

“Contribución de un desayuno de tipo mediterráneo a la prevención del desarrollo de aterosclerosis en individuos obesos.”

Tesis doctoral realizada por:

*Laura Sinausía Nieva*

Bajo la dirección de:

*Dr. Javier Sánchez Perona*

Sevilla, 2017

**► INTRODUCCIÓN..... 1**

**1. La aterosclerosis y el carácter aterogénico de las lipoproteínas ricas en triglicéridos..... 2**

**1.1 La aterosclerosis.....2**

**1.2 Las lipoproteínas.....7**

- Tipos de lipoproteínas y sus características
- Componentes lipídicos de las lipoproteínas
- Componentes proteicos de las lipoproteínas las apolipoproteínas

**1.3 Las lipoproteínas ricas en triglicéridos.....17**

- Los quilomicrones
- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

**1.4 Vías de incorporación de TRL por los macrófagos.....28**

- Endocitosis mediada por receptores de superficie dependientes de Apo E:LDLR, VLDLR, LRP-1
- Endocitosis mediada por receptores de superficie independientes de Apo E:SRA2, SRB1, CD36

**1.5 Propiedades aterogénicas de las partículas TRL.....33**

Las TRL en el periodo postprandial

**2. Obesidad como factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares.....38**

**2.1 La obesidad. Un problema de salud pública.....38**

**2.2 La patofisiología de la obesidad.....39**

- Obesidad y la resistencia a la insulina
- Obesidad y el síndrome metabólico

**2.3 La inflamación crónica en la obesidad y síndrome metabólico.....42**

**2.4 Marcadores de inflamación como predictores de riesgo cardiovascular en la obesidad.....43**

- La sensibilidad a la insulina como biomarcador de inflamación
- Citoquinas y adipocinas como biomarcadores de inflamación

<b>3. La dieta como el primer factor de intervención para la prevención y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares (ECV).....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 La dieta Mediterránea.....</b>	<b>51</b>
-El carácter cardioprotector de la dieta mediterránea	
<b>3.2 El aceite de oliva.....</b>	<b>55</b>
-Composición del aceite de oliva	
-El aceite de oliva como elemento clave del carácter cardioprotector de la dieta mediterránea	
<b>► <u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>.....</b>	<b>73</b>
<b>► <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Estudio de la respuesta lipídica postprandial en suero tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y un desayuno de tipo occidental en adultos obesos.....</b>	<b>78</b>
1.1 Selección y características de los participantes del estudio.....	79
1.2 Diseño experimental de la intervención dietética.....	80
1.3 Ensayo postprandial.....	81
1.4 Determinaciones bioquímicas y estudio del perfil lipídico basal y postprandial en suero.....	84
<b>2. Estudio del perfil de marcadores de inflamación postprandiales en suero de adultos obesos y normopesos tras la ingesta de los desayunos experimentales.....</b>	<b>85</b>
2.1 Medición de los niveles de adipoquinas y citoquinas en suero.....	86
<b>3. Caracterización de las lipoproteínas ricas en triglicéridos postprandiales.....</b>	<b>91</b>
3.1 Aislamiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de suero.....	92
3.2 Caracterización de la composición de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.....	92
3.3 Caracterización de la composición proteica en las lipoproteínas ricas en triglicéridos.....	96

<b>4. Estudio de la influencia de las lipoproteínas ricas en triglicéridos postprandiales en la formación de células espumosas.....</b>	<b>98</b>
4.1 Cultivos celulares de monocitos THP-1 y diferenciación a macrófagos.....	100
4.2 Estudio de la acumulación lipídica en macrófagos.....	101
4.3 Estudio de los niveles de expresión de los receptores celulares de superficie implicados en los procesos de captación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en macrófagos.....	103
<b>5. Estudio de la capacidad del componente lipídico de las lipoproteínas ricas en triglicéridos para modular la actividad de la lipoproteína lipasa de macrófagos.....</b>	<b>111</b>
5.1 Procedimiento experimental.....	111
5.2 Preparación de las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP).....	112
5.3 Preparación de suero d<1.020 deficiente.....	113
5.4 Cuantificación de los triglicéridos incorporados en las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP).....	114
5.5 Ensayo de medición de la actividad de la LPL.....	115
5.6 Cuantificación de la acumulación lipídica en macrófagos.....	115
5.7 Cuantificación de la proteína total celular.....	115
5.8 Análisis de expresión génica de LPL y ANGPTL4.....	116
<b>6. Análisis estadístico.....</b>	<b>117</b>
<b>► RESULTADOS.....</b>	<b>118</b>
<b>1. Estudio de la respuesta lipídica postprandial en suero tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y un desayuno de tipo occidental en adultos obesos y normopesos.....</b>	<b>119</b>
1.1 Estudio del perfil lipídico y bioquímico basal en suero.....	119
1.2 Estudio del perfil lipídico y bioquímico postprandial en suero.....	122

<b>2. Estudio del perfil de marcadores de inflamación basal y postprandial en suero de adultos obesos y normopesos tras la ingesta de los desayunos experimentales.....</b>	<b>136</b>
2.1 Concentración basal en suero de los marcadores de inflamación.....	136
2.2 Concentración postprandial en suero de los marcadores de inflamación.....	138
<b>3. Caracterización de los ácidos grasos componentes de las lipoproteínas ricas en triglicéridos aisladas de adultos obesos y normopesos, antes y tras la ingesta de los desayunos experimentales.....</b>	<b>153</b>
3.1 Estudio de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos y fosfolípidos extraídos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos aisladas de los participantes normopesos.....	155
3.2 Estudio de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos y fosfolípidos extraídos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos aisladas de los participantes obesos.....	160
<b>4. Influencia de las lipoproteínas ricas en triglicéridos postprandiales en la formación de células espumosas y caracterización del perfil lipídico intracelular de macrófagos tras la incorporación de las partículas.....</b>	<b>165</b>
4.1 Estudio de la acumulación lipídica en macrófagos mediante tinción con aceite rojo O.....	165
4.2 Caracterización de los ácidos grasos componentes de los triglicéridos incorporados en el interior de los macrófagos tras su incubación con las lipoproteínas ricas en triglicéridos procedentes de los sujetos normopesos.....	170
4.3 Caracterización de los ácidos grasos componentes de los triglicéridos incorporados en el interior de los macrófagos tras su incubación con las lipoproteínas ricas en triglicéridos procedentes de los sujetos obesos.....	173

<b>5. Estudio de la expresión génica de los receptores celulares de superficie implicados en los procesos de captación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos por macrófagos.....</b>	<b>176</b>
5.1 Modulación de los niveles de expresión de los receptores celulares dependientes de apo E: LDLR, VLDLR y LRP-1.....	176
5.2 Modulación de los niveles de expresión de los receptores celulares independientes de apo E (receptores Scavenger): SRA2, SRB1 y CD36.....	180
<b>6. Estudio de la capacidad del componente lipídico de las lipoproteínas ricas en triglicéridos para modular la actividad de la lipoproteín lipasa de macrófagos .....</b>	<b>185</b>
6.1 Modulación de la actividad de la LPL de macrófagos por las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP) con distinta composición lipídica.....	185
6.2 Modulación de los niveles de expresión de los genes LPL y ANGPTL4 por parte del componente lipídico de las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP).....	188
6.3 Estudio de la acumulación lipídica en macrófagos incubados con las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP) con diferente composición lipídica .....	189
<b>► <u>DISCUSIÓN</u>.....</b>	<b>191</b>
<b>► <u>CONCLUSIONES</u>.....</b>	<b>246</b>
<b>► <u>REFERENCIAS</u>.....</b>	<b>249</b>
<b>► <u>ANEXO</u>.....</b>	<b>298</b>
<b>Resumen ejecutivo.....</b>	<b>299</b>

# INTRODUCCIÓN

# 1. LA ATEROESCLEROSIS Y EL CARÁCTER ATEROGÉNICO DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS

## 1.1 La aterosclerosis

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la enfermedad cardiovascular (ECV) como un grupo de desórdenes del corazón y vasos sanguíneos que incluyen las siguientes enfermedades: coronaria, cerebrovascular, arterial periférica, cardiopatía reumática, cardiopatías congénitas, y trombosis venosa y embolia pulmonar, siendo las manifestaciones clínicas más comunes el infarto de miocardio y derrame cerebral. En la mayoría de los casos, la causa subyacente de la ECV es la aterosclerosis. La aterosclerosis es un término general empleado para hacer referencia a un estado de inflamación crónica que afecta a las grandes arterias, principalmente la aorta y las coronarias, carótidas, ilíacas y femorales. Se caracteriza por el engrosamiento de la pared arterial debido al aumento del espesor del área de la íntima, y endurecimiento y pérdida de elasticidad de las arterias. Estos fenómenos son debidos a la formación de una placa construida en su interior, constituida por lípidos, restos celulares, calcio y elementos fibrosos (American Heart Association). En los años 60 y a principios de los 70, los eventos clínicos desencadenados por ECV alcanzaron cifras históricas en los países desarrollados [1], y aunque desde entonces la mortalidad por ECV se está reduciendo, aún sigue siendo la principal causa de muerte en los países desarrollados y en vías de desarrollo [2, 3]. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se calcula que en el año 2012 murieron 17.5 millones de personas a consecuencia de ECV, lo que representa un 31% de todas las muertes a nivel mundial, siendo de ellas el 80% a consecuencia del desarrollo de aterosclerosis.

Esta enfermedad es lenta y progresiva, y cursa asintómicamente en la mayoría de los casos, hasta que los eventos clínicos que desencadena pueden poner en riesgo la vida del individuo. Existen evidencias del posible comienzo de la lesión incluso a edad temprana, tal y como describieron los trabajos realizados por Holman de autopsias en niños norteamericanos de hasta 3 años, donde encontró algunas aortas que presentaban estrías grasas [4]. Este proceso es considerado reversible, pero con el paso de los años la acumulación de lípidos en las arterias se incrementa, pudiéndose presentar las primeras lesiones fibrosas en la adolescencia. En los años siguientes, estas placas aumentan de tamaño y sufren modificaciones que empeoran la lesión, hasta que la ulceración de la placa, su rotura y trombosis precipita el evento clínico [5]. En algunas personas, la enfermedad progresa rápidamente, manifestando los primeros síntomas a los 30 años. En cambio,

en otras personas esta situación no llega a ser peligrosa hasta que alcanzan los 50 o 60 años (American Heart Association).

### **1.1.1 Fases del desarrollo del proceso aterogénico.**

Las distintas fases cronológicas del proceso de aterogénesis se detallan a continuación:

#### *1. Inicio de la lesión. Disfunción endotelial y reclutamiento de células inmunes.*

El evento que desencadena el desarrollo de la aterosclerosis es la presencia de elevados niveles de lipoproteínas plasmáticas y su consiguiente acumulación en la matriz subendotelial de las arterias. El endotelio vascular es un importante regulador de la homeostasis vascular y, con sus uniones intercelulares complejas, funciona como una barrera permeable selectiva entre la sangre y los tejidos [6], además de controlar el tono vascular, inflamación y prevenir la formación de trombos [7]. En regiones susceptibles de desarrollar aterosclerosis, las células endoteliales presentan una fina capa de glicocalix y un alineamiento desordenado [8], mayor senescencia celular y apoptosis [9]. Además, existe una expresión reducida de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y superóxido dismutasa (SOD), las cuales promueven la migración de células endoteliales y supervivencia celular, y reducen el estrés oxidativo celular, respectivamente [10, 11]. Debido a estas circunstancias, la integridad de la barrera endotelial se ve comprometida en estas regiones, permitiendo que las lipoproteínas aterogénicas difundan pasivamente a través de las uniones de las células endoteliales. De esta manera, las lipoproteínas se acumulan y quedan retenidas en la capa íntima a través de interacciones que se establecen entre las células endoteliales y la apolipoproteína B (apo B) contenida en las lipoproteínas aterogénicas [12]. Los proteoglicanos unidos a la membrana celular de las células endoteliales también pueden actuar como receptores endocíticos, facilitando la captación de varios ligandos y metabolitos, entre ellos las lipoproteínas, contribuyendo en su retención [13].

Este fenómeno provoca la disfunción/activación del endotelio, con características protrombóticas y proinflamatorias [14]. Las células endoteliales activadas incrementan la expresión de proteínas de adherencia de monocitos: moléculas de adhesión intercelular- 1 (ICAM-1), moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1), P-selectina; receptores proinflamatorios (receptor toll-like 2, TRL2) y citoquinas (MCP-1 y IL8) [15]. Además, la activación de las células endoteliales conlleva una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species, ROS) [16] que pueden causar modificaciones por oxidación de lipoproteínas que contienen

apo B [17], adquiriendo un perfil más aterogénico.

