman, *Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(2): p. 168-75.
175. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
176. Cooper, D., et al., *Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation*. Cardiovasc Toxicol, 2002. **2**(3): p. 165-80.
177. Pennathur, S. and J.W. Heinecke, *Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease*. Curr Diab Rep, 2007. **7**(4): p. 257-64.
178. Griendling, K.K. and G.A. FitzGerald, *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. Circulation, 2003. **108**(16): p. 1912-6.
179. Cai, H., K.K. Griendling, and D.G. Harrison, *The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(9): p. 471-8.
180. Ceolotto, G., et al., *Insulin generates free radicals by an NAD(P)H, phosphatidylinositol 3'-kinase-dependent mechanism in human skin fibroblasts ex vivo*. Diabetes, 2004. **53**(5): p. 1344-51.
181. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
182. Cohn, J.S., *Postprandial lipemia and remnant lipoproteins*. Clin Lab Med, 2006. **26**(4): p. 773-86.
183. Lambert, J.E. and E.J. Parks, *Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(5): p. 721-6.
184. Alipour, A., et al., *Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis*. Atheroscler Suppl, 2008. **9**(2): p. 39-44.
185. Nakajima, K., et al., *Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons*. Clin Chim Acta, 2011. **412**(15-16): p. 1306-18.

186. Botham, K.M. and C.P. Wheeler-Jones, *Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis*. Prog Lipid Res, 2013. **52**(4): p. 446-64.
187. Pastromas, S., et al., *Postprandial lipemia: an under-recognized atherogenic factor in patients with diabetes mellitus*. Int J Cardiol, 2008. **126**(1): p. 3-12.
188. Kolovou, G.D., et al., *Metabolic syndrome and gender differences in postprandial lipaemia*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2006. **13**(4): p. 661-4.
189. Pang, J., et al., *Postprandial dyslipidaemia and diabetes: mechanistic and therapeutic aspects*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(4): p. 303-9.
190. Jackson, K.G., et al., *Exaggerated postprandial lipaemia and lower post-heparin lipoprotein lipase activity in middle-aged men*. Clin Sci (Lond), 2003. **105**(4): p. 457-66.
191. Couillard, C., et al., *Gender difference in postprandial lipemia : importance of visceral adipose tissue accumulation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(10): p. 2448-55.
192. van Beek, A.P., et al., *Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(11): p. 2737-41.
193. Fielding, B.A., et al., *Ethanol with a mixed meal increases postprandial triacylglycerol but decreases postprandial non-esterified fatty acid concentrations*. Br J Nutr, 2000. **83**(6): p. 597-604.
194. Cohen, J.C. and G.M. Berger, *Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans*. J Lipid Res, 1990. **31**(4): p. 597-602.
195. Lia, A., et al., *Postprandial lipemia in relation to sterol and fat excretion in ileostomy subjects given oat-bran and wheat test meals*. Am J Clin Nutr, 1997. **66**(2): p. 357-65.
196. Couillard, C., et al., *Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 953-60.
197. Haffner, S.M., *Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance*. Am J Cardiol, 2002. **90**(8A): p. 55i-61i.
198. Ursini, F. and A. Sevanian, *Postprandial oxidative stress*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 599-605.

199. Bowen, P.E. and G. Borthakur, *Postprandial lipid oxidation and cardiovascular disease risk*. *Curr Atheroscler Rep*, 2004. **6**(6): p. 477-84.
200. Spence, J.D., *Fasting lipids: the carrot in the snowman*. *Can J Cardiol*, 2003. **19**(8): p. 890-2.
201. Steiner, G., *Triglyceride-rich lipoproteins and atherosclerosis, from fast to feast*. *Ann Med*, 1993. **25**(5): p. 431-5.
202. Gronholdt, M.L., et al., *Echolucent carotid artery plaques are associated with elevated levels of fasting and postprandial triglyceride-rich lipoproteins*. *Stroke*, 1996. **27**(12): p. 2166-72.
203. Vogel, R.A., M.C. Corretti, and G.D. Plotnick, *Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects*. *Am J Cardiol*, 1997. **79**(3): p. 350-4.
204. Plotnick, G.D., M.C. Corretti, and R.A. Vogel, *Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal*. *JAMA*, 1997. **278**(20): p. 1682-6.
205. Sies, H., W. Stahl, and A. Sevanian, *Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress*. *J Nutr*, 2005. **135**(5): p. 969-72.
206. Ortega, A., et al., *Dietary fatty acids linking postprandial metabolic response and chronic diseases*. *Food Funct*, 2012. **3**(1): p. 22-7.
207. Wallace, J.P., et al., *Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review*. *Int J Clin Pract*, 2010. **64**(3): p. 389-403.
208. Ansar, S., J. Koska, and P.D. Reaven, *Postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: focus on incretins*. *Cardiovasc Diabetol*, 2011. **10**: p. 61.
209. Hung, H.C., et al., *Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(21): p. 1577-84.
210. Willcox, J.K., S.L. Ash, and G.L. Catignani, *Antioxidants and prevention of chronic disease*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004. **44**(4): p. 275-95.
211. Stahl, W., et al., *Bioavailability and metabolism*. *Mol Aspects Med*, 2002. **23**(1-3): p. 39-100.
212. Carroll, M.F. and D.S. Schade, *Timing of antioxidant vitamin ingestion alters postprandial proatherogenic serum markers*. *Circulation*, 2003. **108**(1): p. 24-31.
213. Park, S. and S.B. Choi, *Effects of alpha-tocopherol supplementation and continuous subcutaneous insulin infusion on*

- oxidative stress in Korean patients with type 2 diabetes. Am J Clin Nutr*, 2002. **75**(4): p. 728-33.
214. Ghanim, H., et al., *A resveratrol and polyphenol preparation suppresses oxidative and inflammatory stress response to a high-fat, high-carbohydrate meal. J Clin Endocrinol Metab*, 2011. **96**(5): p. 1409-14.
215. Hsu, C.L. and G.C. Yen, *Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. Br J Nutr*, 2007. **98**(4): p. 727-35.
216. Kim, H.S., M.J. Quon, and J.A. Kim, *New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. Redox Biol*, 2014. **2**: p. 187-195.
217. Perez-Martinez, P., et al., *Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. Clin Sci (Lond)*, 2010. **119**(6): p. 251-61.
218. Marin, C., et al., *Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(2): p. 267-74.
219. Kolovou, G.D., K.K. Anagnostopoulou, and D.V. Cokkinos, *Pathophysiology of dyslipidaemia in the metabolic syndrome. Postgrad Med J*, 2005. **81**(956): p. 358-66.
220. Genest, J.G., Jr., *Dyslipidemia and coronary artery disease. Can J Cardiol*, 2000. **16 Suppl A**: p. 3A-4A.
221. Cummings, M.H., et al., *Acute hyperinsulinemia decreases the hepatic secretion of very-low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 in NIDDM. Diabetes*, 1995. **44**(9): p. 1059-65.
222. Thompson, G.R., R.P. Naoumova, and G.F. Watts, *Role of cholesterol in regulating apolipoprotein B secretion by the liver. J Lipid Res*, 1996. **37**(3): p. 439-47.
223. Cooper, A.D., *Hepatic uptake of chylomicron remnants. J Lipid Res*, 1997. **38**(11): p. 2173-92.
224. Patsch, J.R., et al., *Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. Arterioscler Thromb*, 1992. **12**(11): p. 1336-45.
225. Kolovou, G.D., et al., *Postprandial lipemia in hypertension. J Am Coll Nutr*, 2003. **22**(1): p. 80-7.
226. Hu, F.B., J.E. Manson, and W.C. Willett, *Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. J Am Coll Nutr*, 2001. **20**(1): p. 5-19.

227. Carpentier, Y.A., L. Portois, and W.J. Malaisse, *n-3 fatty acids and the metabolic syndrome*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1499S-1504S.
228. Moreno, J.J. and M.T. Mitjavila, *The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review)*. *J Nutr Biochem*, 2003. **14**(4): p. 182-95.
229. Silva, K.D., et al., *Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids*. *Atherosclerosis*, 2003. **166**(1): p. 73-84.
230. Jimenez-Gomez, Y., 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**(9): p. 1595-601.
231. Panagiotakos, D.B. and E. Polychronopoulos, *The role of Mediterranean diet in the epidemiology of metabolic syndrome; converting epidemiology to clinical practice*. *Lipids Health Dis*, 2005. **4**: p. 7.
232. Baroni, S.S., et al., *Solid monounsaturated diet lowers LDL unsaturation trait and oxidisability in hypercholesterolemic (type IIb) patients*. *Free Radic Res*, 1999. **30**(4): p. 275-85.
233. Tsimikas, S., et al., *LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(1): p. 122-30.
234. Parthasarathy, S., et al., *Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(10): p. 3894-8.
235. Harrison, D.G., et al., *Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 1987. **80**(6): p. 1808-11.
236. Walker, C. and B.V. Reamy, *Diets for cardiovascular disease prevention: what is the evidence?* *Am Fam Physician*, 2009. **79**(7): p. 571-8.
237. Feart, C., C. Samieri, and P. Barberger-Gateau, *Mediterranean diet and cognitive function in older adults*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(1): p. 14-8.
238. Roman, B., et al., *Effectiveness of the Mediterranean diet in the elderly*. *Clin Interv Aging*, 2008. **3**(1): p. 97-109.

239. Keys, A., et al., *The diet and 15-year death rate in the seven countries study*. Am J Epidemiol, 1986. **124**(6): p. 903-15.
240. Willett, W.C., et al., *Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating*. Am J Clin Nutr, 1995. **61**(6 Suppl): p. 1402S-1406S.
241. Sofi, F., *The Mediterranean diet revisited: evidence of its effectiveness grows*. Curr Opin Cardiol, 2009. **24**(5): p. 442-6.
242. Kourlaba, G. and D.B. Panagiotakos, *Dietary quality indices and human health: a review*. Maturitas, 2009. **62**(1): p. 1-8.
243. Rumawas, M.E., et al., *The development of the Mediterranean-style dietary pattern score and its application to the American diet in the Framingham Offspring Cohort*. J Nutr, 2009. **139**(6): p. 1150-6.
244. Bach, A., et al., *The use of indexes evaluating the adherence to the Mediterranean diet in epidemiological studies: a review*. Public Health Nutr, 2006. **9**(1A): p. 132-46.
245. Sofi, F., et al., *Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis*. BMJ, 2008. **337**: p. a1344.
246. Sanchez-Tainta, A., et al., *Adherence to a Mediterranean-type diet and reduced prevalence of clustered cardiovascular risk factors in a cohort of 3,204 high-risk patients*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2008. **15**(5): p. 589-93.
247. Psaltopoulou, T., et al., *Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(4): p. 1012-8.
248. Trichopoulou, A., C. Bamia, and D. Trichopoulos, *Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece*. Arch Intern Med, 2005. **165**(8): p. 929-35.
249. Trichopoulou, A., et al., *Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study*. BMJ, 2005. **330**(7498): p. 991.
250. Panagiotakos, D., et al., *Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: a multivariate analysis of the ATTICA study*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2009. **19**(4): p. 253-63.
251. Panagiotakos, D.B., et al., *Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study*. Nutrition, 2006. **22**(5): p. 449-56.
252. Agudo, A., et al., *Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the*

- Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain)*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(6): p. 1634-42.
253. Dontas, A.S., et al., *Mediterranean diet and prevention of coronary heart disease in the elderly*. Clin Interv Aging, 2007. **2**(1): p. 109-15.
254. Panagiotakos, D.B., et al., *Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors*. Int J Epidemiol, 2009. **38**(3): p. 856-66.
255. Chrysohoou, C., et al., *Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(1): p. 152-8.
256. Dai, J., et al., *Adherence to the mediterranean diet is inversely associated with circulating interleukin-6 among middle-aged men: a twin study*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 169-75.
257. Perez-Martinez, P., et al., *Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(8): p. 769-77.
258. Moreno, J.J., *Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(9): p. 1073-81.
259. Murkovic, M., et al., *Analysis of minor components in olive oil*. J Biochem Biophys Methods, 2004. **61**(1-2): p. 155-60.
260. Vissers, M.N., P.L. Zock, and M.B. Katan, *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(6): p. 955-65.
261. Waterman, E. and B. Lockwood, *Active components and clinical applications of olive oil*. Altern Med Rev, 2007. **12**(4): p. 331-42.
262. Cicerale, S., et al., *Chemistry and health of olive oil phenolics*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2009. **49**(3): p. 218-36.
263. Konstantinidou, V., et al., *In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial*. FASEB J, 2010. **24**(7): p. 2546-57.
264. Lou-Bonafonte, J.M., et al., *Efficacy of bioactive compounds from extra virgin olive oil to modulate atherosclerosis development*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(7): p. 1043-57.

265. Perona, J.S., R. Cabello-Moruno, and V. Ruiz-Gutierrez, *The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function*. *J Nutr Biochem*, 2006. **17**(7): p. 429-45.
266. Konstantinidou, V., et al., *Characterization of human gene expression changes after olive oil ingestion: an exploratory approach*. *Folia Biol (Praha)*, 2009. **55**(3): p. 85-91.
267. Camargo, A., et al., *Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil*. *BMC Genomics*, 2011. **11**: p. 253.
268. Bogani, P., et al., *Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil*. *Atherosclerosis*, 2007. **190**(1): p. 181-6.
269. Ruano, J., et al., *Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(10): p. 1864-8.
270. Covas, M.I., et al., *Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(4): p. 608-16.
271. Covas, M.I., et al., *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial*. *Ann Intern Med*, 2006. **145**(5): p. 333-41.
272. Perez-Martinez, P., et al., *The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men*. *Atherosclerosis*, 2007. **194**(2): p. e141-6.
273. Carluccio, M.A., et al., *Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(4): p. H2344-54.
274. Dell'Agli, M., et al., *Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation*. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(9): p. 3259-64.
275. Zern, T.L. and M.L. Fernandez, *Cardioprotective effects of dietary polyphenols*. *J Nutr*, 2005. **135**(10): p. 2291-4.
276. Zambonin, L., et al., *Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells*. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. **2012**: p. 839298.
277. Lee, S.J., et al., *Evidence for the association of peroxidases with the antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells*

- exposed to high glucose plus arachidonic acid.* BMB Rep, 2009. **42**(9): p. 561-7.
278. Fito, M., et al., *Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation.* Lipids, 2000. **35**(6): p. 633-8.
279. Masella, R., et al., *Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes.* J Nutr, 2004. **134**(4): p. 785-91.
280. de la Puerta, R., V. Ruiz Gutierrez, and J.R. Houtl, *Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil.* Biochem Pharmacol, 1999. **57**(4): p. 445-9.
281. Aviram, M., *Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants.* Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1996. **34**(8): p. 599-608.
282. Fito, M., et al., *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review.* Ann Ist Super Sanita, 2007. **43**(4): p. 375-81.
283. Del Rio, D., et al., *Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases.* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(14): p. 1818-92.
284. Perez-Herrera, A., et al., *The postprandial inflammatory response after ingestion of heated oils in obese persons is reduced by the presence of phenol compounds.* Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(3): p. 510-4.
285. Perez-Herrera, A., 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**(4): p. 2250-9.
286. Palmieri, V.O., et al., *Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome.* J Nutr, 2006. **136**(12): p. 3022-6.
287. Heitzer, T., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease.* Circulation, 2001. **104**(22): p. 2673-8.
288. Ping Gu, A.X., *Interplay between adipose tissue and blood vessels in obesity and vascular dysfunction.* Rev Endocr Metab Disord., 2013.