## 2. Reclutamiento de monocitos, diferenciación a macrófagos y formación de células espumosas

Las moléculas liberadas por las CE activadas causan el reclutamiento hacia la pared arterial de células inmunológicas que se encuentran en circulación, particularmente monocitos y linfocitos T. Estas células comienzan a rodar sobre la superficie endotelial por interacciones entre el monocito y el endotelio, mediadas por selectinas, especialmente P-selectina, quedando posteriormente ancladas a la pared arterial por medio de las proteínas de adhesión expresadas en la superficie celular de las CE, ICAM-1 y VCAM-1 [18].

Potentes factores quimioatrayentes como M-CSF (macrophage colony-stimulator factor), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), e IL-8 (interleuquina 8), inducen la migración de los monocitos que se encuentran anclados a la pared del endotelio vascular al espacio subendotelial [19] a través del endotelio. Una vez en la capa íntima, se diferencian a macrófagos, siendo M-CSF el mayor estimulador de la diferenciación y proliferación de los macrófagos [18]. Aunque los macrófagos son el principal tipo de células que se infiltra, células dendríticas, los mastocitos y células T también contribuyen al desarrollo de las lesiones [20]. Las células T helper 1 (Th-1) activadas específicamente por antígeno producen interferón (IFN), regulando el fenotipo inflamatorio de los macrófagos, ya que el IFN los convierte en células M1 con fenotipo proinflamatorio. En cambio, las células reguladoras T (T-reg) producen citoquinas anti-inflamatorias (TGF- $\beta$  and IL-10) e inhiben la activación de Th-1, dando lugar a macrófagos M2 con un fenotipo más anti-inflamatorio [18].

Durante las fases iniciales del proceso aterosclerótico, los monocitos derivados a macrófagos presentes en la íntima comienzan a incorporar en su interior lipoproteínas que contienen apo B que se encuentran retenidas en el espacio subendotelial, tanto modificadas (LDL-ox) como nativas (VLDL, QM, remanentes), degenerando en la formación de células espumosas. Las lipoproteínas aterogénicas que se encuentran retenidas en la matriz extracelular principalmente por medio de proteoglicanos, sufren una variedad de modificaciones de oxidación y enzimáticas. Como resultado, se desencadena una serie de reacciones proinflamatorias que perpetúan la activación, reclutamiento y transmigración de más monocitos y células inflamatorias a través del endotelio [21]. Además, estas modificaciones potencian la captación de las lipoproteínas por parte de los macrófagos a través de vías en las que están implicados tanto los receptores celulares de superficie, como otras rutas alternativas independientes de receptores: pinocitosis, e hidrólisis

mediada por la LPL.

La acumulación de células espumosas evoluciona a la aparición de la “estría grasa”. La estría grasa no provoca complicaciones clínicas y puede incluso ser reversible. Sin embargo, una vez se infiltran células del músculo liso en la lesión, y ésta alcance un estado más avanzado y evolucione a placa de ateroma fibrosa, es menos probable que la regresión pueda ocurrir [22].

### 3. Formación de la placa fibrosa y progresión de la lesión

Los macrófagos, además de acumular lípidos en su interior, también estimulan la acumulación de lípidos en las células musculares subyacentes, generándose citoquinas que a su vez atraen a más macrófagos, lo que hace que el proceso inflamatorio se cronifique [23]. Además, los macrófagos producen sustancias quimioatrayentes que estimulan la migración de células de la musculatura lisa presentes en la túnica media a través de la lámina elástica interna hasta la íntima, donde proliferan en respuesta a factores de crecimiento también producidos por los macrófagos inflamatorios [24]. Una vez en la íntima, las células del músculo liso secretan moléculas de la matriz extracelular tales como colágeno fibrilar, proteoglicanos y elastina, favoreciendo la formación de una capa fibrosa que cubre la lesión con un núcleo constituido por células espumosas: la placa de ateroma fibrosa [25].

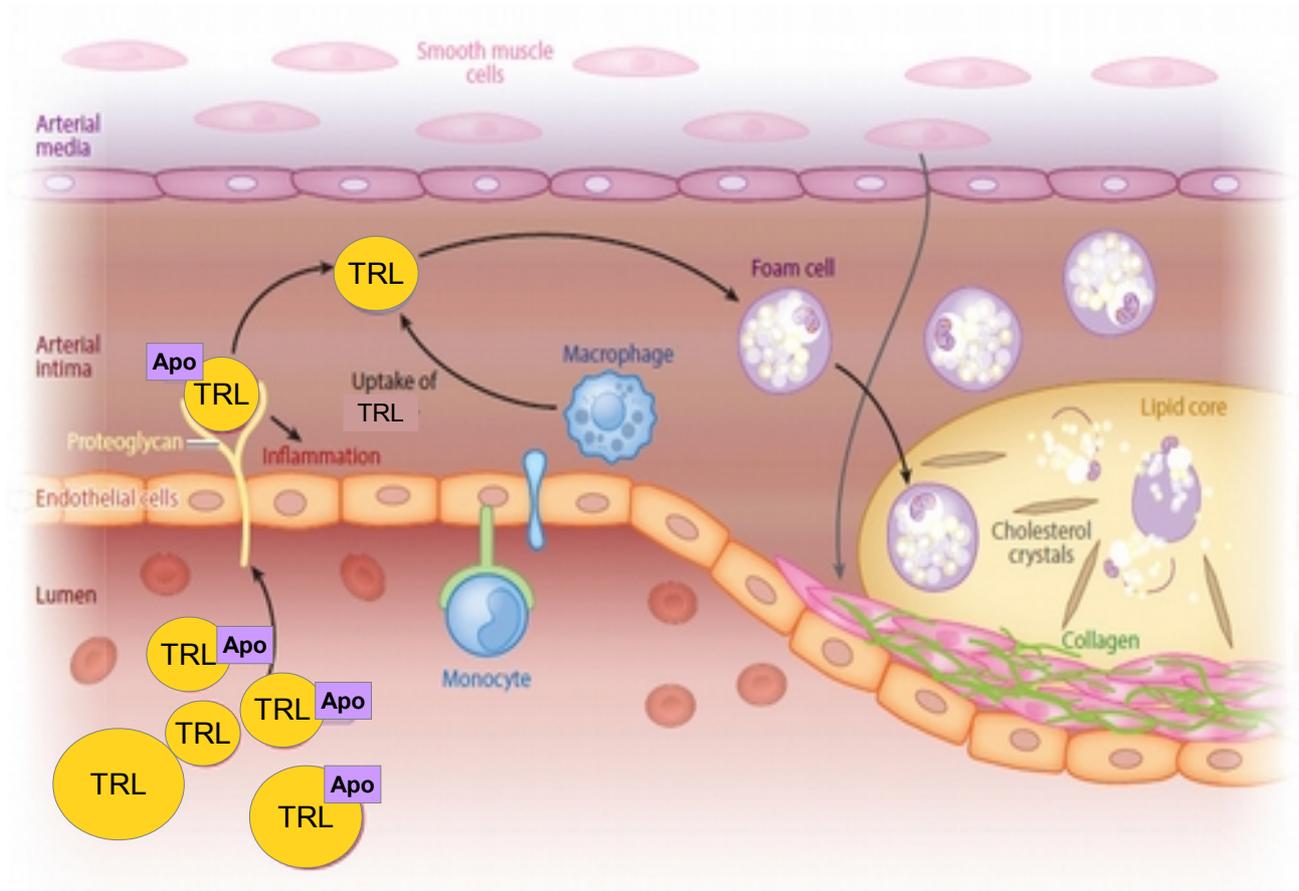
Inicialmente, las lesiones crecen hacia la adventicia hasta que se alcanza un punto crítico, después de lo cual empiezan a expandirse hacia el exterior e invaden el lumen vascular. La lesión entra en fase de progresión y continúan creciendo debido a la migración de nuevas células mononucleares procedentes del torrente sanguíneo. Por otro lado, la carga masiva de lípidos en el interior de los macrófagos hace que las vías de metabolización de lipoproteínas estén saturadas, provocando un acumulación tóxica de lípidos y estrés en el reticulo endoplasmático [26]. La respuesta inflamatoria continuada lleva a la desestabilización de la placa aterosclerótica a través de la acción de citoquinas pro-inflamatorias, y algunas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ , promueven la apoptosis de los macrófagos, contribuyendo con su elevada carga lipídica al núcleo necrótico de la lesión.

La lesión entraría en estado avanzado, con un núcleo que contiene numerosos macrófagos necrosados, restos celulares y acumulaciones lipídicas extracelulares, todo ello recubierto por una consistente capa fibrosa celular (figura 1).

#### 4. Formación de la placa vulnerable y rotura

Debido a una condición inflamatoria no resuelta, se produce la formación de la placa vulnerable, lo que incrementa el riesgo de rotura de la placa, liberando su contenido al torrente sanguíneo y provocando trombosis. La placa vulnerable se caracteriza por dos cambios morfológicos fundamentales: 1) formación de un núcleo necrótico y 2) una fina capa fibrosa. La rotura de la capa fibrosa depende principalmente de la composición y vulnerabilidad de la placa más que de la severidad de la estenosis o estrechamiento de la luz del vaso. Las placas vulnerables es posible que sufran una rotura como resultado de la degradación de la matriz extracelular por la acción de moléculas pro-trombóticas y proteinasas secretadas por los macrófagos [27], incluyendo colagenasa intersticial, gelatinasas y estromolisina [28]. También es posible que ocurra por la erosión superficial de las células endoteliales, probablemente debido a la apoptosis endotelial o a la descamación.

La rotura de la placa conduce a la exposición de las sustancias pro-coagulantes y pro-trombóticas desde el núcleo necrótico de la lesión al torrente sanguíneo, iniciándose la activación/adhesión plaquetaria y su agregación en la superficie vascular expuesta, así como la activación de la cascada de coagulación. Todo ello conduce finalmente a la formación de un trombo y a las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis, infarto agudo de miocardio o muerte súbita [29].



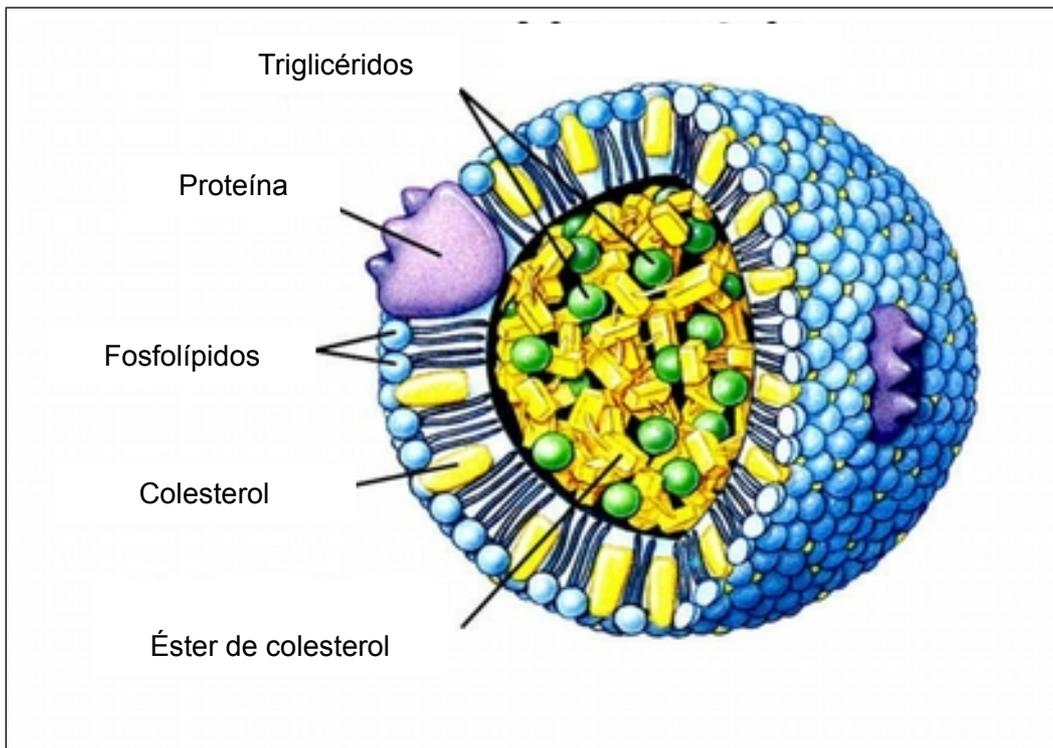
**Figura 1. Desarrollo de la placa aterosclerótica.** Las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) en circulación invaden la pared arterial y se acumulan en la íntima, induciendo la activación del endotelio vascular y la expresión de moléculas de adhesión. Los monocitos anclados a las células endoteliales migran a través del endotelio hacia la íntima, donde se diferencian a macrófagos. Los macrófagos comienzan a internalizar partículas TRL a través de los receptores celulares y se transforman en células espumosas, un punto clave en la aparición de la estría grasa y posterior formación de la placa de ateroma. La liberación de citoquinas por las células T y macrófagos estimula la trasvasación de células del músculo liso (SMCs) de la media a la íntima, donde proliferan y forman una capa fibrosa recubriendo el núcleo necrótico lipídico de la lesión.