289. Subramanian, R. and K.M. MacLeod, *Age-dependent changes in blood pressure and arterial reactivity in obese Zucker rats*. Eur J Pharmacol, 2003. **477**(2): p. 143-52.
290. Ruano, J., et al., *Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(2): p. 341-6.
291. Varela, G., *Tablas de Composición de Alimentos (Spanish) (Food Composition Tables)*. Instituto de Nutrición, CSIC, Madrid. 1980.
292. Allain, C.C., et al., *Enzymatic determination of total serum cholesterol*. Clin Chem, 1974. **20**(4): p. 470-5.
293. Bucolo, G. and H. David, *Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes*. Clin Chem, 1973. **19**(5): p. 476-82.
294. Jones, D.P., *Redefining oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1865-79.
295. Gotoh, T., M. Endo, and Y. Oike, *Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases*. Int J Inflamm, 2011. **2011**: p. 259462.
296. Gabrielli, L.A., et al., *Systemic oxidative stress and endothelial dysfunction is associated with an attenuated acute vascular response to inhaled prostanoid in pulmonary artery hypertension patients*. J Card Fail, 2011. **17**(12): p. 1012-7.
297. Abruzzo, P.M., et al., *Moderate exercise training induces ROS-related adaptations to skeletal muscles*. Int J Sports Med, 2013. **34**(8): p. 676-87.
298. Scheele, C., S. Nielsen, and B.K. Pedersen, *ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise*. Trends Endocrinol Metab, 2009. **20**(3): p. 95-9.
299. Nemoto, S., et al., *Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(19): p. 7311-8.
300. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-90.
301. Cardona, F., et al., *Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome*. Eur J Clin Invest, 2008. **38**(7): p. 510-5.
302. Devaraj, S., et al., *High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome*. Metabolism, 2008. **57**(6): p. 867-70.

303. de Koning, E.J. and T.J. Rabelink, *Endothelial function in the post-prandial state*. *Atheroscler Suppl*, 2002. **3**(1): p. 11-6.
304. Roberts, C.K., N.D. Vaziri, and R.J. Barnard, *Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability*. *Circulation*, 2002. **106**(20): p. 2530-2.
305. Roberts, C.K., 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* (1985), 2006. **100**(5): p. 1657-65.
306. Inoguchi, T. and H. Nawata, *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**(4): p. 495-501.
307. Faraci, F.M. and S.P. Didion, *Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1367-73.
308. Rahman, I., et al., *Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(1-2): p. 42-59.
309. Holmgren, A. and J. Lu, *Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(1): p. 120-4.
310. Halliwell, B. and C.Y. Lee, *Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **13**(2): p. 145-56.
311. Schleicher, E. and U. Friess, *Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis*. *Kidney Int Suppl*, 2007(106): p. S17-26.
312. Findeisen, H.M., et al., *Oxidative stress accumulates in adipose tissue during aging and inhibits adipogenesis*. *PLoS One*, 2011. **6**(4): p. e18532.
313. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(9): p. 1905-14.
314. Fernandez-Sanchez, A., et al., *Inflammation, oxidative stress, and obesity*. *Int J Mol Sci*, 2011. **12**(5): p. 3117-32.
315. Gustafson, B., *Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis*. *J Atheroscler Thromb*, 2010. **17**(4): p. 332-41.
316. Camargo, A., et al., *Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people*. *Br J Nutr*, 2012. **108**(3): p. 500-8.

317. Marin, C., et al., *Mediterranean diet reduces senescence-associated stress in endothelial cells*. Age (Dordr), 2012. **34**(6): p. 1309-16.
318. Stenvinkel, P., *Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link?* Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(10): p. 1968-71.
319. Montero, D., et al., *Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention*. Obes Rev, 2012. **13**(5): p. 441-55.
320. Wadsworth, R.M., *Oxidative stress and the endothelium*. Exp Physiol, 2008. **93**(1): p. 155-7.
321. Mena, M.P., et al., *Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(1): p. 248-56.
322. Covas, M.I., *Olive oil and the cardiovascular system*. Pharmacol Res, 2007. **55**(3): p. 175-86.
323. Willett, W.C., *The Mediterranean diet: science and practice*. Public Health Nutr, 2006. **9**(1A): p. 105-10.
324. Frankel, E.N., *Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil*. J Agric Food Chem, 2011. **59**(3): p. 785-92.
325. Kutuk, O. and H. Basaga, *Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis*. Trends Mol Med, 2003. **9**(12): p. 549-57.
326. Lee, Y., et al., *The effects of labour and of interleukin 1 beta upon the expression of nuclear factor kappa B related proteins in human amnion*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(4): p. 213-8.
327. Niu, J. and P.E. Kolattukudy, *Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(3): p. 95-109.
328. O'Neill, L.A., *Counter-regulation in the IKK family*. Biochem J, 2011. **434**(1): p. e1-2.
329. Lobry, C., et al., *Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 908-13.
330. Tkacova, R., et al., *Effects of hypoxia on adipose tissue expression of NFkappaB, IkappaBalph, IKKgamma and IKAP in patients with chronic obstructive pulmonary disease*. Cell Biochem Biophys, 2013. **66**(1): p. 7-12.
331. Ray, G. and S.A. Husain, *Oxidants, antioxidants and carcinogenesis*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(11): p. 1213-32.

332. Bourens, M., et al., *Redox and reactive oxygen species regulation of mitochondrial cytochrome C oxidase biogenesis*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **19**(16): p. 1940-52.
333. Pacheco, Y.M., et al., *Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects*. *Br J Nutr*, 2007. **98**(2): p. 260-3.
334. Gargalovic, P.S., et al., *The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(11): p. 2490-6.
335. Li, Y., et al., *Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(23): p. 21763-72.
336. Sohal, R.S. and W.C. Orr, *The redox stress hypothesis of aging*. *Free Radic Biol Med*. **52**(3): p. 539-55.
337. Junqueira, V.B., et al., *Aging and oxidative stress*. *Mol Aspects Med*, 2004. **25**(1-2): p. 5-16.
338. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. *J Gerontol*, 1956. **11**(3): p. 298-300.
339. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
340. Sohal, R.S., P.L. Toy, and K.J. Farmer, *Age-related changes in the redox status of the housefly, *Musca domestica**. *Arch Gerontol Geriatr*, 1987. **6**(2): p. 95-100.
341. Rebrin, I. and R.S. Sohal, *Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. **60**(13-14): p. 1545-52.
342. Viridis, A., et al., *Vascular generation of tumor necrosis factor-alpha reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients*. *J Am Coll Cardiol*, 2011. **58**(3): p. 238-47.
343. Tesouro, M. and C. Cardillo, *Obesity, blood vessels and metabolic syndrome*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2011. **203**(1): p. 279-86.
344. Hansel, B., et al., *Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. **89**(10): p. 4963-71.

345. Meigs, J.B., et al., *Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study*. *Diabetes Care*, 2007. **30**(10): p. 2529-35.

X. ANEXOS

Publicaciones derivadas de la Tesis

1. Meza-Miranda ER, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Tinahones FJ, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J. **Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people.** Age (Dordr). 2014 Apr; 36 (2):507-17
2. Meza-Miranda ER, Rangel-Zuñiga OA, Marin C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Haro Mariscal C, Peña-Orihuela P, Jiménez-Morales AI, Malagón MdelM, TinahonesFJ, Lopez-Miranda J, Camargo A, Perez-Jimenez F. **Phenolic compounds from virgin olive oil modulate the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium.** (en vías de publicación).

Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people

Eliana Romina Meza-Miranda · Antonio Camargo · Oriol Alberto Rangel-Zuñiga · Javier Delgado-Lista · Antonio Garcia-Rios · Pablo Perez-Martinez · Inma Tasset-Cuevas · Isaac Tunez · Francisco J. Tinahones · Francisco Perez-Jimenez · José Lopez-Miranda

Received: 23 January 2013 / Accepted: 5 August 2013 / Published online: 21 August 2013
© American Aging Association 2013

Abstract We have investigated whether dietary fat modifies the postprandial oxidative stress in adipose tissue of elderly people. Twenty participants received three diets for 4 weeks each: SFA-rich diet, Mediterranean (Med) diet enriched in MUFA with virgin olive oil, and a low-fat, high-carbohydrate diet enriched in *n*-3 PUFA (α -linolenic acid from plant origin) (CHO-PUFA diet). After 12 h of fasting, volunteers received a breakfast

reflecting the fatty acid composition of the diet ingested in the preceding dietary period. Med diet induced higher postprandial *SOD2* and *TxxR* mRNA levels, and CHO-PUFA diet induced higher *GPx1* and *TxxR* mRNA levels compared with SFA-rich diet. Med and CHO-PUFA breakfasts induced a postprandial increase in plasma reduced glutathione (GSH), and a greater postprandial GSH/oxidized glutathione ratio compared to the SFA-rich diet. Our study suggests that the consumption of Med and CHO-PUFA diets may reduce postprandial oxidative stress compared to an SFA-rich diet, which may be due to higher antioxidant enzymes gene expression in adipose tissue.

Eliana Romina Meza-Miranda and Antonio Camargo equally contributed to this work.

E. R. Meza-Miranda · A. Camargo · O. A. Rangel-Zuñiga · J. Delgado-Lista · A. Garcia-Rios · P. Perez-Martinez · F. Perez-Jimenez · J. Lopez-Miranda (✉)
Lipids and Atherosclerosis Research Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Córdoba,
Avda. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba, Spain
e-mail: jlopezmir@uco.es

E. R. Meza-Miranda · A. Camargo · O. A. Rangel-Zuñiga · J. Delgado-Lista · A. Garcia-Rios · P. Perez-Martinez · F. J. Tinahones · F. Perez-Jimenez · J. Lopez-Miranda
CIBER Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III,
Madrid, Spain

I. Tasset-Cuevas · I. Tunez
Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Faculty of Medicine, IMIBIC/Hospital Universitario
Reina Sofia/Universidad de Cordoba,
14004 Cordoba, Spain

F. J. Tinahones
Hospital Virgen de la Victoria,
Málaga, Spain

Keywords Oxidative stress · Postprandial state · Aging · Dietary fat · Metabolic syndrome

Introduction

Several theories have been put forward to explain the aging process. Among these, the free radical theory points towards oxidative stress as the main determinant in the deleterious and cumulative effects in the biology of aging and in many age-associated degenerative diseases (Sohal and Orr 2012; Junqueira et al. 2004; Harman 1956). Additionally, increased oxidative stress has been reported in elderly subjects, involving processes such as an age-related increase in mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production and a progressive decline in the reduced glutathione (GSH):oxidized glutathione

(GSSG) ratio and redox potential (Sohal et al. 1987; Rebrin and Sohal 2008).

Although ROS have physiological functions such as their generation by phagocytic cells in host defense mechanisms, muscle adaptation to exercise (Abruzzo et al. 2013; Scheele et al. 2009), signal transducers generated as proliferative response (Finkel 1998), and mitochondrial-derived oxidants which seems to function as signaling molecules (Nemoto et al. 2000; Nishikawa et al. 2000), high levels of ROS influence numerous cellular processes linked to aging and the development of age-related diseases (Finkel and Holbrook 2000).

Oxidative stress occurs when cells are subjected to excessive levels of ROS and/or to a depletion in the antioxidant defenses (Scandalios 2002; Durackova 2009). Obesity is a condition which is also related to cardiovascular disease (CVD), in addition to other pathologies such as insulin resistance (Alberti et al. 2009; Eckel et al. 2010), and is characterized by high oxidative damage, as shown by increased oxidative stress plasma biomarkers (Armutcu et al. 2008; Scandalios 2002). Oxidative stress is defined as the imbalance between the production of ROS and their elimination by the antioxidant system (Durackova 2009). In obesity, it has been demonstrated that systemic oxidative stress is caused by ROS production in the adipose tissue but not in other tissues. This is a consequence of an increase in the expression of NADPH oxidase, an enzyme involved in the production of ROS (Inoguchi and Nawata 2005), and by a decrease in the expression of antioxidant enzymes (Palmieri et al. 2006; Furukawa et al. 2004). In addition, it has been proposed that adipose tissue oxidative stress is responsible for the development of metabolic syndrome (MetS), through dysregulation of the release of adipocytokines and by generating systemic oxidative stress (Palmieri et al. 2006; Furukawa et al. 2004). Therefore, the increased oxidative stress in elderly subjects (Sohal et al. 1987; Rebrin and Sohal 2008) could be involved in the relationship between aging and development of MetS.

In fact, aging is associated with increased prevalence of MetS (Hildrum et al. 2007; Ford et al. 2002), a multicomponent disorder characterized by hypertriglyceridemia, low HDL cholesterol, hyperglycemia, abdominal obesity, and hypertension, and closely linked to CVD and type 2 diabetes mellitus (T2DM) (Eckel et al. 2010). Additionally, age is also a risk

factor for developing hypertension (McEniery et al. 2007). Moreover, aging is also associated to low-grade inflammation, which, together with increased oxidative stress, the key factor responsible for age-induced endothelial dysfunction (Taddei et al. 2001; Hamilton et al. 2001), contribute to the pathophysiological alterations that link aging with CVD (Herrera et al. 2010; Bruunsgaard et al. 2001).

Studies in experimental models have shown the importance of diet in studies on aging, since oxidative stress is directly modulated by the type of dietary fat. In fact, these studies have shown the existence of the relationship between dietary fat intake, aging, and oxidative stress (Sun et al. 2012; Yubero-Serrano et al. 2011; Ochoa et al. 2003). Additionally, it has been demonstrated in animal models that the use of antioxidants as dietary supplements increases their lifespan (Wang et al. 2013).

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 (Phillips et al. 2006). Thus, the modulation of oxidative stress by fat composition (Roberts et al. 2002; Roberts et al. 2006) may be the mechanism by which, at least partially, dietary fat could affect MetS development.

However, most of the studies have assessed oxidative stress in the fasting state, and humans spend most of the day in the postprandial state. Postprandial oxidative stress is characterized by an increase in oxidative stress biomarkers after the intake of a meal (Cardona et al. 2008; Devaraj et al. 2008; Ursini and Sevanian 2002), which is extremely important, as humans spend most of their time in the postprandial state (de Koning and Rabelink 2002). In line with this, we previously demonstrated that a MUFA-rich diet improves plasma postprandial oxidative stress parameters compared to an SFA-rich diet, and that low-fat diets have an intermediate effect relative to the MUFA-rich and SFA-rich diets (Perez-Martinez et al. 2010). Additionally, in the same population used in the current study, we have previously demonstrated that the consumption of a Mediterranean (Med) diet reduces endothelial dysfunction (Marin et al. 2010) and postprandial inflammatory response (Camargo et al. 2011) compared to the consumption of SFA-rich and high-carbohydrate diet enriched in *n*-3 PUFA (CHO-PUFA) diets.

In this study, we hypothesized that adipose tissue may be a key tissue in the oxidative stress status of

elderly people and that diet, and specifically the composition of dietary fat, may modulate this process. Our aim was to explore the molecular mechanism that may trigger the diet-induced changes in postprandial oxidative stress, as assessed by the plasma GSH:GSSG ratio, by analyzing the gene expression of NADPH oxidase (involved in ROS production) and the antioxidant enzymes in adipose tissue from elderly people.

Experimental procedures

Participants and recruitment

The study was performed on 20 free-living elderly subjects (10 men and 10 women). Recruitment of the patients took place between 1 January 2006 and 1 January 2007. Informed consent was obtained from all participants, and all underwent a comprehensive medical history, physical examination, and clinical chemistry analysis before enrolment. None of the subjects showed evidence of chronic illness, such as hepatic, renal, thyroid, or cardiac dysfunction, and they were requested to maintain their regular physical activity and lifestyle and asked to record in a diary any event that could affect the outcome of the study, such as stress, change in smoking habits and alcohol consumption, or intake of foods not included in the experimental design. Of those enrolled, six participants had high blood pressure, two had hyperlipidemia, and three had diabetes mellitus. None of the participants showed evidence of high alcohol consumption or family history of early-onset CVD. None of the participants were active smokers. This study was conducted according to the guidelines laid down in the Declaration of Helsinki, and all procedures involving human subjects/patients were approved by The Human Investigation Review Committee at Reina Sofia University Hospital (Córdoba, Spain).

Randomization and intervention

Participants were randomly assigned to receive, in a crossover design, three diets each for a period of 4 weeks: (1) Med diet enriched in MUFA with virgin olive oil, containing 15 % of energy as protein, 47 % as carbohydrate, and 38 % as fat (24 % MUFA provided by virgin olive oil, 10 % SFA, 4 % PUFA of which 0.4 % was α -linolenic acid); (2) SFA-rich diet, with 15 % of energy as protein, 47 % as carbohydrate, and

38 % as fat (12 % MUFA, 22 % SFA, and 4 % PUFA with 0.4 % α -linolenic acid); (3) low-fat, high-carbohydrate diet enriched in *n*-3 PUFA (CHO-PUFA diet), with 15 % of energy as protein, 55 % as carbohydrate, and 30 % as fat (10 % SFA, 12 % MUFA, and 8 % PUFA with 2 % α -linolenic acid). The cholesterol intake was constant (300 mg/day) throughout the three periods. The *n*-3 PUFA enrichment of the high-CHO and low-fat diet was achieved via the use of natural food components rich in α -linolenic acid of plant origin (based on walnuts; *Juglans regia* L.). Carbohydrate intake from the CHO-PUFA diet was based on the consumption of biscuits and jam and bread. From the Med diet, 80 % of the MUFA was provided by virgin olive oil, which was used for cooking, salad dressing, and as a spread. Butter was used as the main source of SFA during the SFA dietary period. At the end of each dietary intervention period and after a 12-h fast, the subjects were given a fat meal consisting of a breakfast with a composition similar to that consumed in each of the diets, and with 50–60 % of the subject's daily normal intake of energy. The methodology of the fat meal test has been validated and extensively used by our unit (Jimenez-Gomez et al. 2009; Jimenez-Gomez et al. 2010; Lopez-Miranda et al. 2007), and is described next. The composition of the experimental diets was calculated by using the US Department of Agriculture (Human Nutrition Information Service 1987) food tables and Spanish food composition tables for local foodstuffs (Varela 1980). Before the start of the intervention period, the volunteers completed a 3-day weighed food diary and an extensive Food Frequency Questionnaire (FFQ) (31), which allowed the identification of foods to be modified. Fat foods were administered by dietitians in the intervention study. At the start of the intervention period, each patient was provided with a handbook for the diet to which they had been randomly assigned, which included 14 menus elaborated with regular solid foods. Advice was given on the foods to choose and those to avoid when eating outside the home. At baseline, volunteers were provided with a supply of study foods to last for 2 weeks and collected additional study foods every fortnight or when required. At these times, a 24-h recall of the previous day's food intake and a short food use questionnaire based on the study foods were completed to monitor and motivate volunteers to adhere to the dietary advice. A score was used to assess the number of food exchanges achieved in the 24-h recall and additional advice was given if either the 24-h recall or the FFQ

showed inadequate intake of food exchange options. Volunteers were asked to complete 3-day weighed food diaries at baseline, week 2, and week 4. Weighed food intake over two weekdays and one weekend day was obtained by using scales provided by the investigators. A dietary analysis software program (Dietsource version 2.0; Novartis, Barcelona, Spain) was used in the nutritional evaluation of the menus. Biochemical laboratory personnel were unaware of the dietary period that each participant was following for each determination.

Collection of blood and urine samples

Venous blood samples were obtained at the end of each dietary intervention period during the fasting state, after a 12-h fast, before ingesting breakfast, and at 2 and 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 and kept in the dark. Special care was taken to avoid exposure to air, light, and ambient temperature. The plasma was separated from the whole blood by low-speed centrifugation at $1,500 \times g$ for 15 min at 4°C within 1 h of extraction. Urine samples were obtained at the end of each dietary intervention period during the fasting state, after a 12-h fast, before ingesting breakfast, and at 4 h after the ingestion of the breakfast.

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) (M & I Medical Sales, Inc., Miami, Florida, USA). Samples were obtained to the study of postprandial adipocyte function at 4 h of administration of the fatty meal. Immediately after extraction, samples were stored in Eppendorf with RNA later until RNA extraction.

RNA isolation from adipose tissue

Adipose tissue was homogenized by Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik). After lipid removal from the top of the tube, RNA was isolated with a commercial kit RiboPure (Ambion, Applied Biosystem, Austin, TX, USA) that is designed for rapid purification of high-quality RNA, which 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).

Gene expression by real-time PCR

Retrotranscription reaction was performed with 1 μg of total RNA by the commercial kit iScript[®] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer instructions. Real-time PCR reactions were carried out using the OpenArray[™] NT Cyclor system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The gene expression analysis was performed in samples from 20 subjects and was duplicated at the postprandial state, 4 h after the meal intake. Primer pairs were selected from the database TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>) for the following genes: 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 (TrxR), and NADPH oxidase subunits (gp91^{phox}, p22^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} and p40^{phox}). The relative expression for each gene was calculated using the ribosomal protein, large, P0 (*RPLP0*) as housekeeping gene. The data set was analyzed by OpenArray[®] real-time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems).

Biomarkers of oxidative stress determination

Levels of GSH and GSSG were calculated to determine the GSH/GSSG ratio in plasma samples using BIOXYTECH[®] GSH-400 (OXIS International Inc., Portland, OR, USA) and GSH-412 Kit (OXIS International Inc.), respectively. The isoprostane content was measured in urine samples by using BIOXYTECH 8-Isoprostane Assay Immunoassay for 8-epi-prostaglandin F2a (OXIS International, Inc.). Lipid peroxidation is a mechanism of cellular and molecular injury. Plasma concentrations of lipid peroxidation products (LPO) were measured by using the Bioxytech LPO-586 Kit (OXIS International Inc.).

Statistical analyses

SPSS statistical software, version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for statistical analysis. The normal

distribution of variables to characterize the postprandial response was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. The gene expression data were analyzed by using analysis of variance ANOVA. We used ANOVA for repeated measurements to determine the postprandial effect of the fat meal composition, with dietary intervention as the intersubject factor for the GSH and GSH:GSSG ratio, as well as lipoperoxide and isoprostane data. The global p values indicate the following: P1, the effect of the diet and fat meal composition ingested (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.

Results

Baseline characteristics

The baseline characteristics of the 20 participants who completed the three dietary intervention periods have already been described (Marin et al. 2011). To sum up, the subjects (10 men and 10 women) had an average age of 67.1 (SEM 4.52) years and an average BMI of 31.9 (SEM 5.50) kg/m^2 .

Diet and NADPH oxidase gene expression in adipose tissue

We analyzed the effect of the three dietary models, Med diet, SFA-rich diet, and CHO-PUFA diet, on the postprandial adipose tissue gene expression of the NADPH oxidase subunits ($p22^{phox}$, $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$, and $gp91^{phox}$) at 4 h after the administration of a breakfast with a fat composition similar to the dietary period ended (Table 1).

We found that Med diet consumption decreased the postprandial $p47^{phox}$ mRNA levels compared to the consumption of SFA and CHO-PUFA diets ($p=0.022$ and $p=0.044$, respectively) and increased the postprandial $p22^{phox}$ subunit mRNA levels compared to the consumption of a CHO-PUFA diet ($p=0.001$). No significant differences were found in the $p40^{phox}$, $p67^{phox}$, and $gp91^{phox}$ subunit mRNA levels between diets.

Diet and antioxidant enzyme gene expression in adipose tissue

In addition, we studied the effect of Med diet, SFA-rich diet, and CHO-PUFA diet consumption on the postprandial gene expression of the antioxidant enzymes *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *GPx3*, and *GPx4* (Fig. 1).

We observed higher postprandial *SOD2* mRNA levels after the consumption of the Med diet than after the consumption of the SFA-rich diet ($p=0.016$), as well as higher postprandial *GPx3* mRNA levels than after the consumption of the CHO-PUFA diet ($p=0.001$). Moreover, we found that postprandial *GPx1* mRNA levels were higher after the consumption of the CHO-PUFA diet than after the consumption of the SFA-rich diet ($p=0.048$).

No significant differences were found in the *SOD1*, *CAT*, and *GPx4* mRNA levels between diets.

Diet and antioxidant redox-related protein gene expression in adipose tissue

We have also studied the gene expression of *TXN*, a small redox protein involved in ROS detoxification, and *TrxR*, the enzyme that reduces thioredoxin from its oxidized form to its reduced form, which is active in terms of ROS detoxification (Fig. 1). Although we did not observe any significant differences in the *TXN* mRNA levels between diets, we found higher *TrxR* mRNA levels after the consumption of the Med and CHO-PUFA diets than after the consumption of the SFA-rich diet (both $p<0.001$).

Diet and oxidative stress status

In order to assess whether the dietary effect on adipose tissue gene expression also affects oxidative stress status, we determined both the plasma GSH levels and the GSH/GSSG ratio (Fig. 2), which is a parameter that correlates with the biological redox status (Jones 2006).

We did not find any differences in the fasting GSH levels between diets. However, we did find a postprandial increase in the plasma concentration of GSH after the intake of the Med and CHO-PUFA breakfasts ($p<0.05$ between values at 2 and at 4 h after the intake of the breakfasts as compared to the fasting state), whereas we did not observe any change after the SFA-rich breakfasts.

Table 1 Postprandial adipose tissue NADPH oxidase subunits mRNA levels

Genes	SFA-rich diet	Med diet	CHO-PUFA diet	<i>p</i> value
p91phox	0.016±0.004	0.029±0.006	0.017±0.006	0.293
p22phox	0.029±0.007 ^{a,b}	0.062±0.010 ^a	0.016±0.002 ^b	0.001
p47phox	0.003±0.001 ^a	0.000±0.000 ^b	0.002±0.001 ^a	0.008
p40phox	0.012±0.001	0.034±0.004	0.034±0.017	0.205
p67phox	0.003±0.001	0.002±0.001	0.003±0.001	0.756

Values are mean±SEM of the mRNA levels at 4-h after the breakfast with a fat composition similar to the dietary period ended. *p* values are from one-way ANOVA statistical analysis. Row with superscripts without a common letter differ significantly $p<0.05$ between diets in the post hoc analysis by using Bonferroni's multiple comparisons test

SFA-rich saturated fatty acid rich diet, *Med diet* Mediterranean diet enriched in MUFA with virgin olive oil, *CHO-PUFA diet* Low-fat, high-carbohydrate diet enriched in *n-3* PUFA (α -linolenic acid from plant origin)

Furthermore, we observed that the GSH/GSSG ratio increased at 2 h after the intake of the Med breakfast ($p=0.024$), whereas it remained unchanged after the intake of the SFA-rich and CHO-PUFA breakfasts. However, the GSH/GSSG ratio increased at 4 h after the intake of all breakfasts ($p=0.004$, $p=0.002$, and $p=0.004$ after the SFA-rich, Med, and CHO-PUFA diets, respectively). Additionally, the intake of Med and CHO-PUFA breakfasts led to a higher GSH/GSSG ratio, as it increased at 4 h compared with the 2 h ratio ($p=0.025$ and $p=0.010$, respectively).

We also analyzed urinary isoprostane and plasma lipoperoxide levels at the end of each dietary intervention, in fasting and in the postprandial state. We observed that urinary isoprostanes increased in the postprandial state ($p<0.001$). Post hoc statistical analysis showed that taken together, both fasting and postprandial measurements, the consumption of Med diet induced a lower urinary isoprostane level as compared to the consumption of SFA-rich and CHO-PUFA diets ($p=0.001$ and $p=0.025$, respectively). Likewise, we also observed that taken together, both fasting and postprandial measurements, the consumption of the Med diet induced a lower plasma lipoperoxide level as compared to the consumption of the SFA-rich diet ($p=0.031$).

Correlations between postprandial antioxidant enzyme gene expression in adipose tissue, plasma oxidative stress biomarkers

We analyzed the relationship between the postprandial antioxidant enzyme gene expression in adipose tissue (mRNA levels for *CAT*, *SOD1*, *SOD2*, *GPx1*, *GPx3*, *GPx4*, *TXN*, and *TrxR*) and the plasma isoprostane and

lipoperoxide concentrations and GSH/GSSG ratio in the postprandial state (Table 2). We found a negative correlation between the postprandial *GPx3* gene expression with a urinary isoprostane concentration (r , -0.536 ; $p<0.001$), a negative correlation between the postprandial *TrxR* gene expression with a plasma lipoperoxide concentration (r , -0.261 ; $p=0.053$), and a positive correlation between the postprandial *GPx4* gene expression with the GSH/GSSG ratio (r , 0.324 ; $p=0.011$).

Discussion

The postprandial state is a stressful condition in which an increase in oxidative stress takes place (Cardona et al. 2008; Devaraj et al. 2008; Ursini and Sevanian 2002). Postprandial oxidative stress is characterized by an imbalance between the production of ROS and their elimination by the antioxidant system (Durackova 2009). Moreover, the importance of studying the postprandial state also lies in the fact that because of current dietary habits, modern humans spend most of the time in the postprandial state (de Koning and Rabelink 2002). Additionally, oxidative stress modulation by diet (Roberts et al. 2002; Roberts et al. 2006), may be the mechanism by which, at least partially, dietary fat may affect the development of MetS, since it has been shown that oxidative stress may be responsible for the development of MetS (Palmieri et al. 2006; Furukawa et al. 2004).