## **1.2 Las lipoproteínas**

Los lípidos, a consecuencia de su inmiscibilidad con soluciones acuosas, no se encuentran libres en el plasma, sino que dependen de elaborados complejos moleculares denominados lipoproteínas para ser transportados a lo largo del torrente sanguíneo y fluidos extracelulares, pudiendo así llegar a los tejidos [30].

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares solubles constituidos por lípidos: triglicéridos (TG), colesterol y fosfolípidos (FL), y una o más proteínas específicas denominadas apolipoproteínas (figura 2). Los lípidos no polares, como el éster de colesterol (EC) y los TG, conforman el núcleo hidrofóbico de la estructura lipoproteica, mientras que la superficie hidrofílica está compuesta por grupos lipídicos más polares, como el colesterol no esterificado y los FL, ambos intercalados con moléculas proteicas, lo cual permite la solubilidad de los complejos [31].

Las lipoproteínas no presentan una estructura estática. Su continua síntesis y degradación metabólicas va acompañada por rápidos intercambios de sus componentes lipídicos y proteicos entre las distintas clases de lipoproteínas. Esta capacidad es posible gracias a las fuerzas fisicoquímicas débiles que unen las partículas que constituyen la macromolécula. Las enzimas imprescindibles para la liberación, almacenamiento y movilización de los lípidos de las lipoproteínas son: la lipoproteína lipasa (LPL), lipasa hepática (HL), lecitin-colesterol aciltransferasas (LCAT) y acil-CoA:colesterol aciltransferasa [30].



**Figura 2.** Imagen representativa de la estructura de una lipoproteína.

### 1.2.1 Tipos de lipoproteínas y sus características

Las lipoproteínas se clasifican en función de su densidad relativa de flotación, ya que en base a este criterio pueden ser aisladas por ultracentrifugación. Aunque también pueden separarse por su diferencia de tamaño, movilidad electroforética y composición apolipoproteica. La densidad de las diferentes lipoproteínas viene condicionada principalmente por su tamaño y por su relación lípido-proteína. Las lipoproteínas más ricas en la fracción lipídica son las menos densas, mientras que aquellas con mayor proporción de apolipoproteínas son las más densas. A su vez, el tamaño de las lipoproteínas varía inversamente con la densidad de flotación, existiendo partículas con diámetros de 900-1200 nm [32] en el caso de los QM con tan solo un contenido proteico del 1-2%, hasta los 7 nm de diámetro de las HDL, con una proporción de proteínas de más del 50%. [31].

El tamaño de partícula constituye un importante determinante del destino metabólico de las lipoproteínas, ya que según sea el tamaño que presenta, éste puede afectar a la incorporación de TG en los tejidos, condicionando su carácter aterogénico. Esta propiedad ha quedado demostrada por estudios como el llevado a cabo por Palmer et al. [33], mediante el cual demostraron que la mayor incorporación de TG por los macrófagos tenía lugar cuando las células eran incubadas con TRL

obtenidas en el momento en el cual el tamaño de partícula es intermedio, con un tamaño medio de 195.1 nm [34].

De mayor a menor tamaño se distinguen los siguientes 5 grupos: Quilomicrones (QM); VLDL o lipoproteínas de muy baja densidad (Very Low Density Lipoproteins), IDL o lipoproteínas de densidad intermedia (Intermediate Density Lipoproteins), LDL o lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins) y HDL o lipoproteínas de alta densidad (High Density Lipoproteins). Estas últimas se subdividen a su vez en dos subtipos con distinta densidad, HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> [32].

En los últimos años, se ha comenzado a identificar otra lipoproteína, la Lp (a), como un factor de riesgo independiente para eventos aterotrombogénicos en múltiples estudios [35]. Esta lipoproteína consiste en una partícula de LDL en la cual apo B100 está covalentemente unida vía puente disulfuro a apo A, una glicoproteína con unidades repetidas de Kringle que comparte homología con el plasminógeno. Aunque apo A es sintetizada por el hígado, las partículas de Lp (a) no son formadas en el hígado sino en el plasma. A pesar de ser una partícula modificada de LDL, los niveles de Lp (a) son independientes de los de LDL, y aunque su catabolismo aún no está del todo claro, no es captada por el receptor LDLR [36].

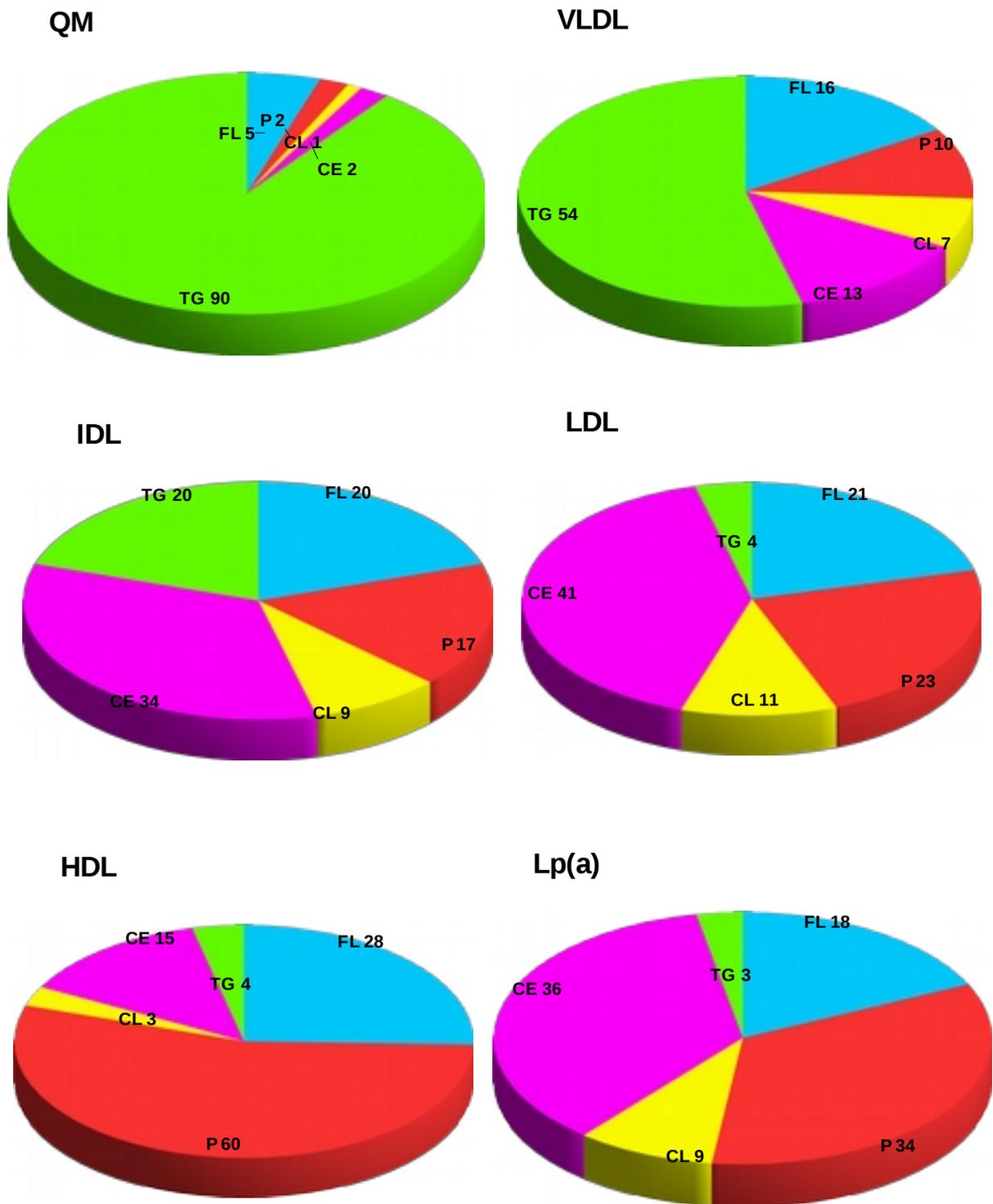
**Tabla 1.** Características principales de las distintas clases de lipoproteínas humanas [37].

<b>Lipoproteína</b>	<b>Densidad (g/ml)</b>	<b>Peso molecular (10<sup>6</sup> Da)</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>Lípido mayoritario</b>	<b>Apolipoproteínas principales*</b>
Quilomicrón	< 0.95	>150	75-1200	TG	B48, A, C, E*
VLDL	0.95-1.006	5-130	30-80	TG	B100, A,C, E
IDL	1.006-1.019	4	25-35	TG / Colesterol	B100, C, E
LDL	1.019-1.063	3	18-25	Colesterol	B100
HDL	1.063-1.210	0.3	5-12	FL/ Colesterol	A, C, E
Lp (a)	1.055-1.120	5.5	25	Colesterol	(a), B100

\*La composición apoproteica varía según el grado de maduración de la lipoproteína y de la subespecie específica.

### **1.2.2 Componentes lipídicos de las lipoproteínas**

El contenido y composición lipídica de los diferentes tipos de lipoproteínas se muestran en la figura 3. Los glicerolípidos, principalmente TG, son los componentes lipídicos mayoritarios de los QM y VLDL, mientras que constituyen tan solo el 4% de los lípidos contenidos en LDL y HDL, que están por el contrario enriquecidos en ésteres de colesterol (15-41%). En todas las clases de lipoproteínas hay moléculas de colesterol no esterificado, aunque se encuentran en proporciones relativamente bajas. Esto es debido a que es activamente esterificado por el enzima LCAT en HDL y posteriormente redistribuido entre las LDL y VLDL a través de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol. El contenido total de FL de las lipoproteínas aumenta con el incremento de la densidad. Además, está directamente relacionado con el área de superficie de las partículas de lipoproteínas, ya que la superficie de las lipoproteínas está cubierta por una monocapa de FL y apolipoproteínas.



**Figura 3. Contenido y composición lipídica y proteica (%) de los diferentes tipos de lipoproteínas** Datos extraídos de FEPREVA [38] TG: triglicéridos; CE: ésteres de colesterol; CL: colesterol; FL: fosfolípidos; P: proteínas; QM: quilomicrón; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; LDL: lipoproteína de baja densidad; IDL: lipoproteína de densidad intermedia; HDL: lipoproteína de alta densidad; Lp (a): Lipoproteína a.

### 1.2.3. Componentes proteicos de las lipoproteínas: las apolipoproteínas

Las apolipoproteínas regulan el metabolismo de las lipoproteínas y determinan su función en el metabolismo lipídico. Se sitúan preferentemente hacia el exterior de las lipoproteínas aunque pueden incluir parte de su estructura en el núcleo hidrofóbico. Cuando esto ocurre, los aminoácidos también se disponen según su polaridad dentro de la estructura lipoproteica, orientándose los más polares hacia el exterior de la partícula, a diferencia de aquellos más apolares que lo harán hacia el interior [39].

La función común de todas las apolipoproteínas es ayudar a solubilizar lípidos en la circulación, para transportarlos y redistribuirlos entre varios tejidos. En las condiciones apropiadas, las apolipoproteínas pueden formar partículas de forma espontánea con los FL, pero para el ensamblaje *in vivo* de las apolipoproteínas con los lípidos se requiere la asistencia de proteínas celulares como la proteína de transferencia microsomal (MTP) de lípidos o el transportador ABC1 [31]. Además, las apolipoproteínas participan en el mantenimiento de la estructura de la partícula de las lipoproteínas, ya que tienen la capacidad de cambiar la conformación de las partículas y ajustar su contenido lipídico, composición y estado metabólico [31].

Las apolipoproteínas que se encuentran en el plasma se clasifican en 2 grupos: no transferibles y transferibles o solubles. Las apolipoproteínas no transferibles (apo B-100 y apo B-48) son proteínas muy grandes e insolubles en agua que son ensambladas con lípidos en su lugar de síntesis y circulan unidas a la misma partícula de lipoproteína a través de varias transformaciones metabólicas en el plasma, hasta que son retiradas de la circulación como lipoproteínas por la acción de los receptores específicos. Por el contrario, las proteínas transferibles (apo E, apo A1, apo A2, y apo C), tienen una masa molecular menor que las apolipoproteínas no transferibles, son más o menos solubles en agua en su estado deslipidado, pueden transferirse entre partículas de lipoproteínas, y adquirir lípidos mientras se encuentran en circulación [31].

Algunas de las apolipoproteínas transferibles, en sus correspondientes lipoproteínas, actúan como activadores o inhibidores de importantes enzimas plasmáticas implicadas en el metabolismo lipídico, como la LCAT, HL y la LPL [31].

Las apolipoproteínas tienen también una importante función en el reconocimiento por receptores de membrana. Este evento es importante para la liberación de lípidos a células específicas, ya que implica el reconocimiento de apolipoproteínas específicas por los receptores de la superficie celular. La interacción mejor caracterizada es la establecida entre el receptor LDL (LDLR) y las lipoproteínas que contienen apo B-100 y apo E [31].

Las apolipoproteínas más representativas de las TRL son:

#### -Apolipoproteína E

La apolipoproteína E (apo E) es uno de los componentes proteicos de los QM, QM remanentes (QMr), VLDL y HDL, incluida en el grupo de las apolipoproteínas transferibles. El hígado es el principal responsable de la producción de la apo E plasmática, aunque los macrófagos también son responsables de producir el 5-10% de apo E plasmática [40]. Existen seis fenotipos de apo E: tres fenotipos homocigotos (E4/4, E3/3, E2/2) y tres heterocigotos (E4/3, E4/2, y E3/2), siendo el fenotipo más común en la población humana el E3/3 [41].

La apo E es una de las apolipoproteínas más estudiadas por sus numerosas funciones, entre ellas, destaca su papel protector frente a la aterosclerosis. Son varios los mecanismos a través de los cuales ayuda a reducir la aterosclerosis: a) reduce la proliferación e infiltración de macrófagos en la íntima mediante su expresión por células hematopoiéticas [42]; b) reduce la acumulación lisosomal de colesterol ya que su presencia en las lipoproteínas que contienen ApoB estimula la expresión de la lipasa ácida [43]; y c) la secreción de apo E por macrófago estimula la salida de colesterol tanto en presencia como ausencia de aceptores exógenos como HDL [44].

Esta apolipoproteína constituye el componente proteico mayoritario de lipoproteínas enriquecidas en colesterol que participan en el transporte y metabolismo del colesterol, como las HDL, lipoproteínas anti-aterogénicas encargadas del transporte del colesterol depositado en los tejidos periféricos al hígado para su eliminación del cuerpo [45]; y de las partículas remanentes de VLDL, enriquecidas relativamente en colesterol por la pérdida de los TG debido a la acción hidrolítica de la LPL. Además, la apo E desempeña un importante papel en la rápida eliminación de las lipoproteínas plasmáticas que contienen apo B por el hígado, excepto de LDL, ya que actúa de ligando de estas partículas con receptores de superficie celular en tejidos hepáticos y extrahepáticos: LDLR y LRP. Del mismo modo, la apo E también es importante como molécula de unión a la superficie endotelial y captación de aquellas lipoproteínas enriquecidas en apo E mediante su interacción con moléculas de heparán sulfato proteoglicanos presentes en la superficie

celular [46, 47].

Varios trabajos de investigación en los que han empleado como modelo de estudio ratones mutantes que no expresan apo E para analizar los mecanismos del desarrollo de la aterosclerosis, han demostrado que una deficiencia de esta apolipoproteína genera hipercolesterolemia y el desarrollo espontáneo de lesiones ateroscleróticas [48].

### -Apolipoproteína B

La apolipoproteína B (apo B) existe en dos isoformas: apo B-48 y apo B-100. Ambas son codificadas por el mismo gen, pero se expresan diferente, en el enterocito la primera, y en el hígado la segunda.

La apo B-48 debe su nombre a que solo expresa el 48% de la longitud de la proteína apo B-100. Ello es debido a una enzima editora de la apo B, únicamente activa en las células intestinales humanas, que introduce una modificación post-transcripcional a través de la cual se introduce una señal de fin de síntesis prematura, generando un péptido de menor tamaño, la apo B-48. [32]. La apo B-100 es sintetizada en el hígado. En este lugar no se encuentra la enzima editora, por lo que la apolipoproteína se expresa por completo.

La apo B-100 se encuentra en las VLDL y en las lipoproteínas que se sintetizan de su catabolismo:IDL y LDL [49]. Por el contrario, la apo B-48 se sintetiza en el intestino y se encuentra únicamente en los QM y QMr [50] siendo un marcador proteico específico de este tipo de lipoproteínas [32]. Puesto que la apo B tiene una importante función estructural, no se transfiere entre lipoproteínas. La apo B-100 es la proteína determinante para el reconocimiento y captación de LDL por los receptores LDL (LDLR) de superficie celular, tanto en tejidos hepáticos como extrahepáticos. La apo B-48 carece de la secuencia de reconocimiento localizada en el extremo C-terminal de la apo B que interacciona con LDLR y, por lo tanto, no puede mediar directamente la captación de lipoproteínas a través de LDLR [51]. Sin embargo, las lipoproteínas que contienen apo B-48 presentan un elevado contenido de apo E, la cual actúa como ligando para la captación de remanentes de VLDL y QM por los receptores LDLR y LRP [51]. La apo B-48 también es reconocida por el receptor apo B-48 (proteínas de unión de membrana, MBP 200 y 235) expresado en la superficie celular de monocitos/macrófagos, que constituyen una vía independiente de apo E y LPL, participando también en la formación de células espumosas [52].

Ensayos con anticuerpos monoclonales han demostrado que por cada lipoproteína hay una sola molécula de apo B [53]. Esta característica posibilita la identificación de sujetos que se encuentren en riesgo de desarrollar ECV ya que la cuantificación mediante técnicas inmunológicas de los niveles de apo B en plasma permite conocer los niveles de lipoproteínas aterogénicas (QM, VLDL, LDL) en circulación. Además, el hecho de que haya una única molécula de apo B por partícula también hace posible cuantificar el ratio TG/apo B en suero, el cual puede ser empleado para estimar el tamaño de partícula [54].

### -Apolipoproteínas C

La familia de las apolipoproteínas C (apo Cs) está compuesta por tres apolipoproteínas de bajo peso molecular (6,6-8,8 kD), denominadas apo C-I, C-II, C-III, y son transferibles entre lipoproteínas. El hígado es el mayor lugar de síntesis de las apo Cs, aunque el intestino también contribuye pero en una menor proporción [55].

Durante el periodo de ayuno, las apo Cs se encuentran principalmente asociadas con HDL. En cambio, durante la absorción de las grasas por el intestino tras la ingesta de las comidas, con la producción de QM, o durante la síntesis activa de VLDL por el hígado, las apo Cs se redistribuyen preferentemente en la superficie de estas partículas ricas en triglicéridos: QM y VLDL. Sin embargo, a medida que el núcleo rico en TG de las VLDL y QM es hidrolizado y eliminado por acción de la LPL, se genera un exceso de componentes de superficie (FL, colesterol no-esterificado, y apolipoproteínas) y las apo Cs, junto con otros componentes de superficie, son transferidos a las partículas de HDL. De modo que las apo CS están en equilibrio con el metabolismo dinámico de “remodelado” de las lipoproteínas plasmáticas.

La apo C-I, al igual que apo C-II y C-III, ha demostrado actuar como activador del enzima LCAT, por lo que las tres apo Cs participan en la esterificación del colesterol transferido a HDL [56] y en el “remodelado” de HDL.

La principal función metabólica de apo C-II está asociada con su capacidad para actuar como un cofactor en la activación de la LPL [57]. Pacientes con una deficiencia en apo C-II presentan una hipertrigliceridemia severa y un aclaramiento plasmático alterado de VLDL y QM, incluso en presencia de una lipasa funcional [58].

La apo C-III es la proteína más abundante de este grupo de apolipoproteínas. Se ha sugerido que su presencia puede modular la internalización de residuos de TRL a través de receptores

hepáticos [59], y su capacidad para inhibir la captación hepática de TRL y de inhibir las funciones de la LPL y HL ha sido demostrada. Además, se ha demostrado que la apo C-III está implicada en la organización de la partícula de HDL, y su ausencia puede resultar en una deficiencia de HDLs, conduciendo al desarrollo de una aterosclerosis severa [60, 61].

#### -Apolipoproteínas A

La apolipoproteína A (apo A-I) circula en el plasma principalmente como componente de HDL. También está presente en QM, aunque es difícil encontrarla en cantidades significativas en QMr, VLDL, VLDL remanentes, o LDL. Los dos lugares donde se sintetiza principalmente son el intestino y el hígado, y no sufre ninguna modificación postraduccional como glicosilación o fosforilación. La apo A-I derivada del intestino entra en circulación asociada a QM pero es rápidamente transferida a las partículas HDL durante la hidrólisis catalizada por la LPL de los QM. La apo A-I hepática entra en circulación como HDL naciente con muy poco o ningún contenido de ésteres de colesterol. Además de ser un importante componente estructural de las partículas de HDL a las que proporciona estabilidad termodinámica y funcionalidad fisiológica en varios estadios de su maduración, la apo A-I tiene otras funciones tales como servir de cofactor (activador) de LCAT. Ha sido demostrado *in vitro* que su presencia es requerida para la actividad de dicha enzima [62], por lo que desempeña una importante función en la movilización del exceso de colesterol de las células que no pueden metabolizarlo o disponer de él.

La apolipoproteína A-II (apo A-II) es la segunda apolipoproteína más abundante en HDL, y puede estar asociada a otras lipoproteínas aunque en menor cantidad. El principal lugar de síntesis es el hígado. Es sabido que la apo A-II es capaz de desplazar por completo a la apo A-I de HDL. Excepto por su presencia como componente estructural de HDL, se desconoce si la apo A-II tiene una función estructural específica en HDL o en su metabolismo [63].

La apolipoproteína A-IV (apo A-IV) se trata de un componente de las nuevas partículas secretadas de QM, pero no se encuentra en QMr, VLDL o LDL. A diferencia de otras apolipoproteínas, la mayoría de la apo A-IV se encuentra libre en el plasma más que unida a lipoproteínas, y se redistribuye rápidamente entre estas dos fracciones. La apo A-IV se sintetiza casi exclusivamente por el hígado e intestino. En cuanto a sus funciones, se ha demostrado *in vitro* que también es un potente activador de LCAT [63].

### **1.3 Las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL)**

Las TRL pueden derivar tanto de la vía exógena (constituidas a partir de los lípidos absorbidos de los alimentos) como la endógena (formadas a partir de lípidos almacenados). Mientras que todas las lipoproteínas transportan TG, las TRL son considerablemente más ricas en TG que las demás [64]. Las TRL son una mezcla heterogénea de lipoproteínas que incluye QM, QMr, VLDL y VLDL remanentes o IDL. Debido al considerable solapamiento de las densidades de estas lipoproteínas, el aislamiento de las diferentes clases desde el plasma humano posprandial es casi imposible. Así, la fracción de TRL ha sido ampliamente utilizada para el estudio del efecto de los lípidos que se ingieren con los alimentos sobre las enfermedades cardiovasculares [65].

#### **1.3.1 Los quilomicrones (QM)**

La principal función de los QM es permitir que los lípidos contenidos en los alimentos ingeridos y absorbidos por el intestino, sean transportados por el torrente sanguíneo, y alcancen los tejidos periféricos para la producción y almacenamiento de energía, o biosíntesis de otras moléculas.

Los QM constituyen las partículas lipoproteicas más grandes (diámetro 75-1200 nm) y menos densas ( $d < 0.95$  g/ml), con un gran componente lipídico muy enriquecido en triglicéridos (>90%). Contienen en su estructura diversas apolipoproteínas, incluyendo apo B-48, apo A-1, apo C-II, apo C-III, y apo E [32]. El tamaño de los QM depende del flujo de TG a través de los enterocitos. Durante la absorción de lípidos las partículas son mayores en diámetro [66, 67] en comparación con el período de ayunas, durante el cual predominarán las partículas de menor tamaño producidas por las células del intestino [67].