Our data has shown that the ROS detoxification process in adipose tissue is reduced by SFA-rich diet consumption but not by Med or CHO-PUFA diets in the postprandial state, which therefore leads to an imbalance between ROS production and inactivation and, as a

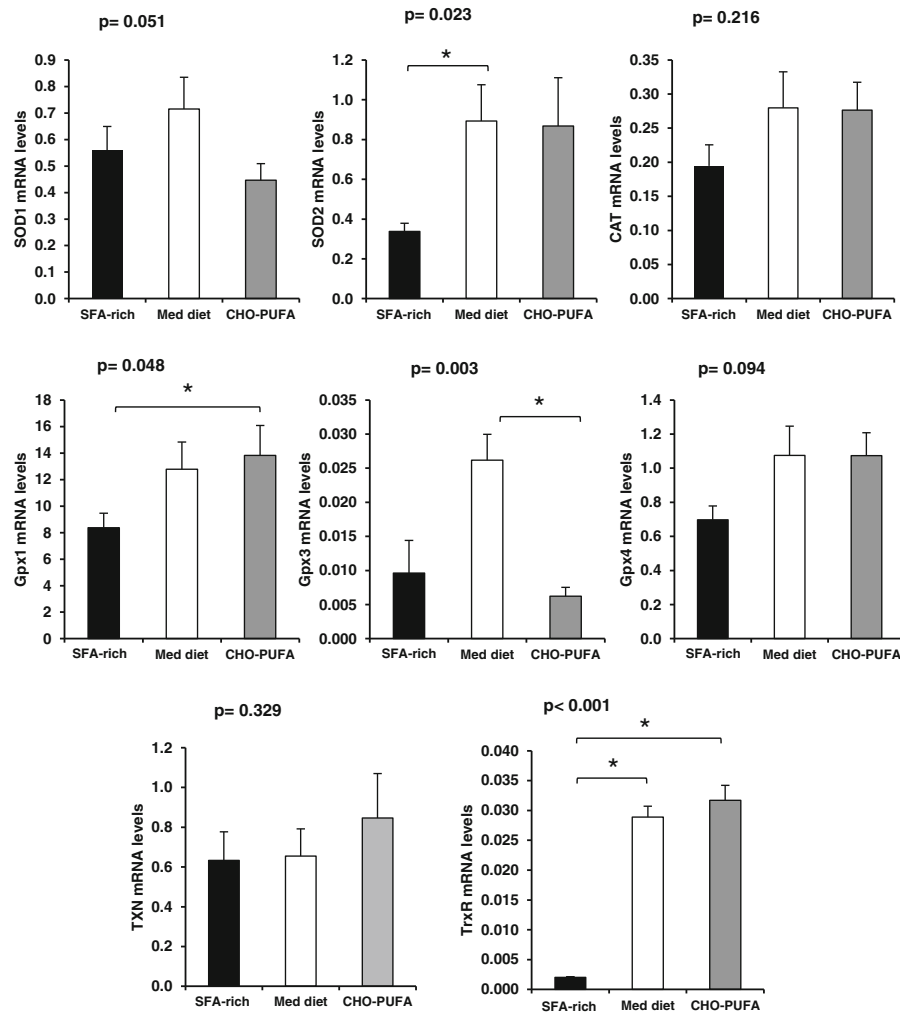


Fig. 1 Postprandial adipose tissue antioxidant enzyme mRNA levels. Values are mean \pm SEM of the mRNA levels at 4 h after the breakfast with a fat composition similar to the dietary period ended. *SFA-rich* saturated fatty acid rich diet; *Med* Mediterranean diet enriched in MUFA with virgin olive oil; *CHO-PUFA* Low-fat,

high-carbohydrate diet enriched in *n-3* PUFA (α -linolenic acid from plant origin). One-way ANOVA statistical analysis. * p <0.05 between diets in the post hoc analysis by using Bonferroni's multiple comparisons test

consequence, higher postprandial oxidative stress after the consumption of an SFA-rich diet. Consistent with this, we observed that Med and CHO-PUFA diet consumption reduces postprandial oxidative stress, as assessed by GSH plasma levels and the GSH/GSSG ratio, as compared to an SFA-rich diet.

Although ROS are generated as by-products of metabolism, several enzymes, among which is NADPH oxidase, are also involved in ROS production (Inoguchi and Nawata 2005). Our study showed that the postprandial gene expression of NADPH oxidase subunits was dysregulated by the consumption of the different diets, but there was no defined pattern of upregulation or

downregulation after any specific diet. In fact, although p22^{phox} NADPH oxidase subunit mRNA level were higher after the consumption of Med diet than after the consumption of CHO-PUFA diet, and the p47^{phox} NADPH oxidase subunit mRNA level were lower after the consumption Med diet than after the consumption of SFA-rich and CHO-PUFA diets, we did not find a defined pattern of NADPH oxidase upregulation or downregulation after the consumption of any of the diets. In addition, no gene expression changes were observed in mRNA levels of p91^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox} NADPH oxidase subunits between diets. Therefore, an upregulation of the NADPH oxidase subunit adipose

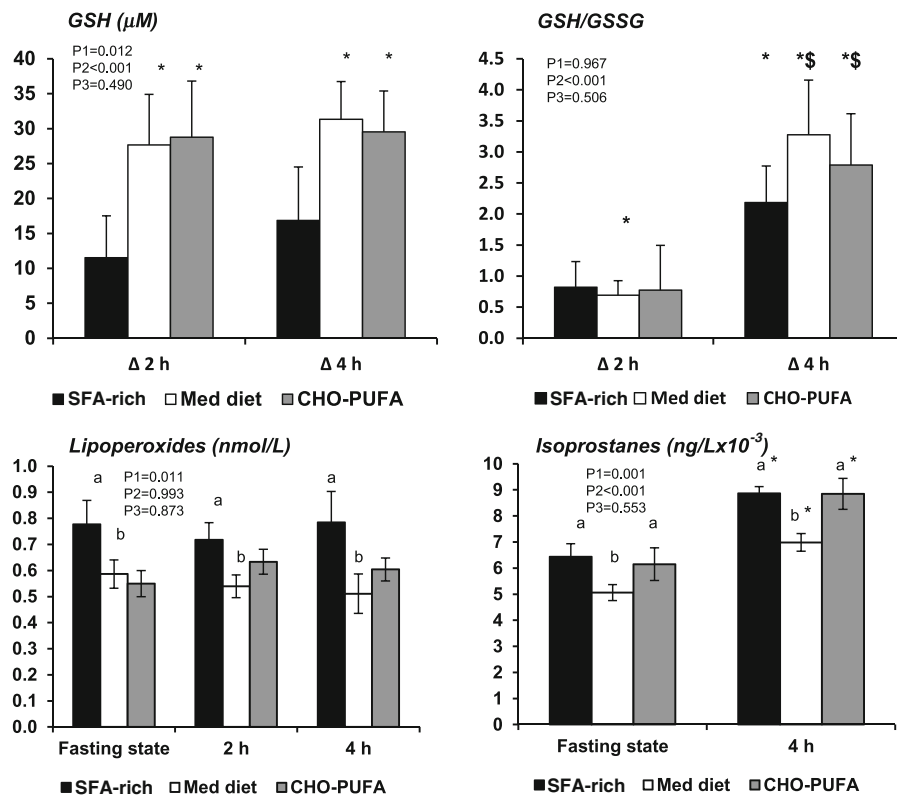


Fig. 2 Oxidative stress parameters. Values are mean \pm SEM of the GSH (in micromolars) and GSH:GSSG ratio increments between time 0 and time 2 ($\Delta 2\text{ h}$) and between time 0 and time 4 ($\Delta 4\text{ h}$) after the intake of the breakfast with a fat composition similar to the dietary period ended. *SFA-rich* saturated fatty acid rich diet; *Med* Mediterranean diet enriched in MUFA with virgin olive oil; *CHO-PUFA* Low-fat, high-carbohydrate diet enriched in *n-3*

PUFA (α -linolenic acid from plant origin). ANOVA for repeated measures was performed, 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 versus fasting state. ^{\\$}*p*<0.05 versus 2-h after meal intake. *Different letters*: the differences between diets are statistically significant (*p*<0.05)

tissue gene expression may be discarded as the mechanism responsible for the higher oxidative stress observed after the consumption of an SFA-rich diet.

Nevertheless, we observed differences between the diets in the postprandial gene expression of the antioxidant defense system in adipose tissue from elderly people.

The antioxidant enzymes *SOD*, *GPx*, and *CAT* are regarded as the first line of defense against the ROS generated during oxidative stress (Gabrielli et al. 2011). *SOD* converts O_2^- into H_2O_2 , which is, in turn, converted into water or molecular oxygen by either *CAT* or *GPx*. Additionally, *GPx4* isoform is mainly involved in the

Table 2 Correlations between postprandial antioxidant enzymes gene expression in adipose tissue and plasma oxidative stress parameter in the MetS patients, 4 h after the administration of the fatty meal with a fat composition similar to that consumed in each of the SFA-rich, Mediterranean, and CHO-PUFA diets. Pearson's linear correlation coefficient

	Isoprostanes	Lipoperoxides	GSH:GSSG
CAT	0.016, <i>p</i> =0.899	-0.127, <i>p</i> =0.355	0.156, <i>p</i> =0.234
SOD1	-0.212, <i>p</i> =0.102	0.021, <i>p</i> =0.878	-0.025, <i>p</i> =0.847
SOD2	0.196, <i>p</i> =0.133	-0.143, <i>p</i> =0.294	-0.098, <i>p</i> =0.454
GPx1	-0.048, <i>p</i> =0.714	0.186, <i>p</i> =0.174	0.009, <i>p</i> =0.946
GPx3	-0.536, <i>p</i> <0.001	0.044, <i>p</i> =0.786	-0.037, <i>p</i> =0.816
GPx4	0.029, <i>p</i> =0.824	-0.026, <i>p</i> =0.845	0.324, <i>p</i> =0.011
TXN	0.019, <i>p</i> =0.885	-0.118, <i>p</i> =0.390	0.034, <i>p</i> =0.799
TrxR	-0.173, <i>p</i> =0.184	-0.261, <i>p</i> =0.053	0.074, <i>p</i> =0.570

detoxification of lipid hydroperoxides generated by the action of $\cdot\text{O}_2^-$ (Faraci and Didion 2004; Mates et al. 1999; Rahman et al. 2005). Our results showed that the gene expression of the mitochondrial *SOD* isoform, *SOD2*, seems to be modulated by dietary fat rather than by the cytoplasmic isoform *SOD1*. Although no differences in gene expression between diets were observed for *SOD1* gene expression, we observed higher *SOD2* mRNA levels after the Med diet than after the consumption of an SFA-rich diet. In addition, *SOD2* mRNA levels after the CHO-PUFA diet tended to be higher than after the consumption of an SFA-rich diet although it did not reach the statistical significance.

Taken together, our results showed that both Med and CHO-PUFA diets increase the postprandial gene expression profile of the antioxidant defense system, and therefore the ROS detoxification rate in the adipose tissue, as compared to an SFA-rich diet. In line with the adipose tissue gene expression results, our study showed that the consumption of Med and CHO-PUFA diets reduces postprandial oxidative stress in elderly people, on the basis of the higher values found after the consumption of Med and CHO-PUFA diets as compared to an SFA-rich diet in postprandial plasma GSH levels and the GSH/GSSG ratio, a parameter that correlates with biological redox status (Jones 2006) and decreases as a consequence of glutathione oxidation (Jones 2002). Additionally, the measurement of two other oxidative stress biomarkers, isoprostanes and lipoperoxides, both of which oxidative stress-derived molecules, supports this idea.

The transcription of the antioxidant defense system genes is regulated by the Nrf2 transcription factor (Jaiswal 2004), which in response to oxidative stress migrates to the nucleus and promotes the expression of antioxidant enzymes, controlling the balance between ROS and antioxidant enzymes (Kobayashi and Yamamoto 2005; Xu et al. 2008). Our results suggest that diet, and specifically the composition of dietary fat, may interact with the regulatory mechanisms controlling the transcription of antioxidant genes. In fact, the activation of Nrf2 in response to the postprandial oxidative stress may be inhibited by the consumption of saturated fat.

The relationship between adipose tissue antioxidant enzyme gene expression and redox status is also supported by the fact that the gene expression of *GPx3* and *TrxR* negatively correlates with postprandial urinary isoprostane and plasma lipoperoxide levels, respectively,

and the postprandial gene expression of *GPx4* positively correlates with the GSH/GSSG ratio. Therefore, as the values of the antioxidant enzyme gene expression increase, the values of the oxidative stress biomarkers decrease and the GSH/GSSG ratio increases, showing lower oxidative stress.

In conclusion, our study suggest that the consumption of Med and CHO-PUFA diets may reduce postprandial oxidative stress as compared to an SFA-rich diet in elderly people, and that this reduction may be due to a higher gene expression of the antioxidant defense system in the adipose tissue.

The implications of this study for nutrition, and for the health of the elderly population, lie in the fact that, in addition to the improvement in the endothelial function (Marin et al. 2010) and the anti-inflammatory properties (Camargo et al. 2011) observed after the consumption of a Med diet in the same population in previous studies, the Med diet protects elderly people against postprandial oxidative stress and provides them with an alternative option for aging “more healthily,” which may also protect them against the development of metabolic syndrome.

Acknowledgments The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. We thank Maria Jose Gomez-Luna for technical support. This study was supported in part by research grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL2004-07907, AGL2006-01979, and AGL2009-12270 to J L-M; SAF07-62005 and PI10/02412 to F P-J; and FIS PI10/01041 to P P-M); Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Proyectos de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425 to J L-M; CTS5015 and AGR922 to F P-J); Consejería de Salud, Junta de Andalucía (06/128, 07/43, and PI0193/09 to J L-M; 06/129 to F P-J; 0118/08 to F F-J; PI-0252/09 to J D-L; and PI-0058/10 to P P-M); Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

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

References

- Abruzzo PM, Esposito F, Marchionni C, di Tullio S, Belia S, Fulle S, Veicsteinas A, Marini M (2013) Moderate exercise training induces ROS-related adaptations to skeletal muscles. *Int J Sports Med* 34(8):676–87
- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and

- Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 120(16):1640–1645
- Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A (2008) Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 46(6):785–790
- Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK (2001) Aging and proinflammatory cytokines. *Curr opin hematol* 8(3):131–136
- Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Gutierrez-Mariscal FM, Lora-Aguilar P, Rodriguez-Cantalejo F, Fuentes-Jimenez F, Tinahones FJ, Malagon MM, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J (2011) Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people. *Br J Nutr* 108(3):500–508
- Cardona F, Tunez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ (2008) Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 38(7):510–515
- de Koning EJ, Rabelink TJ (2002) Endothelial function in the post-prandial state. *Atheroscler Suppl* 3(1):11–16
- Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I (2008) High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism* 57(6):867–870
- Durackova Z (2009) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* 59(4):459–469
- Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM, Zimmet PZ (2010) The metabolic syndrome. *Lancet* 375(9710):181–183
- Faraci FM, Didion SP (2004) Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler thromb vasc biol* 24(8):1367–1373
- Finkel T (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr opin cell biol* 10(2):248–253
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408(6809):239–247. doi:10.1038/35041687
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH (2002) Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Jama* 287(3):356–359
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114(12):1752–1761
- Gabrielli LA, Castro PF, Godoy I, Mellado R, Bourge RC, Alcaino H, Chiong M, Greig D, Verdejo HE, Navarro M, Lopez R, Toro B, Quiroga C, Diaz-Araya G, Lavandero S, Garcia L (2011) Systemic oxidative stress and endothelial dysfunction is associated with an attenuated acute vascular response to inhaled prostanoid in pulmonary artery hypertension patients. *J Card Fail* 17(12):1012–1017
- Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF (2001) Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 37(2 Part 2):529–534
- Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J gerontol* 11(3):298–300
- Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Alvarez de Sotomayor M (2010) Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev* 9(2):142–152
- Hildrum B, Mykletun A, Hole T, Midthjell K, Dahl AA (2007) Age-specific prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program: the Norwegian HUNT 2 study. *BMC Publ Health* 7:220
- Human Nutrition Information Service (1987). *Agriculture Handbook No 8 Department of Agriculture Composition of Foods* Washington, DC: US Government Printing Office.
- Inoguchi T, Nawata H (2005) NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr drug targets* 6(4):495–501
- Jaiswal AK (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of anti-oxidant gene expression. *Free radic biol med* 36(10):1199–1207
- Jimenez-Gomez Y, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marin C, Perez-Martinez P, Ruano J, Paniagua JA, Rodriguez F, Egido J, Perez-Jimenez F (2009) Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 204(2):e70–e76
- Jimenez-Gomez Y, Marin C, Peerez-Martinez P, Hartwich J, Malczewska-Malec M, Golabek I, Kiec-Wilk B, Cruz-Teno C, Rodriguez F, Gomez P, Gomez-Luna MJ, Defoort C, Gibney MJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J (2010) 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* 140(9):1595–1601
- Jones DP (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods enzymol* 348:93–112
- Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid redox signal* 8(9–10):1865–1879
- Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP (2004) Aging and oxidative stress. *Mol asp med* 25(1–2):5–16
- Kobayashi M, Yamamoto M (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid redox signal* 7(3–4):385–394
- Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D (2007) Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr* 98(3):458–473
- Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, Garcia-Rios A, Rodriguez F, Gutierrez-Mariscal FM, Gomez P, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J (2011) Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am J Clin Nutr* 93(2):267–274
- Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, Garcia-Rios A, Rodriguez F, Gutierrez-Mariscal FM, Gomez P, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J (2010) Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am j clin nutr* 93(2):267–274
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin biochem* 32(8):595–603
- McEniery CM, Wilkinson IB, Avolio AP (2007) Age, hypertension and arterial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(7):665–671

- Nemoto S, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Finkel T (2000) Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol cell biol* 20(19):7311–7318
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404(6779):787–790
- Ochoa JJ, Quiles JL, Ibanez S, Martinez E, Lopez-Frias M, Huertas JR, Mataix J (2003) Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *J bioenerg biomembr* 35(3):267–275
- Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G (2006) Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J nutr* 136(12):3022–3026
- Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Marin C, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J (2010) Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci (Lond)* 119(6):251–261
- Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM (2006) Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr Opin Cardiol* 21(3):185–193
- Rahman I, Biswas SK, Jimenez LA, Torres M, Forman HJ (2005) Glutathione, stress responses, and redox signaling in lung inflammation. *Antioxid redox signal* 7(1–2):42–59
- Rebrin I, Sohal RS (2008) Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Adv drug deliv rev* 60(13–14):1545–1552
- Roberts CK, Vaziri ND, Barnard RJ (2002) Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. *Circulation* 106(20):2530–2532
- Roberts CK, Won D, Pruthi S, Kurtovic S, Sindhu RK, Vaziri ND, Barnard RJ (2006) 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* 100(5):1657–1665
- Scandalios JG (2002) Oxidative stress responses—what have genome-scale studies taught us? *Genome biology* 3(7):reviews1019.1–reviews1019.6
- Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK (2009) ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol Metab* 20(3):95–99
- Sohal RS, Orr WC (2012) The redox stress hypothesis of aging. *Free radical biology & medicine* 52(3):539–555
- Sohal RS, Toy PL, Farmer KJ (1987) Age-related changes in the redox status of the housefly, *Musca domestica*. *Arch gerontol geriatr* 6(2):95–100
- Sun X, Komatsu T, Lim J, Laslo M, Yolitz J, Wang C, Poirier L, Alberico T, Zou S (2012) Nutrient-dependent requirement for SOD1 in lifespan extension by protein restriction in *Drosophila melanogaster*. *Aging cell* 11(5):783–793
- Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti G, Bernini G, Magagna A, Salvetti A (2001) Age-related reduction of NO availability and oxidative stress in humans. *Hypertension* 38(2):274–279
- Ursini F, Sevanian A (2002) Postprandial oxidative stress. *Biol chem* 383(3–4):599–605
- Varela G (1980) *Tablas de Composición de Alimentos (Spanish) (Food Composition Tables)*. Instituto de Nutrición, CSIC, Madrid
- Wang CWC, Alberico T, Sun X, Seeberger J, Laslo M, Spangler E, Kern B, de Cabo R, Zou S (2013) The effect of resveratrol on lifespan depends on both gender and dietary nutrient composition in *Drosophila melanogaster*. *Age (Dordr)* 35(1):69–81
- Xu W, Hellerbrand C, Kohler UA, Bugnon P, Kan YW, Werner S, Beyer TA (2008) The Nrf2 transcription factor protects from toxin-induced liver injury and fibrosis. *Lab investig j tech methods pathol* 88(10):1068–1078
- Yubero-Serrano EM, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Tasset-Cuevas I, Santos-Gonzalez M, Caballero J, Garcia-Rios A, Marin C, Gutierrez-Mariscal FM, Fuentes F, Villalba JM, Tunez I, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J (2011) Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 in elderly men and women. *Age (Dordr)* 33(4):579–590

Elsevier Editorial System(tm) for Atherosclerosis
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Phenolic compounds from virgin olive oil modulate the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium

Article Type: Basic Research

Section/Category: Basic Research - Vascular Biology, Hemostasis, Oxidative Stress

Keywords: phenolic compounds; virgin olive oil; vascular endothelium; gene expression; HUVEC.

Corresponding Author: Dr. Antonio Camargo, PhD

Corresponding Author's Institution: IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain.

First Author: Eliana R Meza-Miranda, PhD student

Order of Authors: Eliana R Meza-Miranda, PhD student; Oriol A Rangel-Zuñiga, PhD; Carmen Marin, PhD; Pablo Perez-Martinez, PhD; Javier Delgado-Lista, PhD; Carmen Haro, PhD student; Patricia Peña-Orihuela, PhD; Ana I Jiménez-Morales, PhD; Maria M Malagon, PhD; Francisco J Tinahones, PhD; Jose Lopez.Miranda, PhD; Antonio Camargo, PhD; Francisco Perez-Jimenez, PhD

Suggested Reviewers: Francesco Visioli
Department of Pharmacological Sciences, University of Milan, Milan, Italy.
francesco.visioli@snv.jussieu.fr
He is an expert in the beneficial effect of the olive oil consumption.

Maria I Covas
Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group, Institut Municipal d'Investigació Mèdica. Barcelona, Spain.
mcovas@imim.es
She has a wide experience in the study of the beneficial effect of the consumption of olive oil.

Jean Davignon
Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Canada.
davignj@ircm.qc.ca
Researcher with a wide experience in the study of the atherosclerosis development.

Marschall S Runge
Department of Medicine, University of North Carolina, USA.
mrunge@med.unc.edu
Researcher with a wide experience in the study of the atherosclerosis development.

Opposed Reviewers:

Mediterranean diet consumption is associated to anti-atherogenic properties.

We used bioavailable phenolic compounds in human serum to study their effect on HUVEC.

Phenolic compounds decreased the expression of inflammatory genes in HUVEC.

Phenolic compounds improved the antioxidant expression profile in HUVEC.

The consumption of virgin olive oil may reduce the development of atherosclerosis.

1
2 **Phenolic compounds from virgin olive oil modulate the expression of**
3 **atherosclerosis-related genes in vascular endothelium**
4

5 Eliana R. Meza-Miranda^{a,b}, Oriol A. Rangel-Zúñiga^{a,b}, Carmen Marín^{a,b}, Pablo Pérez-
6 Martínez^{a,b}, Javier Delgado-Lista^{a,b}, Carmen Haro Mariscal^{a,b}, Patricia Peña-Orihuela^{a,b},
7 Ana I. Jiménez-Morales^{a,b}, María M. Malangón^{b,c}, Francisco J. Tinahones^{b,d}, José
8 López-Miranda^{a,b}, Antonio Camargo^{a,b,*}, Francisco Pérez-Jiménez^{a,b,*}.
9
10
11
12
13

14 ^aLipids and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of
15 Cordoba, Cordoba, Spain.
16

17 ^bCIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud
18 Carlos III, Spain.
19

20 ^cDepartment of Cell Biology, Physiology, and Immunology, IMIBIC/Reina Sofia
21 University Hospital/University of Cordoba, Cordoba, Spain.
22
23

24 ^dEndocrinology and Nutrition Service, Hospital Virgen de la Victoria, Malaga, Spain.
25
26

27
28
29 *These authors equally contributed to this work.
30
31

32 Corresponding author: Antonio Camargo PhD, Lipids and Atherosclerosis Unit,
33 IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba. Av. Menendez Pidal,
34 s/n. 14004 Cordoba, Spain. Tel.: +34 957 012882; fax: +34 957 204763.
35
36

37 E-mail address: b92cagaa@uco.es
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

Objective Previous studies have shown the anti-inflammatory and antioxidant properties of phenolic compounds of virgin olive oil (VOO). However, the effect of bioavailable phenolic compounds on the vascular endothelium is unknown. We aimed to evaluate the effect of phenolic compounds of virgin olive oil, bioavailable in human serum, on the vascular endothelium. **Methods** We treated HUVEC with human serum obtained in fasting state and after the intake of a breakfast prepared with VOO with a high or low content of phenolic compounds. **Results** Treatment of HUVEC with serum obtained 2 hours after the intake of the high-phenol VOO-based breakfast decreased *p65* and *MCP-1* gene expression ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively) and increased *MT-CYB*, *SDHA* and *SOD1* gene expression ($p = 0.004$, $p = 0.012$ and $p = 0.001$ respectively), as compared with the treatment of HUVEC with the serum obtained 2 hours after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast. The treatment with serum obtained 4 hours after the intake of the high-phenol VOO-based breakfast decreased *MCP-1* and *CAT* gene expression ($p < 0.001$ and $p = 0.003$ respectively) and increased *MT-CYB* gene expression ($p < 0.001$), as compared to the treatment with serum obtained 4 hours after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast. **Conclusion** Our results suggest that the consumption of virgin olive oil rich in phenolic compounds may reduce the risk of atherosclerosis development by decreasing inflammation and improving the antioxidant profile in the vascular endothelium.

Keywords: phenolic compounds, virgin olive oil, vascular endothelium, gene expression, HUVEC.

INTRODUCTION

1 Metabolic Syndrome (MetS) is a disorder associated with a high risk of
2 cardiovascular diseases (CVD), and characterized by hypertriglyceridemia, low HDL
3 cholesterol levels, insulin resistance, abdominal obesity and hypertension [1, 2].
4

5 Atherosclerosis, the pathogenic substrate for CVD in patients with MetS, is an
6 inflammatory disease closely related to endothelial dysfunction (ED) [2], which is one
7 of the first steps in the development of arteriosclerosis [3], and is associated with and
8 predicts CVD [4]. The early stages of atherosclerosis development are characterized by
9 the transport of LDL particles across the endothelium wall, which triggers several
10 endothelium responses, such as the expression of adhesion molecules and the release
11 of cytokines, which leads to the tethering, activation and attachment of lymphocytes and
12 macrophages. These phagocytize LDL particles, which causes the generation of reactive
13 oxygen species (ROS), and then they become foam cells and form the fatty streak and
14 further the atherosclerotic plaque [5, 6].
15

16 Oxidative stress is known to be key factor in the pathogenesis of CVD [7, 8], as
17 it has been shown that it plays a role in the process of ED [9]. Additionally, it is
18 acknowledged that high concentrations of serum inflammatory markers are associated
19 with CVD [10], which is particularly important in a number of pathological conditions
20 such as obesity and MetS, which are characterized by a low-grade inflammation that
21 favors the development of atherosclerosis [11].
22

23 However, the processes involved in the development of atherosclerosis are
24 sensitive to modulation by diet, which therefore influences the development of CVD. In
25 fact, the low rate of cardiovascular mortality in Mediterranean countries could be
26 explained on the basis of the anti-atherogenic effects associated with Mediterranean
27 Diet (Med Diet) consumption [12, 13]. In particular, virgin olive oil (VOO), the major
28 fatty component of the Med diet, and whose beneficial effects are attributed to its minor
29 components, such as phenolic compounds, is considered the key component of the Med
30 Diet and its healthy benefits [14-16].
31

32 In fact, our group has previously shown that the consumption of VOO with a
33 high content of phenolic compounds improves ED and reduces oxidative stress plasma
34 parameters [17-19]. Moreover, it has also been described how phenolic compounds
35 have a positive effect on the inflammatory response through a lower activation of
36 nuclear transcription factor *NF- κ B* in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) [20],
37 which repress the expression of genes involved in inflammation and modulates
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 positively the expression changes of cancer-related genes, DNA damage, oxidative
2 stress, apoptosis and lipid metabolism [21-23].

3
4 In addition, *in vitro* studies have shown that olive oil phenolic compounds
5 repress the gene expression of pro-atherogenic adhesion molecules via inactivation of
6 *NF- κ B* in endothelial cells [24-26], and that they show a powerful scavenging ROS
7 activity in the presence of high oxidative stress, prevent oxidative damage to DNA and
8 enhance antioxidant activity in endothelial cells and PBMC [27-29].