##### 1.3.1.1 Metabolismo de los quilomicrones

###### *a) Absorción de los lípidos*

La mayoría de los lípidos que son ingeridos en la dieta lo son en forma de TG, que constituyen más del 90% de la ingesta diaria de lípidos. El resto está formado por FL, colesterol, EC, ácidos grasos (AG) libres y vitaminas liposolubles A, D, E y K.

La eficiencia de absorción de las grasas es muy elevada. Bajo condiciones normales, prácticamente el total de las grasas ingeridas es absorbida, y menos de un 5% es expulsado con las heces. Los lípidos sufren previamente un proceso de hidrolización antes de poder ser absorbidos por nuestro organismo, y este proceso principalmente tiene lugar en el estómago y la parte proximal del intestino delgado.

La digestión y absorción de los lípidos contenidos en los alimentos implica la función coordinada de varios órganos, comenzando en la boca. Al introducir los alimentos en la boca, la lipasa lingual inicia la hidrólisis de los TG, aunque los niveles de digestión son mínimos. Los AG liberados de esa primera hidrólisis estimulan la secreción de bilis y jugos pancreáticos. Posteriormente pasan al estómago, donde los lípidos son emulsionados y sufren una digestión parcial por lipasas digestivas antes de ser transferidos al duodeno y absorbidos a través del epitelio intestinal.

La digestión de los lípidos que comienza en el estómago requiere la implicación de varias lipasas ácidas, siendo la lipasa pancreática la principal, la cual tiene preferencia por los AG de cadena media (6-12 átomos de carbono), produciendo de su actividad AG libres y  $\beta$ -monoacilglicéridos. El jugo pancreático contiene también lipasas estererasas que actúan sobre TG con AG de cadena corta, EC, y monoglicéridos, sin necesidad de que haya sales biliares presentes. Los FL son hidrolizados por fosfolipasas específicas, especialmente por la fosfolipasa A2.

El ratio de absorción de AG depende de su longitud de cadena. Los AG de cadena corta (<6 átomos de carbono) se comportan como simples carbohidratos; y los AG de cadena media son rápidamente absorbidos y transportados mediante su unión a albúmina directamente al hígado por la vena portal sin ser modificados. Debido al poco tiempo necesario para ser absorbidos por el intestino, los AG de cadena media son empleados como fuente de energía inmediata sin ser almacenados en el tejido adiposo, aunque proporcionan menor energía que los AG de cadena larga (>de 12 átomos de carbono ).

En el duodeno, los ácidos biliares con propiedades detergentes, emulsionan los lípidos haciéndoles mejores substratos para su hidrólisis por la acción de varias lipasas localizadas en el lumen del intestino. Con dicho propósito, las sales biliares solubilizan los lípidos y forman agregados de pequeño tamaño (40-600  $\mu\text{m}$ ), denominados micelas [68]. La incorporación de los lípidos a las micelas se hace orientando los enlaces éster de los lípidos hacia la superficie, que son los más susceptibles a la digestión por las lipasas pancreáticas, las cuales se encuentran en solución acuosa [68]. Una vez que las micelas se encuentran en las microvellosidades intestinales, los

productos de la digestión de los lípidos atraviesan fácilmente la membrana apical del enterocito por difusión pasiva [69] o activamente a través de mecanismos de transporte mediado por proteínas para incorporar AG libres y monoglicéridos al citosol del enterocito. Las principales proteínas transportadoras que han demostrado estar implicadas en la incorporación de AG libres son CD36 y varias proteínas de unión y transportadoras de AG [70]. Los AG de cadena larga contenidos en las micelas, se unen específicamente a la proteína de unión de AG intestinal citosólica (I-FABP) y difunden a través de la membrana plasmática de las células del epitelio intestinal (enterocitos). Tras su entrada en las células, los AG libres son transportados por proteínas de unión a AG a varios orgánulos para su procesamiento.

#### *b) Ensamblaje de los quilomicrones y su secreción*

Los enterocitos son los encargados de regular activamente la liberación de los lípidos procedentes de la dieta, que han sido absorbidos y almacenados [71]. Un paso importante previo a su secreción es su transporte al retículo endoplasmático (RE) [70], donde sufrirán modificaciones para sintetizar de nuevo TG, FL y EC. En el RE los monoglicéridos son esterificados con AG libres por el enzima monoacilglicerol aciltransferasa para formar diacilglicéridos, que a su vez son convertidos a TG por diacilglicerol aciltransferasas. Los diacilgliceroles pueden también ser combinados con colina y etanolamina por acción de las enzimas colina y etanolamina transferasas para sintetizar FL, y el colesterol libre incorporado por los enterocitos es esterificado en el RE por acil-CoA:colesterol aciltransferas que se encuentran unidas a la membrana.

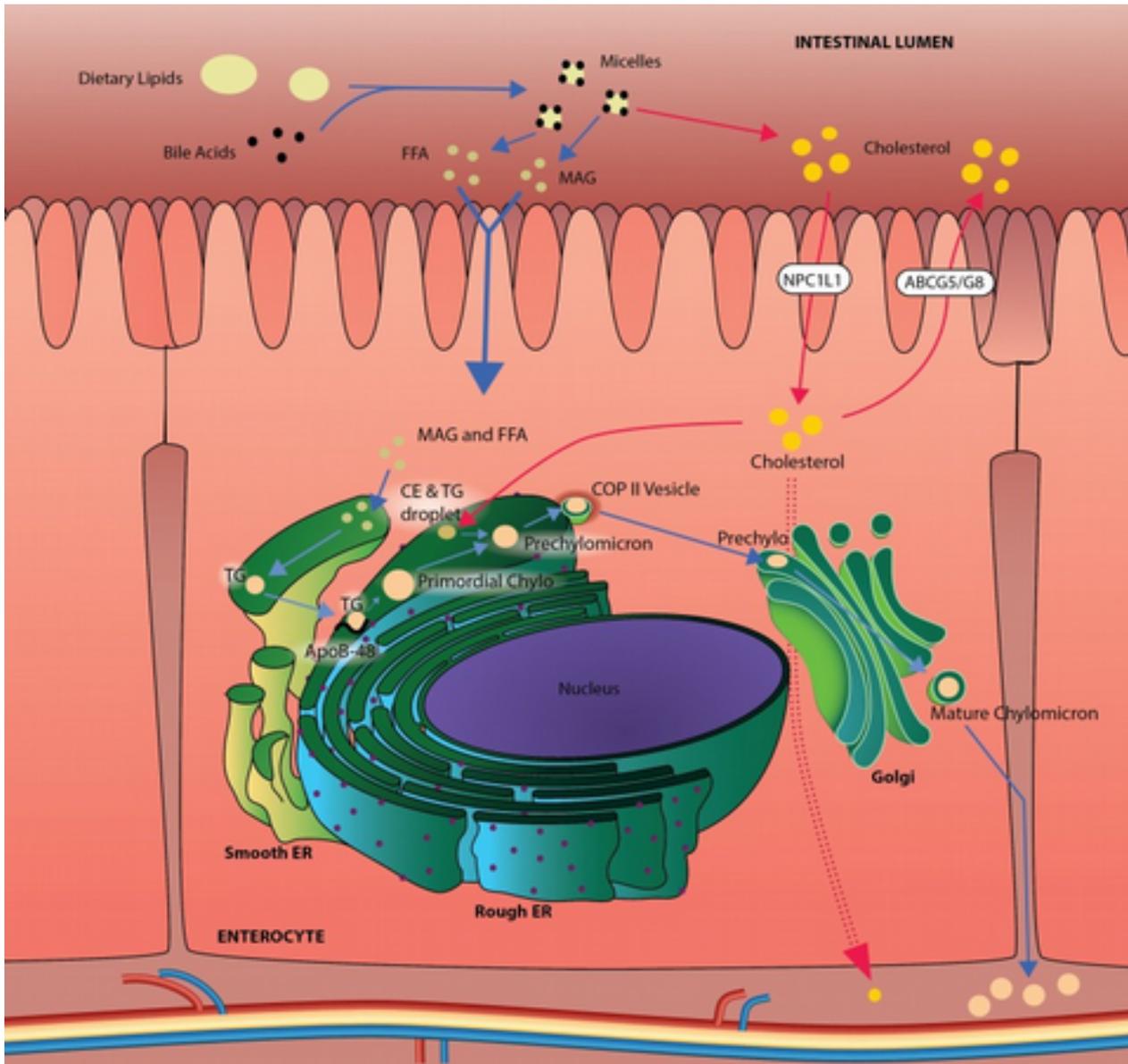
Los TG, FL y EC sintetizados en el RE forman grandes gotículas de lípidos, cuyo núcleo lipídico está constituido por TG y EC, y rodeado por una monocapa de FL y proteínas, la mayoría de ellas pertenecientes a la familia de las perilipinas. En caso de exceso de AG o colesterol en circulación, el enterocito puede almacenar el exceso de lípidos en sus formas esterificadas en forma de estas gotículas, y las acumula orientadas hacia el lado apical en el citosol, proporcionando un almacenaje transitorio de lípidos que optimiza la absorción de lípidos durante el consumo de alimentos y proporciona un aporte de lípidos sostenido durante el ayuno. En condiciones normales, estas gotículas de lípidos pasan a ser ensambladas y forman lipoproteínas.

La figura 4 representa el complejo ensamblaje de los QM. Cada partícula contiene una sola apo B-48 y el ensamblaje comienza con la síntesis de esta proteína en el RE del enterocito. Según la apo B-48 se va translocando a través del RE, ésta es lipidada con las gotículas de lípidos

sintetizadas en el RE, formando una partícula densa con un núcleo enriquecido en TG y EC, y una superficie cubierta por una monocapa de FL, colesterol libre y apo B-48. Este ensamblaje requiere la presencia de la proteína microsomal de transferencia de TG (MTP) [72]. En ausencia de suficientes lípidos, o si la MTP está dañada, la apo B-48 será degradada por el proteosoma [73].

El tamaño de los QM nacientes depende, en parte, del tamaño de las gotículas lipídicas que se fusionan en el RE para formar la lipoproteína en el interior del enterocito. Asimismo, el tamaño y la composición de las gotículas grasas depende de la composición de la dieta [74].

Tras la formación de la partícula naciente de QM, ésta expande su tamaño por adquisición de más TG y EC, que son adquiridos por fusión en el RE con otras partículas que no contienen apo B-48, y que son ricas en TG y EC. La partícula resultante es un pre-quilomión. Estas partículas pueden contener además múltiples copias de otras apolipoproteínas más pequeñas como apo A-IV y apo C-III. A continuación, los pre-quilomiones son transferidos a la cara cis del aparato de Golgi a través de vesículas especializadas que contienen proteínas específicas necesarias para su transporte. La maduración de la partícula en el aparato de Golgi incluye glicosilaciones de la apo B-48, y la adición de apo A-I sintetizada en el enterocito, a la superficie de la partícula [70, 71]. Después de este proceso, el QM maduro es empaquetado en vesículas secretoras derivadas del aparato de Golgi y transportadas a la superficie basolateral. Desde allí serán exocitadas al sistema linfático mesentérico, desde donde pasarán finalmente al torrente sanguíneo donde contribuirán a la concentración de TG postprandial [75, 76].



**Figura 4. Ensamblaje y secreción de los quilomicrones.** En el lumen intestinal, los TG de la dieta son emulsificados por las sales biliares para su absorción, y las lipasas digieren los TG a AG libres (FFA) y monoglicéridos (MAG). Éstos son absorbidos por el enterocito y serán empleados para la síntesis de TG, FL, y EC. La mayoría de los TG sintetizados son empaquetados junto con FL, colesterol y proteínas en quilomicrones (QM), que son secretados a través de la superficie basolateral del enterocito y entran en el sistema linfático. El ensamblaje del QM comienza en el retículo endoplasmático (RE). Durante la síntesis de la apo B-48, la proteína adquiere FL de la membrana del RE y también colesterol y TG para formar el QM primordial. Una adquisición continuada de TG y EC y proteínas más pequeñas transferibles (apo A-IV y apo C-III) en el RE incrementa el tamaño de la partícula, formándose el pre-quilomión. Éste es transportado al aparato de Golgi en vesículas especializadas, donde maduran a quilomicrones tras la glicosilación de la apo B-48, y la adquisición adicional de proteínas (apo A-I) y lípidos. Vesículas secretoras formadas del Golgi transportan los QM maduros a la superficie basolateral del enterocito. La fusión de la membrana de las vesículas secretoras con la membrana plasmática libera el QM al espacio extracelular y, posteriormente, pasa al sistema linfático [18].