9
10
11
12 However, the main limitations of most of the studies *in vitro* lie in the fact that
13 they were performed by using non-bioavailable phenolic compounds, while most of the
14 phenolic compounds are modified after the intake of olive oil, and their derived
15 metabolites are found in plasma [30, 31]. Therefore, the objective of this study was to
16 fill this gap by evaluating the effect of the phenolic compounds present in human serum
17 (bioavailable) on the vascular endothelium in the postprandial state.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc) were cultivated until confluence was reached (within 3-4 days) in EMB medium supplemented with an EMB-bullet kit (Lonza Walkersville, Inc) containing 10% FBS, hEGF, hydrocortisone, GA-1000, VEGF, hFGF- β , R³-IGF-1 and heparin, in a humidified atmosphere (37°C, 5% CO₂). The culture medium was changed every 2 days. The cells were detached using trypsin-EDTA (Lonza Walkersville, Inc).

Once the HUVEC reached confluence, the medium was replaced by one supplemented with 10% of human serum pool (5.4 ml of EBM media not supplemented and 0.6 ml of serum pool for each time-point and oil). The cell treatment with human serum was performed for 24 hours under the same environmental conditions mentioned above. The treatment was repeated three times and the results are presented as a mean result. Cell viability was checked every time through 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) assay.

Serum sample collection

Serum from a population of twenty patients with MetS was used [22]. These patients received two virgin olive oil-based (VOO) breakfasts with high (398 ppm) and low (70 ppm) content of phenolic compounds following a double-blinded random crossover design. Venous blood samples were obtained at 0, 2 and 4 hours after consumption of each breakfast. Samples from fasting and postprandial states were collected in tubes containing 1 g EDTA/L and stored in containers with iced water and kept 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 1500 \times g for 15 min at 4°C within one hour after extraction. Plasma samples were pooled according to the time and breakfast: fasting and at 2 and 4 hours after the intake of the breakfast prepared with VOO with a high content of phenolic compounds, and fasting and at 2 and 4 hours after the intake of the breakfast prepared with VOO with a low content of phenolic compounds.

RNA isolation

Total RNA was extracted from the endothelial cells with TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) and purified with RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Recovered RNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (Nanodrop Technology®, Cambridge, UK).

qRT-PCR for gene expression analysis

Retrotranscription reaction was performed with 1 µg of total RNA using the commercial kit iScript® cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), following the manufacturers' instructions. Real-time PCR reactions were carried out using the OpenArray™ NT Cyclor system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturers' instructions. The gene expression analysis was performed in samples from the participants by duplicate at basal time, 2 and 4 hours after intake of the breakfasts. Primer pairs were selected from the database TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) <https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=601267>, for the following genes: inflammatory genes: *IKKa* (*Hs00175141_m1*), *IKKb* (*Hs00233287_m1*), *p65* (*Hs00153294_m1*), *IkBa* (*Hs00153283_m1*), *MCP-1* (*Hs00234140_m1*), *IL-6* (*Hs00174131_m1*) and *CXCL1* (*Hs00236937_m1*), pro-oxidant enzymes and respiratory chain genes: *p22^{phox}* (*Hs03044361_m1*), *gp91^{phox}* (*Hs00166163_m1*), *COX4I1* (*Hs00971639_m1*), *MT-CYB* (*Hs02596867_s1*), *NADH* (*Hs00942568_m1*) and *SDHA* (*Hs00188166_m1*), and antioxidant enzymes: *SOD1* (*Hs00916176_m1*), *SOD2* (*Hs00167309_m1*), *CAT* (*Hs00156308_m1*), *Gpx1* (*Hs00829989_g1*), *Gpx4* (*Hs00989766_g1*) and *TXNRD1* (*Hs00917067_m1*). The relative expression for each analyzed gene was calculated using *GAPDH* as a housekeeping gen. The data set was analyzed using OpenArray® Real-Time qPCR Analysis Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Statistical analysis

All the data presented are expressed as mean values \pm S.E.M. PASW Statistics, Version 18 (Chicago, IL, USA) was used for the statistical analysis. The data were analyzed using One-way ANOVA analysis of variance. Post hoc statistical analysis was completed by using Bonferroni's multiple comparison tests. A probability of less than 0.05 was considered significant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

RESULTS

Effect of phenolic compounds on the expression of inflammatory genes

The treatment of HUVEC with serum obtained at 2 hours after the intake of high-phenol VOO-based breakfast decreased the *IKKa*, and *p65* and gene expression ($p < 0.001$ in both cases) and tended to reduce *MCP-1* gene expression, although it did not reach statistical significance, as compared to the cells treated with fasting serum. However, when the cells were treated with serum obtained at 2 hours after the intake of low-phenol VOO-based breakfast, we observed a decrease in the expression of *IKKa* and *IKKb* genes ($p < 0.001$ in both cases) as compared to the cells treated with fasting serum .

Moreover, when we treated the HUVEC with serum obtained at 4 hours after the consumption of the high-phenol VOO-based breakfast, we observed an increase in the *IkB α* and *MCP-1* gene expression ($p = 0.002$ and $p = 0.024$ respectively) and a decreased *IKKa* gene expression ($p = 0.006$) as compared to the cells treated with fasting serum. No statistical significant gene expression changes were observed when we treated the HUVEC with serum obtained at 4 hours after the consumption of the high-phenol VOO-based breakfast as compared to the cells treated with fasting serum (**Figure 1**).

Effect of phenolic compounds on the expression of pro-oxidant enzymes and respiratory chain genes

The treatment of HUVEC with serum obtained at 2 hours after the intake of the breakfasts decreased the *p22^{phox}* and *gp91^{phox}* gene expression as compared to the cells treated with fasting serum, irrespective of the phenolic compound content of the oil used to prepare the breakfast ($p < 0.001$ and $p = 0.004$, respectively for the serum obtained after the intake of the high-phenol VOO-based breakfast; $p < 0.001$ and $p = 0.018$, respectively for the serum obtained after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast, respectively). In addition, the treatment of HUVEC with serum obtained at 4 hours after the consumption of the breakfasts also decreased the *p22^{phox}* gene expression as compared to the cells treated with serum obtained in fasting state, irrespective of the phenolic compound content of the oil used to prepare the breakfast ($p = 0.005$ and $p = 0.004$, respectively), decreased the *p91^{phox}* gene expression when the cells were treated with the serum obtained after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast ($p = 0.033$) and it tended to decrease when the cell were treated with the serum obtained

1 after the intake of high-phenol VOO-based breakfast, although it did not reach statistical
2 significance.

3
4 Moreover, we observed an increase in the *MT-CYB* gene expression when
5 HUVEC were treated with serum obtained at 2 hours ($p=0.002$) and at 4 hours
6 ($p<0.001$) after the intake of the high-phenol VOO-based breakfast, as compared to the
7 treatment of the HUVEC with serum obtained in the fasting state. The expression of this
8 gene remained unchanged when cells were treated with serum obtained after the intake
9 of the low-phenol VOO-based breakfast as compared to the treatment of the HUVEC
10 with serum obtained in the fasting state.
11

12
13 We also observed that the expression of the *SDHA* gene increased when the
14 HUVEC were treated with serum obtained at 2 hours after the intake of the high-phenol
15 VOO-based breakfast, as compared to the treatment of the HUVEC with serum obtained
16 in fasting state ($p=0.030$), whereas it decreased when the HUVEC were treated with
17 serum obtained at 2 hours after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast, as
18 compared to the treatment of the HUVEC with serum obtained in the fasting state
19 ($p=0.006$). No statistically significant gene expression changes were observed when we
20 treated the HUVEC with serum obtained 4 hours after the intake of the breakfast
21 (**Figure 2**).
22

23 **Effect of phenolic compounds on the expression of antioxidant enzyme genes**

24
25 The treatment of HUVEC with serum obtained at 2 hours after the consumption
26 of the high-phenol VOO-based breakfast increased the *SOD1* gene expression ($p=0.009$)
27 and decreased the *SOD2* and *CAT* gene expression, as compared to the cells treated with
28 fasting serum ($p=0.005$ and $p=0.006$, respectively). Otherwise, the treatment of
29 HUVEC with serum obtained at 2 hours after the consumption of the low-phenol VOO-
30 based breakfast decreased the *SOD1*, *Gpx4* and *TXNRD1* gene expression compared to
31 the cells treated with fasting serum ($p<0.001$, $p=0.005$ and $p<0.001$, respectively).
32

33
34 Moreover, the treatment of HUVEC with serum obtained at 4 hours after the
35 consumption of the high-phenol VOO-based breakfast, decreased the *CAT* and *Gpx4*
36 gene expression as compared to the cells treated with fasting serum ($p=0.011$ and
37 $p=0.016$ respectively). No statistically significant gene expression changes were
38 observed after the treatment with serum obtained at 4 hours after the consumption of the
39 low-phenol VOO-based breakfast (**Figure 3**).
40

41 **Effect of content of phenolic compounds in VOO on the postprandial state**

42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 We have also compared the differences between the gene expression after the
2 treatment of HUVEC with the serum obtained after the intake of the breakfast prepared
3 with VOO with a high and low content of phenolic compounds (**Table 1**).
4

5 We found that the treatment of HUVEC with the serum obtained at 2 hours after
6 the intake of the high-phenol VOO-based breakfast, decreased the expression of *p65*
7 and *MCP-1* ($p < 0.001$ and $p = 0.002$ respectively), and increased the expression of *MT-*
8 *CYB*, *SDHA* and *SOD1* ($p = 0.004$, $p = 0.012$ and $p = 0.001$ respectively) as compared to
9 the treatment of the HUVEC with the serum obtained 2 hours after the intake of the
10 high-phenol VOO-based breakfast.
11
12
13
14
15

16 Additionally, we also observed that treatment of HUVEC with the serum
17 obtained 4 hours after the intake of the high-phenol VOO-based breakfast, decreased the
18 expression of *MCP-1* and *CAT* ($p < 0.001$ and $p = 0.003$ respectively), and increased the
19 expression of *MT-CYB* ($p < 0.001$) as compared to the treatment of HUVEC with the
20 serum obtained 4 hours after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

DISCUSSION

1
2 Our study evaluated the effect of the bioavailable phenolic compounds present in
3 human serum after the consumption of two breakfasts prepared with VOO with high
4 and low phenolic compounds in an *in vitro* model of vascular endothelium. In fact, once
5 in the organism, the phenolic compounds are modified or conjugated to molecules such
6 as sulfate or glucuronide acid, and the concentration of these bioavailable phenolic
7 compounds in plasma is proportional to their concentration in the VOO ingested [30].
8 We observed that the treatment of HUVEC with serum obtained after the intake of a
9 high-phenol VOO-based breakfast decreased the expression of inflammatory and
10 oxidative stress-related genes, as compared to the cell treated with serum obtained after
11 the intake of a low-phenol VOO-based breakfast.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 ED is one of the first steps in the development of arteriosclerosis [3]. In fact, ED
21 is an early predictor of atherosclerosis, which is associated with pathophysiological
22 alterations such as inflammation and oxidative stress, processes which are closely
23 interrelated [32, 33]. ED is characterized by an increased expression of adhesion
24 molecules in response to pro-inflammatory cytokines [34] with the consequent decrease
25 of the availability of nitric oxide (NO) in blood vessels and an excessive increase
26 production of ROS that exceeds the capacity of the antioxidant defences of the
27 endothelium [35, 36].
28
29
30
31
32
33

34 Atherosclerosis, the pathogenic substrate responsible for CVD in patients with
35 MetS, is an inflammatory disease and chronic inflammation is one of the major
36 pathophysiological characteristics of these patients, which makes them very susceptible
37 to developing atherosclerotic plaques [37]. In our study, we found that the treatment of
38 HUVEC with the serum obtained 2 hours after the intake of the high-phenol VOO-
39 based breakfast reduced the expression of the *p65* gene, a subunit of the *NF-κB*
40 transcription factor which is involved, among others, in the pathogenesis of
41 atherosclerosis and whose activation leads to the expression of inflammatory genes
42 [38]. The treatment of HUVEC with the serum obtained 2 hours after the intake of this
43 breakfast also tended to reduce the expression of *MCP-1*, a pro-inflammatory cytokine
44 that plays a critical role in atherosclerotic plaque formation by initiating fatty streak
45 formation [39, 40]. Additionally, we observed an increase in the expression of *MCP-1*
46 when cells were treated with serum obtained 4 hours after the intake of the low-phenol
47 VOO-based breakfast. Moreover, the treatment with this serum also increased the
48 expression of *IκBα* gene, a member of *IκB* family (inhibitors of κB), which is involved
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 in the *NF-κB* inactivation by sequestering in the cytoplasm and induced as negative
2 feedback when the inflammatory response is activated [41]. These results agree with a
3 previous *in vivo* study in which we demonstrated the postprandial repression of several
4 pro-inflammatory genes in PBMC after the intake of a high-phenol VOO-based
5 breakfast, as compared to the intake of a breakfast prepared with the same olive oil but
6 with a low content in phenolic compounds [22]. Additionally, other studies have
7 demonstrated that a Med diet based on VOO with a high content of phenolic
8 compounds also decreases the postprandial expression of the *NF-κB p65* subunit and
9 *MCP-1* genes in PBMC [42]. Interestingly, we observed that the expression of both
10 subunits *IKKa* and *IKKb* of the IκB kinase complex were reduced when cell were
11 treated with serum obtained 2 hours after the intake of the low-phenol VOO-based
12 breakfast, and also *IKKb* when the serum was obtained 4 hours after the intake of this
13 breakfast. These observations suggest that a reduction in the expression of the kinase
14 involved in inflammatory response occurs when this kinase is activated as a negative
15 feedback regulatory loop [41, 43].
16
17

18 Our results also suggest a reduction of oxidative stress in HUVEC after their
19 treatment with the serum obtained after the intake of the high-phenol VOO-based
20 breakfast. In response to oxidative stress, cells attempt to increase their antioxidant
21 defenses. Among them, the antioxidant enzymes *SOD*, *CAT*, and *Gpx* are considered to
22 be the first line of defense during oxidative stress [44]. *SOD* converts $\cdot\text{O}_2^-$ into H_2O_2 ,
23 which is further detoxified into water or molecular oxygen by either *CAT* or *Gpx* [45].
24 Our results showed that the treatment of HUVEC with serum obtained 2 hours after the
25 intake of the high-phenol VOO-based breakfast decreased the expression of the
26 mitochondrial isoform of *SOD*, the *SOD2* gene and the *CAT* gene, both involved in the
27 detoxification of ROS from O_2^- up to water [45], suggesting a lower oxidative stress
28 under this condition. By contrast, the expression of *GPx1*, the main enzyme involved in
29 turning H_2O_2 into molecular oxygen was not modulated by any treatment. Moreover,
30 the expression of the *SOD1* gene, the cytoplasmatic isoform of *SOD*, increased after the
31 treatment with serum obtained 2 hours after the intake of the high-phenol VOO-based
32 breakfast, whereas it decreased when the cells were treated with serum obtained 2 hours
33 after the intake of the low-phenol VOO-based breakfast. These have been shown to
34 protect the vasculature against dysfunction, besides decreasing the superoxide levels
35 that can be produced by the mitochondria itself in accordance with the basis of
36 mitochondrial origin of most of the reactive oxygen [45].
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 This notion is also supported by an increase in the expression of *MT-CYB* and
2 *SDHA* genes, both involved in the mitochondrial electron transport chain, when cells
3 were treated with serum obtained 2 hours after the intake of the high-phenol VOO-
4 based breakfast, since their up-regulation prevents the production of pro-oxidant
5 intermediates by a higher consumption of $\cdot\text{O}_2^-$ [46], while the expression of other
6 sources of ROS such as NADPH-oxidase complex (*p22^{phox}* and *gp91^{phox}*) [47], seem to
7 not be affected by the content of phenolic compounds in the VOO.
8