### *c) Liberación de los quilomicrones a la circulación sanguínea*

Ya en circulación, los QM sufren numerosos cambios, siendo el primero de ellos la adquisición de las apolipoproteínas C y E a partir de las HDL plasmáticas mediante su intercambio con FL.

La utilización de los TG plasmáticos transportados por las TRL, en este caso de los QM, a lo largo de su recorrido por el torrente sanguíneo, es dependiente de la LPL [77]. Esta enzima cataliza la hidrólisis de TG del núcleo de las TRL, liberando AG que los tejidos pueden incorporar para generar energía, sintetizar lípidos de membrana, o almacenarlos como gotículas de lípidos [78, 79].

#### -La importancia de la LPL en el metabolismo de las TRL

La lipoprotein lipasa (LPL) se expresa especialmente en órganos con elevada demanda de AG libres como corazón, músculo esquelético y tejido adiposo [80]. Una vez producida, la proteína GPIHBP1 se une a la LPL en el espacio subendotelial y la transporta al lumen capilar, donde puede interactuar con las TRL [81] quedando allí inmovilizada. Recientemente se ha demostrado que la formación del complejo LPL-GPIHBP1 en las células endoteliales es crucial para la retención de las TRL en el lado luminal del endotelio capilar [82]. La LPL luminal es la considerada LPL funcional, ya que representa la porción de LPL que se encuentra activamente involucrada en la hidrólisis de TG plasmáticos [77]. En las lesiones ateroscleróticas, la LPL también es sintetizada por monocitos, macrófagos y células del músculo liso [83, 84], gracias a la cual los macrófagos tienen la capacidad de hidrolizar los TG contenidos en los QM e internalizarlos. Por este motivo la actividad de la LPL tiene un potente impacto en el desarrollo de células espumosas y en la aterogénesis.

A la LPL se le han asignado funciones antiaterogénicas, así como proaterogénicas. Por un lado, se ha demostrado que un incremento en su expresión induce elevados niveles de HDL, lo que contribuye a mejorar el perfil lipídico. Además, la sobreexpresión de LPL en el hígado es altamente efectiva para la normalización de los perfiles de lipoproteínas ateroscleróticas [85, 86]. Sin embargo, existen estudios que apoyan su potente papel proaterogénico [87]. La LPL puede inducir la retención y/o captación de lipoproteínas aterogénicas por las células de la pared arterial, contribuyendo por tanto en el proceso aterosclerótico [88]. Se ha demostrado también que LPL incrementa la retención de LDL y VLDL por parte de los proteoglicanos de la matriz subendotelial en la pared arterial [89] incrementa la permeabilidad del endotelio mediante la formación de productos lipolíticos [90] y facilita la adhesión de monocitos actuando como puente entre los proteoglicanos presentes en la superficie de los monocitos y el endotelio [91].

### -Regulación fisiológica de la actividad de la LPL

Puesto que la LPL es un determinante crítico en la incorporación de TG por los tejidos, su actividad requiere estar cuidadosamente regulada con el fin de que exista un equilibrio entre el ratio de incorporación de AG derivados de los TG plasmáticos por los tejidos y su capacidad para disponer de los AG. Así pues, son múltiples los mecanismos que regulan su actividad, los cuales operan principalmente a nivel transcripcional y post-traduccionales. Sin embargo, la mayoría de la variación fisiológica en la actividad de la LPL parece estar dirigida por mecanismos post-traduccionales en los que están implicadas proteínas extracelulares [77].

Las proteínas responsables del control de la actividad de LPL pueden dividirse en dos grupos principales. El primero de ellos está formado por las apolipoproteínas apo C-I, C-II, C-III, apo A-V y apo E. El segundo grupo incluye varios miembros de la familia de las proteínas similares a la angiopoyetina (ANGPTLs), específicamente ANGPTL3, ANGPTL4 y ANGPTL8 [77].

Estudios recientes han indicado que ANGPTL4 es el mayor regulador fisiológico de la actividad de LPL [92, 93], pues ha mostrado regular fuertemente el metabolismo lipídico mediante la inhibición de la actividad de LPL [93, 94]. La LPL es catalíticamente activa como un dímero compuesto por dos subunidades de 55 kDa glicosiladas, conectadas entre sí mediante interacciones no covalentes [95]. El mecanismo a través del cual ANGPTL4 inhabilita a la enzima es por medio de la unión transitoria de su dominio ccd-ANGPTL4 localizado en el extremo N-terminal a la LPL. Dicha interacción resulta en la conversión de la enzima desde sus dímeros catalíticamente activos a su forma inactiva por la disociación de los dímeros a monómeros inactivos [96]. Varios estudios *in vivo* llevados a cabo con ratones de experimentación *Angptl4* deficientes mostraron un 65-90% menos de TG plasmáticos, así como niveles más bajos de VLDL en circulación y un incremento de la actividad de LPL [93, 94] lo que apoya el fuerte control que ejerce ANGPTL4 sobre la actividad hidrolítica de LPL.

#### *d) Los quilomicrones remanentes y su retirada de circulación por los hepatocitos*

Como consecuencia de la hidrólisis de TG presentes en el núcleo de los QM mediada por la LPL a su paso por los capilares sanguíneos, los QM ven reducido su tamaño considerablemente y la estructura de la partícula queda desestabilizada. Para recuperar de nuevo el equilibrio, los QM desprenden espontáneamente porciones de superficie que contienen FL, colesterol no esterificado y apolipoproteínas apo A y apo C, lo que constituye el origen de las HDL [32]. Las partículas

resultantes son los quilomicrones remanentes (QMr), partículas extremadamente aterogénicas dado su pequeño tamaño, gracias a lo cual no solo atraviesan la pared arterial, sino que también son retenidos en el espacio subendotelial, como ha sido demostrado en estudios recientes [97]. Además, están enriquecidas en colesterol. Aunque su núcleo con alto contenido en TG ha sido parcialmente eliminado por lipólisis, mantienen la mayoría de la masa de EC que contenía la partícula parental, además de apo B-48 y apo E [52].

Los QMr son reconducidos al hígado donde, bajo circunstancias normales, son internalizados rápidamente y retirados de la circulación por las células hepáticas, y son catabolizados (figura 5). En el proceso de internalización por hepatocitos participan múltiples receptores endocíticos, incluyendo el receptor LDL (LDLR) y LRP1, y HSPG [98, 99].

Una vez en el interior de las células hepáticas, los QMr son degradados por lipasas ácidas y proteasas, y los AG generados son oxidados y reconvertidos a TG que serán almacenados y secretados como VLDL [30] (figura 5).

Fallos en este proceso por defectos en las proteínas involucradas en la internalización de los QMr en los hepatocitos conduce a la acumulación de remanentes y, por tanto, a hiperlipidemias y otras complicaciones [100]. Durante el tiempo que pasan en circulación, las partículas de QM plasmáticas y QMr sirven de fuente natural no modificada de lípidos y vitaminas liposolubles para la nutrición de monocitos-macrófagos en estado normal. En situaciones patológicas en las que los QM persisten en ayunas, las TRL atraviesan el endotelio vascular, donde son reconocidas por los macrófagos e internalizadas, contribuyendo a la formación de células espumosas [52].

### **1.3.2 Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)**

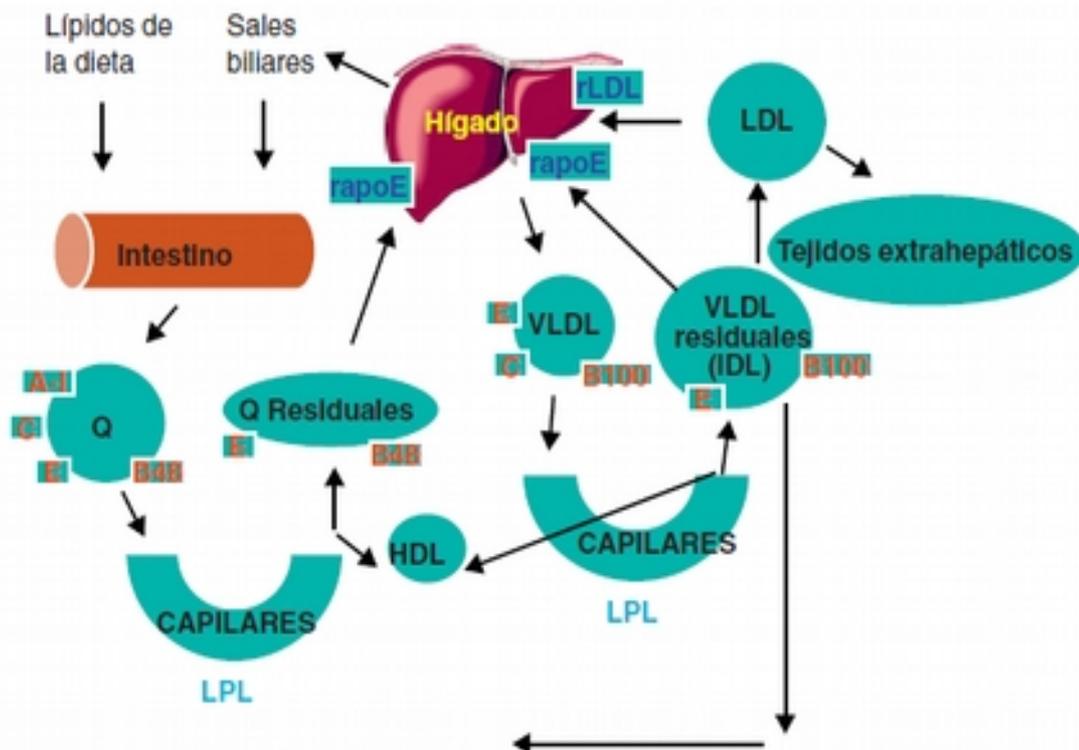
Las VLDL son lipoproteínas de gran tamaño sintetizadas en las células parenquimales del hígado cuya función principal es el transporte de TG hacia los tejidos extrahepáticos. Allí suministra AG a los tejidos muscular y adiposo, también a través de la acción de la LPL. Sus características y composición han sido previamente definidas en la tabla 1 y figura 3.

Los TG que constituyen el núcleo de las VLDL pueden proceder de lípidos previamente almacenados en el tejido adiposo y liberados como AG, de la conversión de carbohidratos a AG en el hígado, o de la hidrólisis de los TG contenidos en lipoproteínas en los endotelios capilares e hígado [30].

### 1.3.2.1 Metabolismo de las VLDL

Varias horas después de la ingesta de alimentos, cuando los niveles de QM en circulación se ven reducidos, los requerimientos de AG por parte de los tejidos periféricos se satisfacen gracias a las VLDL, que transportan los TG sintetizados en el hígado. La cantidad de VLDL secretada por el hígado es extremadamente variable y está determinada por diversos factores., como es el caso de flujo de AG al interior del hígado, además del número de insaturaciones presentes en la estructura de los AG. En el caso de haber un incremento en el flujo de AG, este órgano responde por medio de un aumento en la cantidad y tamaño de las VLDL sintetizadas. Así, si predominasen los AG saturados (SFA, saturated fatty acid) en las moléculas de TG, las partículas de VLDL serán más numerosas pero de un tamaño menor que si predominasen los AG poliinsaturados (PUFA, polyunsaturated fatty acids). Aunque existe evidencia de que el hígado sintetiza constitutivamente partículas VLDL durante el estado de ayunas y post-absorción [101], el principal estímulo para la síntesis de VLDL parece ser la captación y el catabolismo de los QMr por parte del hígado [32].