9 Comparing the treatments, we found that the treatment of HUVEC with serum
10 obtained after the intake of the high-phenol VOO-based breakfast decreased
11 significantly the gene expression of *p65* and *MCP-1*, increased the gene expression of
12 *MT-CYB*, *SDHA* and *SOD1* at 2 hours and at 4 hours, and decreased the *MCP-1* and
13 *CAT* gene expression while the gene expression of *MT-CYB* remained high. These
14 results are consistent with those found in other studies, where it has shown that a high
15 concentration of phenolic compounds have postprandial anti-inflammatory effects [48]
16 and reduces the gene expression of genes related to inflammation and oxidative stress
17 [21, 23].
18

19 Taken together, these data suggest that the consumption of a high-phenol VOO-
20 based breakfast can modulate positively the pathophysiological mechanisms that
21 underlie the early atherosclerosis in the vascular endothelium, such as the expression of
22 inflammatory genes [49, 50] and also oxidative stress, which elicits an inflammatory
23 response.
24

25 In conclusion, our results suggest that the consumption of virgin olive oil rich in
26 phenolic compounds may reduce the risk of developing atherosclerosis in metabolic
27 syndrome patients by decreasing inflammation and improving the antioxidant profile in
28 the vascular endothelium. These results provide further evidence of the reduction of the
29 risk factors for developing cardiovascular disease observed in Mediterranean regions,
30 where the main source of dietary fat is virgin olive oil.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acknowledgments

1 The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. This
2 study supported in part by research grants from the Spanish Ministry of Science and
3 Innovation (AGL 2006-01979, and AGL 2009-12270 to J. L.-M., SAF07-62005 to F.
4 P.-J., PI10/02412 to F. P.-J.); Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Proyectos
5 de Investigación de Excelencia, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425 to J. L.-M.,
6 CTS5015 and AGR922 to F. P.-J.); Consejería de Salud, Junta de Andalucía (06/128,
7 07/43, and PI0193/09 to J. L.-M, 06/129 to F. P.-J., 06/127 to C. M.-H., PI-0252/09 to J.
8 D.-L., and PI-0058/10 to P. P.-M.); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).
9 We would also like to thank Canoliva (Antonio Cano e Hijos SA, Luque, Córdoba),
10 who generously donated the olive oil.
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

Conflict of interest

22 None of the authors has any conflict of interests that could affect the performance of
23 this work or the interpretation of the data.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

1. Alberti, K.G., 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**(16): p. 1640-5.
2. Grundy, S.M., 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**(2): p. e13-8.
3. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. *Circulation*, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
4. Robert H Eckel KA, S.M.G., Paul Z Zimmet., *The metabolic syndrome*. *The Lancet*, 2010. **375**: p. 181-183.
5. Madamanchi, N.R., A. Vendrov, and M.S. Runge, *Oxidative stress and vascular disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(1): p. 29-38.
6. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(11): p. 762-74.
7. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
8. Nabel, E.G., *Cardiovascular disease*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(1): p. 60-72.
9. Heitzer, T., et al., *Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease*. *Circulation*, 2001. **104**(22): p. 2673-8.
10. Packard, R.R. and P. Libby, *Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction*. *Clin Chem*, 2008. **54**(1): p. 24-38.
11. Subramanian, S. and A. Chait, *The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis*. *Curr Opin Lipidol*, 2009. **20**(1): p. 39-44.
12. Mena, M.P., et al., *Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet*. *Am J Clin Nutr*, 2009. **89**(1): p. 248-56.
13. Covas, M.I., *Olive oil and the cardiovascular system*. *Pharmacol Res*, 2007. **55**(3): p. 175-86.
14. Willett, W.C., *The Mediterranean diet: science and practice*. *Public Health Nutr*, 2006. **9**(1A): p. 105-10.
15. Vissers, M.N., P.L. Zock, and M.B. Katan, *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review*. *Eur J Clin Nutr*, 2004. **58**(6): p. 955-65.
16. Frankel, E.N., *Nutritional and biological properties of extra virgin olive oil*. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(3): p. 785-92.
17. Ruano, J., et al., *Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. **46**(10): p. 1864-8.
18. Covas, M.I., et al., *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial*. *Ann Intern Med*, 2006. **145**(5): p. 333-41.
19. Covas, M.I., et al., *Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(4): p. 608-16.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
20. Perez-Martinez, P., et al., *The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men*. *Atherosclerosis*, 2007. **194**(2): p. e141-6.
21. Bogani, P., et al., *Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil*. *Atherosclerosis*, 2007. **190**(1): p. 181-6.
22. Camargo, A., 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**: p. 253.
23. Konstantinidou, V., et al., *In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial*. *Faseb J*, 2010. **24**(7): p. 2546-57.
24. Carluccio, M.A., et al., *Homocysteine induces VCAM-1 gene expression through NF-kappaB and NAD(P)H oxidase activation: protective role of Mediterranean diet polyphenolic antioxidants*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007. **293**(4): p. H2344-54.
25. Dell'Agli, M., et al., *Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation*. *J Agric Food Chem*, 2006. **54**(9): p. 3259-64.
26. Zern, T.L. and M.L. Fernandez, *Cardioprotective effects of dietary polyphenols*. *J Nutr*, 2005. **135**(10): p. 2291-4.
27. Zambonin, L., et al., *Dietary phenolic acids act as effective antioxidants in membrane models and in cultured cells, exhibiting proapoptotic effects in leukaemia cells*. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. **2012**: p. 839298.
28. Lee, S.J., et al., *Evidence for the association of peroxidases with the antioxidant effect of p-coumaric acid in endothelial cells exposed to high glucose plus arachidonic acid*. *BMB Rep*, 2009. **42**(9): p. 561-7.
29. Moreno, J.J., *Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW 264.7*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **35**(9): p. 1073-81.
30. Fito, M., et al., *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review*. *Ann Ist Super Sanita*, 2007. **43**(4): p. 375-81.
31. Suarez, M., et al., *Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil*. *Br J Nutr*, 2011. **106**(11): p. 1691-701.
32. Basha, B., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: possible involvement of endoplasmic reticulum stress?* *Exp Diabetes Res*, 2012. **2012**: p. 481840.
33. Popov, D., *Endoplasmic reticulum stress and the on site function of resident PTP1B*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012.
34. Stenvinkel, P., *Endothelial dysfunction and inflammation-is there a link?* *Nephrol Dial Transplant*, 2001. **16**(10): p. 1968-71.
35. Montero, D., et al., *Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention*. *Obes Rev*, 2012. **13**(5): p. 441-55.
36. Wadsworth, R.M., *Oxidative stress and the endothelium*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(1): p. 155-7.
37. Gotoh, T., M. Endo, and Y. Oike, *Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases*. *Int J Inflam*, 2011. **2011**: p. 259462.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
38. Kutuk, O. and H. Basaga, *Inflammation meets oxidation: NF-kappaB as a mediator of initial lesion development in atherosclerosis*. Trends Mol Med, 2003. **9**(12): p. 549-57.
 39. Lee Y, A.V., Sykes A, Lindstrom T, Slater D, Bennett P., *The effects of labour and or interleukin 1 beta upon the expression of nuclear factor kappa B related proteins in human amnion*. Mol Hum Reprod., 2003. **9**(4): p. 213-8.
 40. Niu, J. and P.E. Kolattukudy, *Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications*. Clin Sci (Lond), 2009. **117**(3): p. 95-109.
 41. O'Neill, L.A., *Counter-regulation in the IKK family*. Biochem J, 2011. **434**(1): p. e1-2.
 42. Camargo A, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Cruz-Teno C, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Gutierrez-Mariscal FM, Lora-Aguilar P, Rodriguez-Cantalejo F, Fuentes-Jimenez F, Tinahones FJ, Malagon MM, Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J., *Expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by the Mediterranean diet in elderly people*. Br J Nutr, 2011. **108**(3): p. 500-8.
 43. Lobry, C., et al., *Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 908-13.
 44. Ray, G. and S.A. Husain, *Oxidants, antioxidants and carcinogenesis*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(11): p. 1213-32.
 45. Faraci, F.M. and S.P. Didion, *Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1367-73.
 46. Bourens, M., et al., *Redox and Reactive Oxygen Species Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis*. Antioxid Redox Signal, 2012.
 47. Inoguchi, T. and H. Nawata, *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**(4): p. 495-501.
 48. Pacheco, Y.M., et al., *Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects*. Br J Nutr, 2007. **98**(2): p. 260-3.
 49. Gargalovic, P.S., et al., *The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(11): p. 2490-6.
 50. Li, Y., et al., *Free cholesterol-loaded macrophages are an abundant source of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6: model of NF-kappaB- and map kinase-dependent inflammation in advanced atherosclerosis*. J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 21763-72.

FIGURE LEGENDS

1
2 **Figure 1 Expression of inflammatory genes in HUVEC.** Values are mean \pm SEM.
3 mRNA levels are expressed as Fold Change (FC) between the gene expression of
4 HUVEC after treatment with the serum obtained from patients at 2 or 4 hours after
5 intake of breakfasts as compared to the gene expression of HUVEC after the treatment
6 with serum obtained in the fasting state. One-way ANOVA statistical analysis. ¥
7 $p < 0.005$ 2 hours versus fasting state. ¶ $p < 0.005$ 4 hours versus fasting state.
8
9
10
11
12

13
14 **Figure 2 Expression of pro-oxidant enzymes and mitochondrial respiratory chain**
15 **components genes in HUVEC.** Values are mean \pm SEM. mRNA levels are expressed
16 as Fold Change (FC) between the gene expression of HUVECs after treatment with the
17 serum obtained from patients at 2 or 4 hours after intake of breakfasts as compared to
18 the gene expression of HUVECs after the treatment with serum obtained in the fasting
19 state.. One-way ANOVA statistical analysis. ¥ $p < 0.005$ 2 hours versus fasting state. ¶
20 $p < 0.005$ 4 hours versus fasting state.
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Figure 3 Expression of antioxidant enzyme genes in HUVEC.** Values are mean \pm
30 SEM. mRNA levels are expressed as Fold Change (FC) between the gene expression of
31 HUVEC after treatment with the serum obtained from patients at 2 or 4 hours after
32 intake of breakfasts as compared to the gene expression of HUVEC after the treatment
33 with serum obtained in the fasting state. One-way ANOVA statistical analysis. ¥
34 $p < 0.005$ 2 hours versus fasting state. ¶ $p < 0.005$ 4 hours versus fasting state.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



Dear Editor-in-chief:

We would like to submit the manuscript entitled "Phenolic compounds from virgin olive oil modulate the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium" for your consideration for potential publication in *Atherosclerosis*. This manuscript or any of its parts has not been published before, except in abstract form, and is not being considered for publication elsewhere, in whole or in part, in any language.

Thank you for your attention and consideration of our manuscript.

Sincerely,

Antonio Camargo Garcia, PhD
Lipid and Atherosclerosis Research Unit
Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba/IMIBIC
Cordoba, Spain.



Dear Editor-in-chief:

We would like to submit the manuscript entitled "Phenolic compounds from virgin olive oil modulate the expression of atherosclerosis-related genes in vascular endothelium" for your consideration for potential publication in *Atherosclerosis*. This manuscript or any of its parts has not been published before, except in abstract form, and is not being considered for publication elsewhere, in whole or in part, in any language.

In the era of rapid development of obesity and the metabolic syndrome is highly relevant the design of strategies for atherosclerosis prevention, the pathogenic substrate for cardiovascular disease in these patients. We evaluated the effect of the bioavailable phenolic compounds present in human serum after the consumption of two breakfasts prepared with VOO with high and low phenolic compounds in an *in vitro* model of vascular endothelium, analysing the expression of the genes involved in atherosclerosis development and endothelial function.

All authors have contributed substantially to the work. All authors have read and approved the submitted version and they agreed to submit the manuscript to the *Atherosclerosis*. The experimental protocol was approved by the local ethic committee according to the Helsinki Declaration. None of the authors has declared any potential conflict of interest in relation with this work.

We would like to suggest as potential referees for this work two researchers with a wide experience in the study of the beneficial effect of the consumption of olive oil:

- Francesco Visioli, Department of Pharmacological Sciences, University of Milan, Milan, Italy. email address: francesco.visioli@snv.jussieu.fr
- Maria Isabel Covas, Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group, Institut Municipal d'Investigació Mèdica. Barcelona, Spain. email address: mcovas@imim.es

And others two researchers with a wide experience in the study of the atherosclerosis development:

- Jean Davignon, Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Canada. email address: davignj@ircm.qc.ca
- Marschall S. Runge, Department of Medicine, University of North Carolina, USA. email address: mrunge@med.unc.edu

Thank you for your attention and consideration of our manuscript.

Sincerely,



Antonio Camargo Garcia, PhD
Lipid and Atherosclerosis Research Unit
Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba/IMIBIC. Córdoba, Spain.

Figure 1

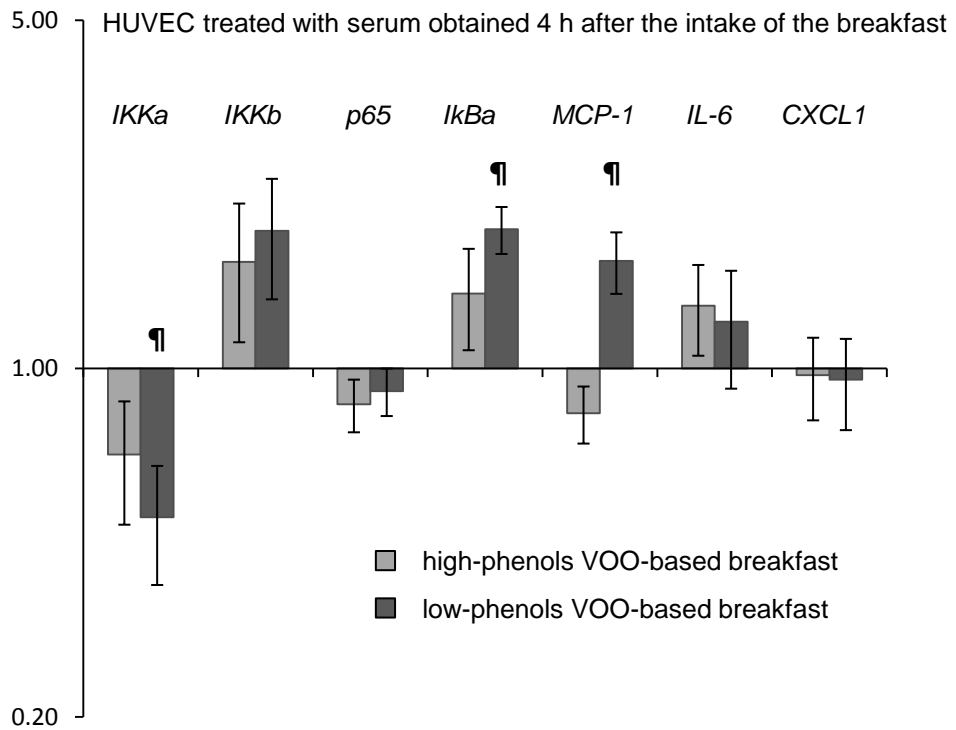
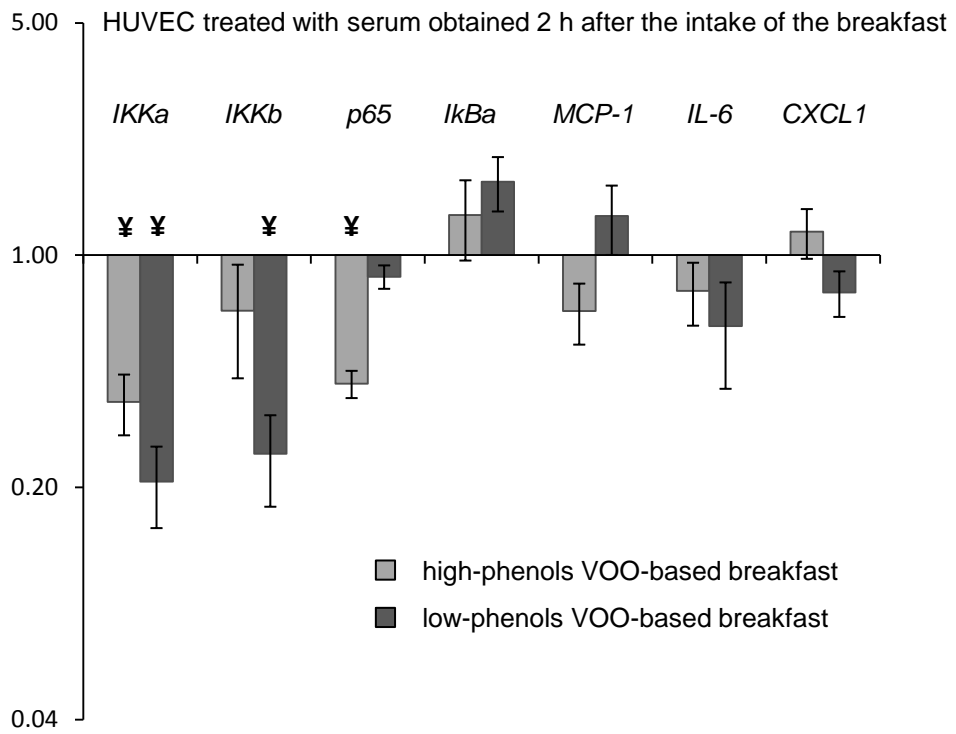


Figure 1. Expression of inflammatory genes in HUVEC.

Figure 2

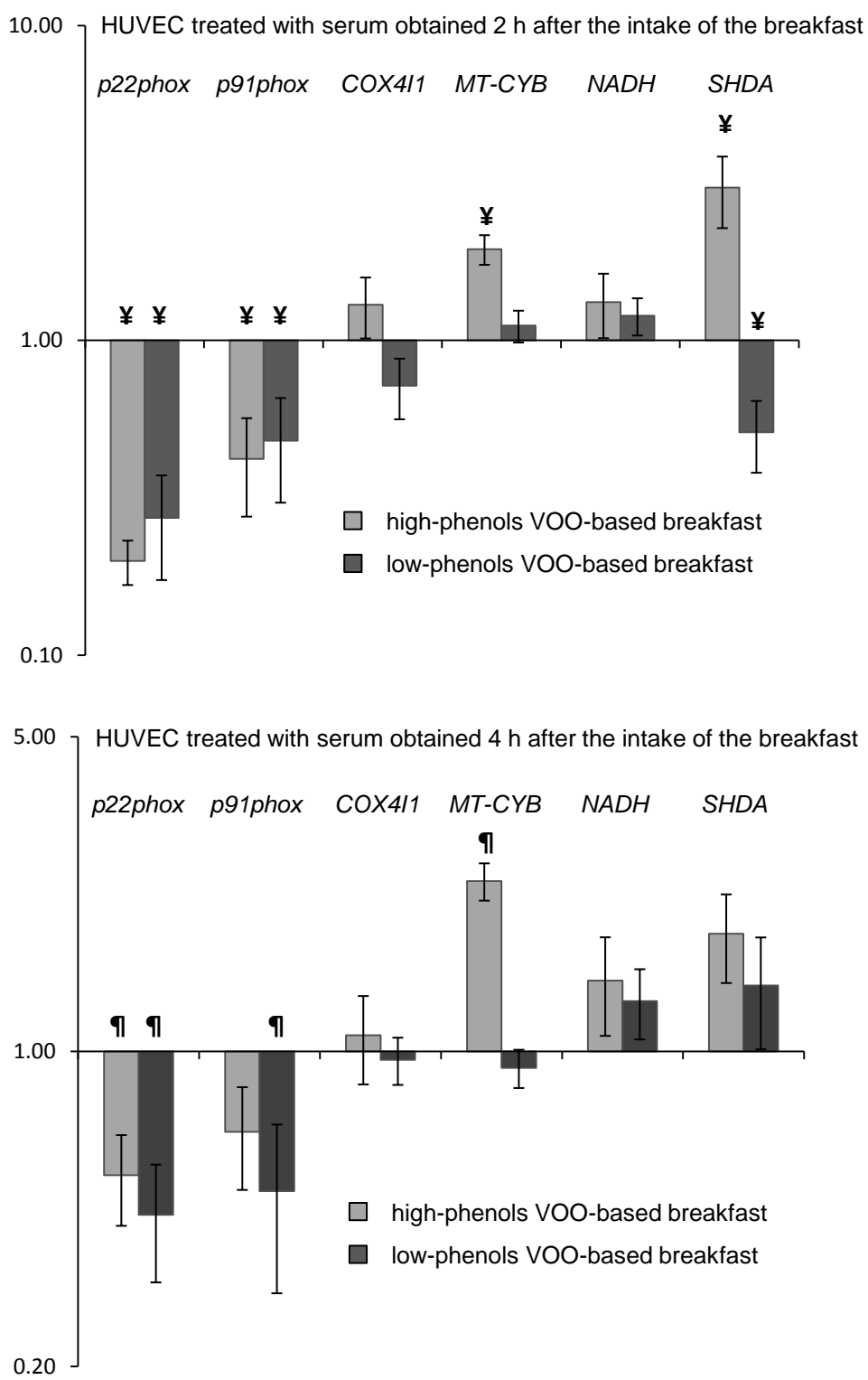


Figure 2. Expression of pro-oxidant enzymes and mitochondrial respiratory chain components genes in HUVEC .

Figure 3

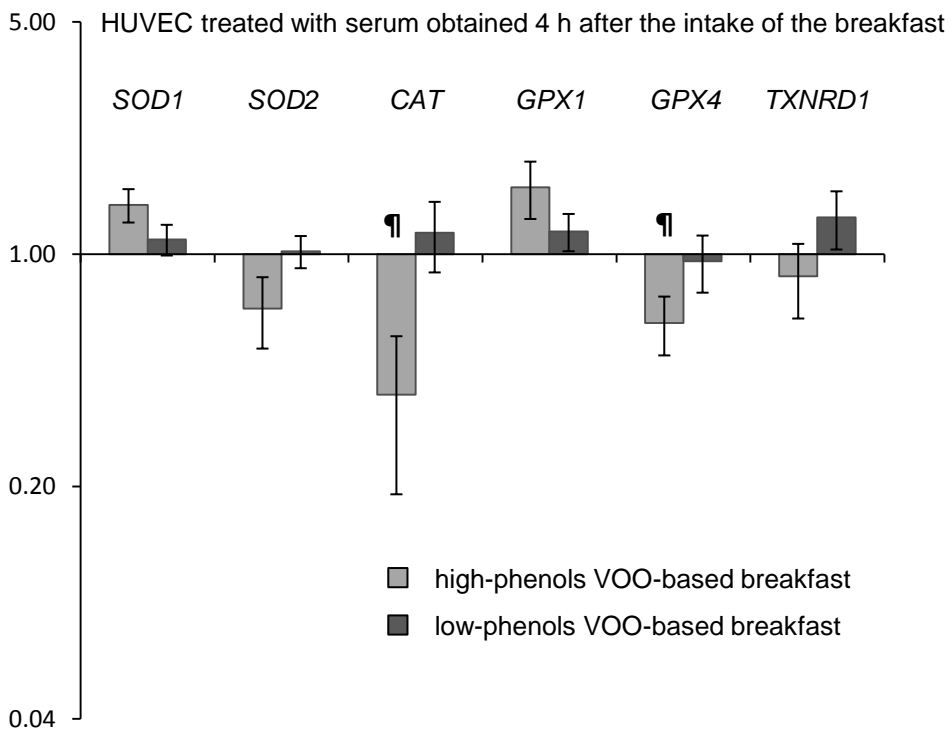
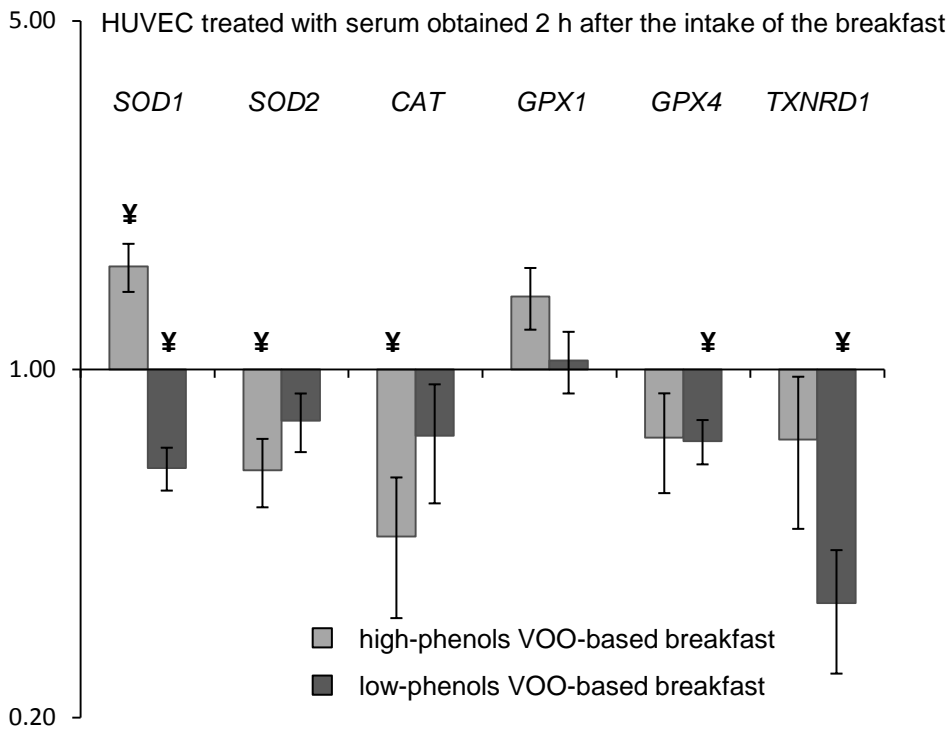


Figure 3. Expression of antioxidant enzyme genes in HUVEC.

Table 1

<i>Genes</i>	<i>FC at 2 hours</i>	<i>p -value</i>	<i>FC at 4 hours</i>	<i>p- value</i>
<i>IKKa</i>	1.74±0.34	0.075	1.34±0.35	0.389
<i>IKKb</i>	2.70±0.95	0.131	0.87±0.25	0.631
<i>P65</i>	0.48±0.04	<0.001 ^a	0.94±0.11	0.614
<i>IkBa</i>	0.79±0.20	0.368	0.74±0.16	0.170
<i>MCP-1</i>	0.52±0.10	0.002 ^a	0.50±0.06	<0.001 ^a
<i>IL-6</i>	1.28±0.26	0.343	1.08±0.21	0.737
<i>p22phox</i>	0.73±0.11	0.050	1.22±0.26	0.445
<i>gp91phox</i>	0.88±0.28	0.691	1.35±0.33	0.338
<i>COX4II</i>	1.81±0.37	0.076	1.13±0.24	0.609
<i>MT-CYB</i>	1.75±0.18	0.004 ^a	2.60±0.23	<0.001 ^a
<i>NADH</i>	1.10±0.24	0.696	1.11±0.26	0.694
<i>SDHA</i>	5.98±1.44	0.012 ^a	1.30±0.27	0.327
<i>SOD1</i>	2.54±0.26	0.001 ^a	1.27±0.14	0.102
<i>SOD2</i>	1.03±0.12	0.139	0.59±0.15	0.079
<i>CAT</i>	0.63±0.19	0.096	0.33±0.15	0.003 ^a
<i>Gpx1</i>	1.34±0.18	0.109	1.36±0.25	0.218
<i>Gpx4</i>	1.02±0.22	0.945	0.65±0.12	0.029
<i>TXNRD1</i>	2.13±0.68	0.155	0.66±0.16	0.081

Table 1. Comparisons between the intakes of VOO with different content of phenolic compounds in the gene expression of HUVEC. Values are mean ± SEM. mRNA levels are expressed as Fold Change (FC) between the gene expression of cells treated with serum of VOO with a high content of phenolic compounds and the gene expression of the cells treated with serum of VOO with a low content of phenolic compounds at 2 and 4 hours respectively. Differences between treatments were assessed by One-way ANOVA statistical analysis. Values with superscripts differ significantly between treatments in the post hoc analysis using Bonferroni's multiple comparison tests.

CONFLICTS OF INTEREST STATEMENT

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

We confirm that we have given due consideration to the protection of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning intellectual property.

We further confirm that any aspect of the work covered in this manuscript that has involved either experimental animals or human patients has been conducted with the ethical approval of all relevant bodies and that such approvals are acknowledged within the manuscript.

We understand that the Corresponding Author is the sole contact for the Editorial process (including Editorial Manager and direct communications with the office). He is responsible for communicating with the other authors about progress, submissions of revisions and final approval of proofs. We confirm that we have provided a current, correct email address which is accessible by the Corresponding Author and which has been configured to accept email from jlopezmir@uco.es

Signed by Antonio Camargo on behalf of all authors:



Antonio Camargo, PhD

Lipid and Atherosclerosis Research Unit

Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba/IMIBIC

Cordoba, Spain.