Las nuevas partículas de VLDL secretadas adquieren apo C y apo E de las HDL circulantes. Al igual que las partículas de QM, las VLDLs serán hidrolizadas a su paso por los capilares por la acción de la LPL, y los AG liberados serán captados por los tejidos (Figura 5). El resultado de esta actividad es la reducción del tamaño de las partículas con una relación más similar en su contenido en colesterol y TG. Esto incrementa la densidad de la partícula, dando lugar a las VLDL remanentes o IDL, que siguen en circulación. El catabolismo de las VLDL también constituye una de las vías de síntesis de las HDL ya que la apo C es transferida nuevamente a las HDL. Las VLDL remanentes (IDL) entran en el espacio de Disse del hígado para ser rápidamente eliminadas de la circulación vía receptores endocíticos. Allí, las IDL serán catabolizadas por la HL y la proteína de transferencia de esterios de colesterol (CETP), resultando en la formación de LDL [32] que son las lipoproteínas con mayor contenido de colesterol en plasma [63]. La permanencia de las LDL en el plasma es bastante elevada con respecto al resto de lipoproteínas, presentando una vida media de casi tres días, y sirven como fuente de colesterol para la mayoría de los tejidos mediante su unión a receptores específicos presentes en las membranas plasmáticas de las células diana de los tejidos periféricos [30]. Las LDL irán lentamente desapareciendo de la circulación en el hígado, siendo aproximadamente un 75% de las LDL retiradas por el hígado a través de interacciones de elevada afinidad con el receptor LDLR via apo B-100, que sirve de ligando (figura 5).



**Figura 5. Visión global del metabolismo de las lipoproteínas.** Síntesis exógena: Los quilomicrones (QM) son ensamblados en el los enterocito y liberados al sistema linfático. La LPL unida al endotelio capilar hidroliza los TG de los QM para generar QM remanentes (QMr) que son rápidamente retirados de circulación por el hígado. Síntesis endógena: Los lípidos intrahepáticos son reempaquetados y secretados como VLDL que son sustrato de la LPL entotelial. Los remanentes formados de la hidrólisis de las VLDL son también captados por el hígado o convertidos a LDL. El receptor LDL (LDLR) hepático es responsable de la retirada de LDL del plasma humano. Imagen de Errico et al. (2013) [102].

*-Transporte reverso del colesterol mediado por HDL*

El hígado es el único órgano con elevada capacidad de eliminación del colesterol, el cual es posteriormente secretado al intestino mediante su conversión a sales biliares y, finalmente excretado por las heces. Sin embargo, el colesterol que se acumula en el espacio subendotelial de la pared arterial también puede reducirse mediante su transferencia desde las células espumosas donde se acumula, a las partículas HDL maduras y su principal componente proteico, la apo A-I [103].

La apo A-I libre de lípidos se une a FL y colesterol libre de las membranas celulares de los hepatocitos, en un proceso mediado por el receptor celular de ATPasa ABCA1, siendo así transferido el exceso de colesterol libre de las células de los tejidos periféricos al hígado a través de HDL, que adquieren un mayor tamaño y menor densidad [18].

Las partículas HDL difunden al plasma, donde el colesterol libre es esterificado por la enzima LCAT que es sintetizada en el hígado y circula por el plasma en la superficie de las lipoproteínas, principalmente HDL [104]. El colesterol esterificado resultante es internalizado por los hepatocitos a través de receptores que reconocen HDL, como el receptor scavenger B1 (SRB1) [105]. A lo largo de su recorrido desde los tejidos periféricos al hígado, algunos EC son transferidos desde las partículas HDL a LDL, VLDL o QM mediante un intercambio con TG y FL [103]. Esta transferencia de TG está mediada por la CETP y la de FL por la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) [103].

Debido a la función de HDL en el transporte reverso de colesterol, elevados niveles en circulación de esta lipoproteína se relacionan con propiedades de ateroprotección. Entre sus acciones principales están la estimulación de la salida de colesterol de las células espumosas, además de prevenir la activación del endotelio. Esto último es posible gracias a que potencian la producción de óxido nítrico, el cual es necesario para mantener la integridad de la barrera endotelial [106].

#### **1. 4 Vías de incorporación de TRL en los macrófagos**

La presencia de macrófagos con elevada carga de lípidos en su interior es el distintivo de las lesiones ateroscleróticas, y comprender las vías responsables de la acumulación de lípidos en los macrófagos es de especial importancia en el proceso aterosclerótico.

Investigaciones realizadas con modelos animales hiperlipidémicos que no expresan los genes que codifican los receptores de superficie en macrófagos, mostraron una considerable reducción en el tamaño de las lesiones aterogénicas y acumulación lipídica arterial [107, 108]. En base a ello, se estableció que la vía de internalización de lipoproteínas mediada por receptores celulares de elevada afinidad es un requisito en la patología de la aterosclerosis y que constituye la mayor vía de formación de células espumosas *in vivo*.

Sin embargo, existen evidencias considerables que muestran que la internalización de lípidos procedentes de lipoproteínas en macrófagos puede realizarse a través de otras vías alternativas independientes de receptores específicos de superficie como son el mecanismo de internalización fagocítico, patocítico o pinocítico [109]. De hecho, en circunstancias en las que la

concentración de lipoproteínas presentes en la íntima excede la concentración de lipoproteínas aterogénicas provocando la saturación de las vías de internalización de lípidos vía receptores, estos mecanismos adquieren incluso mayor importancia.[110].

Es importante señalar que la LPL expresada por los macrófagos en su superficie desempeña un papel importante en la retención de lipoproteínas en la superficie de los macrófagos ya que sirve de puente para la unión de entre lipoproteínas y proteoglicanos, facilitando la disponibilidad de las lipoproteínas para que interaccionen con sus correspondientes receptores[111].

A continuación, nos centramos en las vías de internalización de lípidos por los receptores celulares de superficie. Se diferencian dos grandes grupos de receptores: los que dependen de la presencia de apo E en la partícula de las lipoproteínas como ligando con el receptor; y los que son independientes de apoE y presentan afinidad por un amplio número de ligandos.

#### **1.4.1 Endocitosis mediada por receptores celulares de superficie de macrófagos dependientes de apolipoproteína E.**

El receptor LDLR constituye el miembro fundador de una clase entera de receptores transmembrana relacionados. Entre los receptores miembros de este grupo con los que LDLR muestra mayor homología destacan: el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR), y la proteína-1 relacionada con el receptor LDL (LRP-1).

Estos receptores combinan tres tipos de módulos extracelulares en diferentes reorganizaciones para llevar a cabo un amplio rango de funciones fisiológicas, tanto de transporte de proteínas, como de receptores y co-receptores en cascadas de transducción de señales. Los tres módulos extracelulares son repeticiones ricas en cisteína que contribuyen a la unión de la mayoría de los ligandos y facilitan la posterior liberación de la lipoproteína [112].

El LDLR es la proteína responsable en mayor medida de la internalización de partículas transportadoras de colesterol al interior celular. La mayoría del colesterol plasmático en circulación en humanos se encuentra en la forma de partículas de LDL [113]. La expresión de este receptor en la superficie celular de los macrófagos está inversamente regulada por la concentración intracelular de colesterol [114], por lo que en presencia de concentraciones muy elevadas de lipoproteínas ricas en colesterol se satura.

Cada miembro de la familia de receptores LDLR contribuye a la incorporación de lipoproteínas por macrófagos de forma diferente, siendo LDLR específico de lipoproteínas que contienen apo B-100, mientras que LRP-1 y VLDLR son dependientes de la presencia de apo E en las partículas. Las TRL son lipoproteínas con un elevado contenido de apo E, y son principalmente reconocidas e incorporadas por LRP-1 y VLDLR [115]. Con las TRL remanentes ocurre lo mismo [115], pues los QMr, partículas también muy enriquecidas en apo E, se unen con alta afinidad a LRP-1 y VLDLR [116, 117]. Además, los macrófagos producen apo E, lo que potencia aún más la unión de los QMr a los macrófagos, y la LPL sintetizada por los macrófagos acelera su incorporación y metabolismo. Sin embargo, ha quedado demostrado que, en células que no expresan el receptor LDLR, la incorporación de QMr no se ve alterada, y que las partículas siguen siendo internalizadas mediante otras vías independientes a la familia de receptor LDLR [118, 119].

#### **1.4.2 Endocitosis mediada por receptores celulares de superficie de macrófagos independientes de apolipoproteína E.**

Los receptores Scavenger (SR) tienen una elevada influencia en el desarrollo y estabilidad de la placa aterosclerótica ya que representan una de las vías con mayor afinidad para la internalización tanto de lipoproteínas modificadas como nativas en los macrófagos [120]. Igualmente, se caracterizan por reconocer un amplio repertorio de macromoléculas con carga negativa como ligandos, no únicamente lipoproteínas. Así pues, su función de transporte de lípidos y colesterol dentro y fuera de las células es importante en el desarrollo de la lesión [121] y constituyen un determinante crítico de la activación del fenotipo proinflamatorio en los macrófagos localizados en la lesión aterosclerótica [26].

Hasta la fecha, numerosos estudios respaldan el papel que los SR de clase A (SRA), SRA1 y SRA2, y dos miembros de la clase B, CD36 y SRB1 ejercen en el desarrollo de la lesión aterosclerótica [120, 122].

- SR de Clase A. Los SR clasificados dentro de esta familia son receptores transmembrana tipo I expresados en macrófagos [123], que incluye 5 miembros: SRA1, SRA2, SRA3, con un dominio común rico en cisteína; MARCO y SR con lectina tipo C, que carecen de él [26, 124]. SRA3 queda retenido en el retículo endoplasmático y no es accesible a los ligandos extracelulares, de modo que su importancia funcional no está clara [125].

**SRA1 y SRA2** se expresan en la superficie celular de macrófagos, incluyendo células espumosas presentes en la placa aterosclerótica [126] y son responsables de aproximadamente el 80% de la incorporación de LDL modificadas en el interior celular de los macrófagos, tanto acetiladas como oxidadas [127, 128].

A pesar de su colaboración en la formación de células espumosas, varios estudios han sugerido que al mismo ejercen funciones de protección. En estudios desarrollados con modelos animales, se ha visto que la expresión de SRA es mayor en animales con poca respuesta aterosclerótica [129]. También se ha detectado que la sobreexpresión de un dominio extracelular de SRA humano reduce en un 20% la adherencia de monocitos/macrófagos a las células endoteliales y lesiones ateroscleróticas de la aorta en ratones que no expresaban LDLR, retardando el desarrollo temprano de lesiones ateroscleróticas. En lesiones avanzadas, donde la muerte celular de macrófagos desencadena la formación del núcleo necrótico y la desestabilización de la placa, los SRA han demostrado además jugar un papel importante tanto en la inducción de la apoptosis como en el aclaramiento de estas células muertas [26].

- SR de Clase B. Esta familia de receptores scavenger incluye a los receptores SRB1, SRB2, y CD36.

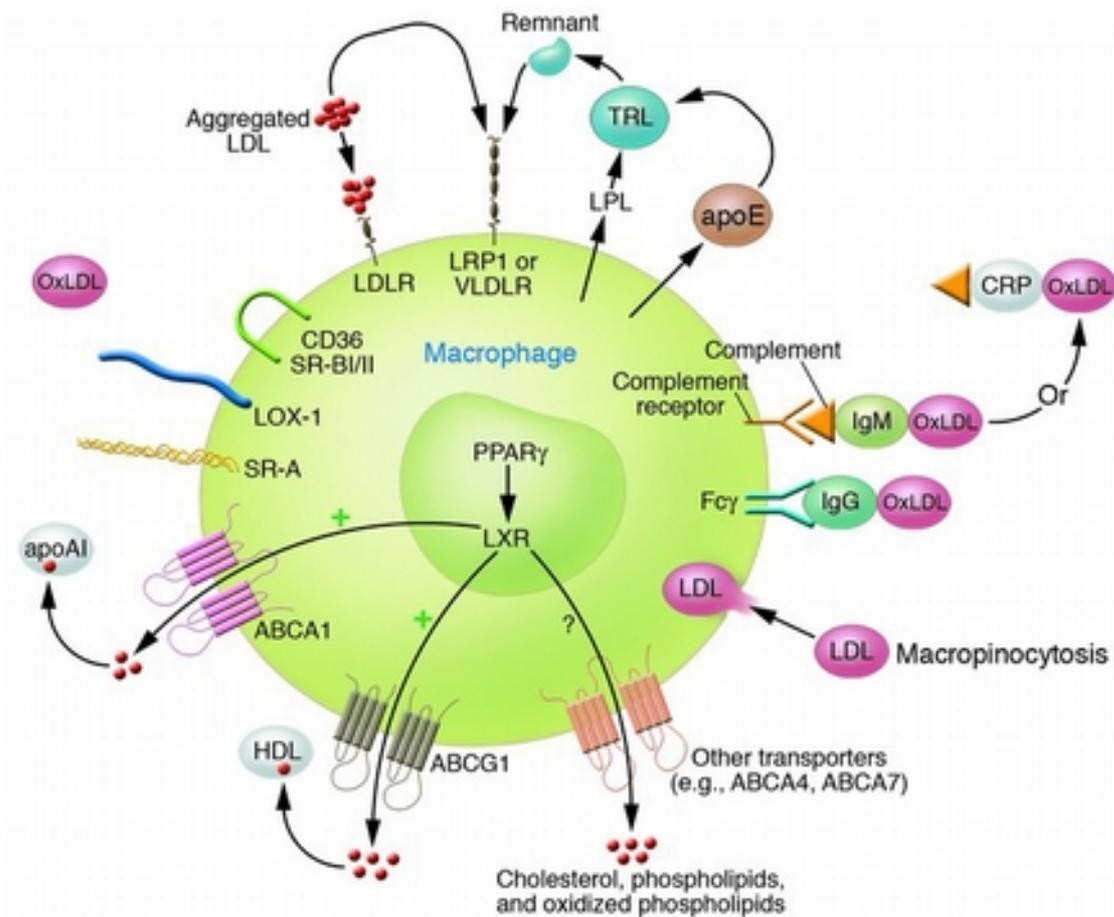
**CD36** es un receptor tipo III con múltiples dominios transmembrana que atraviesa la membrana dos veces para formar un loop extracelular altamente glicosilado con 2 colas cortas intracelulares [130]. Presenta una gran homología con SRB1, pero desempeñan distintas funciones en el metabolismo lipídico y en el desarrollo de la aterosclerosis.

CD36 es el receptor más importante entre los SR y entre los ligandos que une se incluyen oxLDL, células apoptóticas, y productos finales de glicosilación. La participación de CD36 en la progresión de la aterosclerosis es algo controvertida. Se ha visto que CD36 participa en la acumulación intracelular lipídica en macrófagos *in vitro* [128], y la delección de CD36 en monocitos *in vivo* parece además reducir la aterogénesis [131]. Sin embargo, en otros estudios con ratones hiperlipidémicos que no expresan apo E, se ha observado un importante incremento del tamaño de las lesiones ateroscleróticas si la vía de incorporación mediada por el receptor CD36 se inactivaba [132].

Además de mediar incorporación lipídica, CD36 puede estimular la señalización

proinflamatoria desencadenando una inflamación crónica en la pared arterial. No obstante, las vías que se activan a consecuencia de la unión de CD36 a lipoproteínas modificadas aún no están definidas.

**SRB1** se descubrió por su homología con CD36, con el que comparte el 30% de su secuencia de aminoácidos y, al igual que CD36, SRB1 puede unir tanto formas modificadas de LDL como lipoproteínas nativas HDL, LDL, y VLDL [133, 134]. SRB1 está altamente expresado en hígado y macrófagos y, dependiendo del contexto, también puede desarrollar funciones antiaterogénicas o proaterogénicas. Por un lado, participa en el transporte reverso del colesterol a través de dos mecanismos: a) participa en el transporte de colesterol de las células a HDL, y b) facilita la liberación selectiva del colesterol desde HDL al hígado para su excreción en forma de bilis y heces [134]. En contra, también se ha detectado que en lesiones tempranas, parece promover la formación de la estría grasa ya que contribuye a incorporar lipoproteínas en el interior de los macrófagos [135].



**Figura 6. Mecanismos de internalización de las TRL en macrófagos.** Las TRL son incorporadas en macrófagos a través de la vía mediada por receptores celulares de superficie y por rutas independientes de los receptores celulares como macropinocitos y fagocitosis de partículas agregadas. La internalización de las TRL a través de LDLR, VLDLR y LRP-1 es apo E-dependiente. Una proporción menor de TRL es incorporada también por los receptores scavenger (SR), entre los que se incluyen SRA2, SRB1 y CD36. Estos son apo E-independientes.

## **1.5 Propiedades aterogénicas de las partículas TRL**

En los últimos 50 años, han comenzado a cobrar especial interés las características y propiedades de las TRL debido a su participación en la trigliceridemia postprandial y en los procesos aterogénicos [136].

Hasta hace relativamente poco, las LDL eran reconocidas como las lipoproteínas más aterogénicas y primera diana en el desarrollo de terapias [137]. No obstante, estudios recientes indican que las TRL son igual o incluso más aterogénicas que las LDL [138].

Una de las características que más controversia generaba con respecto a la aterogenicidad de las TRL es su tamaño de partícula. Se había asumido que las lipoproteínas de mayor tamaño (QM y VLDL) eran incapaces de penetrar la capa íntima de las arterias y estar disponibles para su internalización por los macrófagos en el espacio sub-endotelial, a menos que llegaran a ser más pequeñas tras su hidrólisis [139]. Sin embargo, además de la demostrada presencia de VLDL, IDL y LDL en los tejidos ateroscleróticos [140], existe evidencia de que los QM también son capaces de infiltrarse hasta la íntima, acumularse en las células del músculo liso [141,142], atraer monocitos y ser internalizados por ellos, además de estimular la activación de la producción de marcadores de inflamación e inducir estrés oxidativo [143].

Por otro lado, a diferencia de las partículas LDL que precisan de modificaciones químicas u oxidación para ser internalizados en los macrófagos y formar células espumosas [144], las TRL no necesitan ser modificadas para ser identificadas por los receptores de superficie celular de los macrófagos e incorporar en su interior los lípidos que contienen [145]. Este factor hace que las TRL sean más aterogénicas que las LDL.

Además, es necesario prestar especial atención a las partículas remanentes de TRL dadas las características pro-aterogénicas que exhiben. Las TRL remanentes son partículas más pequeñas y densas que sus precursoras (QM y VLDL), pueden penetrar la pared arterial a través de una transcitosis mediada sin receptores, regulada por el gradiente de concentración entre el lumen del vaso y la íntima, y posteriormente ser retenidas en el espacio subendotelial [33].

Las TRL pueden a su vez agravar la aterosclerosis por medio de varias vías. Una de ellas es a través de la apo C-III contenida en las VLDL y sus remanentes. Dado que apo C-III tiene la

capacidad de inhibir la acción de la LPL, inhibe por tanto la incorporación de los remanentes al hígado, promoviendo la retención arterial de VLDL y sus remanentes, haciéndolas más aterogénicas [146]

Por otro lado, la lipólisis de TRL produce AG libres y monoglicéridos. Estudios en cultivos celulares han demostrado que los AG de cadena larga, particularmente los SFA, son citotóxicos [147, 148] por lo que la presencia de lipólisis de TG de las TRL y sus remanentes en lesiones ateroscleróticas debido a la acción de la LPL secretada por los macrófagos incrementa los niveles de AG libres tóxicos. Este factor promueve la muerte celular y la inflamación, ambos atributos clave de la aterogénesis [149].

### **1.5.1 Las TRL en el periodo posprandial**

Los niveles de TRL se encuentran especialmente elevados en el periodo posprandial, y sus niveles pueden predecir el riesgo cardiovascular independientemente del nivel de otros lípidos [150, 151, 152].

Dado que los TG plasmáticos son principalmente transportados por TRL, sus niveles de concentración durante el periodo postprandial son considerados un marcador de TRL y de sus partículas remanentes. Tradicionalmente, la medición de los niveles de TG plasmáticos se realizaba en ayunas [153]. Sin embargo, varios son los motivos por los que los niveles séricos de TG postprandiales podrían resultar ser mejores predictores de eventos cardiovasculares en comparación con los medidos en ayunas [151, 152]. En primer lugar, los niveles de TG se incrementan significativamente tras la ingesta de alimentos durante el periodo posprandial, y la medición de TG en ayunas no capta con precisión el efecto de las TRL y las partículas remanentes sobre el perfil lipoproteico en el periodo postprandial. Varios estudios prospectivos y datos epidemiológicos sugieren que un metabolismo postprandial de TG alterado contribuye a la aterosclerosis, es un distintivo de pacientes con enfermedades coronarias establecidas y puede ayudar a predecir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [154, 155].

Además, en los países industrializados, las personas nos encontramos en estado de no ayunas/postprandial durante la mayor parte del día, aproximadamente 18 horas [156]. Puesto que el periodo postprandial se caracteriza por la circulación de lipoproteínas potencialmente aterogénicas

[155] estamos más expuestos a sufrir desórdenes en el metabolismo de TG provocados por una acumulación posprandial de TRL y, por tanto, de los niveles de TG plasmáticos, aumentando el riesgo de desarrollar ECV [157].

#### 1.5.1.1 Dislipemia posprandial

La dislipidemia está causada por un desorden en el metabolismo postprandial de los lípidos. Dislipidemia e inflamación son factores de riesgo para la aterosclerosis, y la interacción entre el metabolismo lipídico y la inflamación contribuye al inicio y progresión de la aterosclerosis, siendo la hiperlipemia (niveles de lípidos en circulación por encima de los límites normales) uno de los factores que mayor impacto tienen [158, 159].

La magnitud y duración de la lipemia postprandial está influenciada por numerosos procesos metabólicos, incluyendo el ratio de secreción de TG desde el intestino y el hígado, la actividad de los factores involucrados en el metabolismo de las TRL, como apo C-II, apo C-III, CETP y LPL, y el ratio de eliminación de TRL remanentes vía receptores [160]. En personas sanas, los niveles de TG en plasma alcanzan su pico máximo a las 2-4 horas tras la ingesta de una comida con contenido graso y tiende a volver a sus niveles normales a las 6-8 horas. Bajo condiciones patológicas, el pico máximo de lipemia postprandial es 2-3 veces más alto y prolongado, manteniéndose los niveles elevados de TG en plasma hasta las 10-12 horas [161]. A mayor magnitud y duración del incremento de TG posprandial, mayor es la exposición de la pared arterial a los lípidos postprandiales, y por tanto, el daño es más agresivo.

La presencia de elevados niveles de TG en circulación se denomina hipertrigliceridemia, y su prevalencia está en aumento mundialmente, particularmente en los países desarrollados. El incremento de esta situación coincide, en parte, con el incremento de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), aunque la relación de estas dos condiciones con hipertrigliceridemia es compleja [162]. Esta condición es generalmente el resultado del incremento de uno o más tipos de TRL (QM, VLDL, o sus remanentes) y numerosos estudios respaldan el hecho de que los individuos que presentan elevados niveles de TG plasmáticos tienen mayor riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares, particularmente aterosclerosis [163, 164].

La respuesta lipídica postprandial se ve influenciada por varios factores: patrones dietéticos

y composición de los alimentos, estilo de vida (fumador, sedentarismo), y condiciones fisiológicas (edad, género, menopausia) y patológicas (obesidad, síndrome metabólico, DMT2). Existen además factores genéticos que afectan a lipoproteínas y enzimas del metabolismo lipídico que pueden alterar la respuesta posprandial. No obstante, uno de los mayores contribuidores a la elevación de los TG plasmáticos a niveles patológicos es la dieta. Una dieta con alto contenido graso o alto índice glucémico y en la cual la ingesta de energía no está equilibrada con el uso energético, está asociada con hipertrigliceridemia. De hecho, la mala alimentación y la falta de ejercicio son considerados los mayores contribuidores al incremento de los niveles de TG plasmáticos en los países desarrollados. [165].

## 2. OBESIDAD COMO FACTOR DE RIESGO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (ECV).

### 2.1 La obesidad, un problema de salud pública

La obesidad es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” (2010). Esta patología es considerada la principal epidemia del siglo XXI [166] dado su elevado impacto en morbilidad, calidad de vida, costes en sanidad y su elevada prevalencia en numerosos países [167, 168]. La obesidad es considerada una enfermedad crónica [169]. La prevalencia de enfermedades crónicas incrementa con la edad, y se estima que antes del año 2030 constituirán el 70% de las enfermedades mundiales y serán responsables del 80% de muertes en todo el mundo [170]. Sin embargo, la obesidad no solo afecta a la población adulta, sino que cada vez hay un mayor número de niños y adolescentes que sufren un exceso de peso, lo que hace que ésta situación sea aún más preocupante.

En un estudio realizado por científicos de todo el mundo publicado en Lancet en el año 2014, se realizó un análisis sistemático de la enfermedad a nivel mundial y se estableció que entre los años 1980 y 2013, la obesidad ha sufrido un incremento del 27% en la población adulta y un 47.1% en adolescentes [169]. También se estimó que en el año 2010, el sobrepeso y la obesidad fueron la causa de 3.4 millones de muertes en todo el mundo, además de ser responsables de una pérdida del 4% de años de vida en individuos con obesidad severa [171]. En la actualidad, se calcula que casi el 30% de la población mundial es obesa y, si esta tendencia se mantiene, en el año 2030 la mitad de la población mundial adulta podría ser obesa, tal como alerta un informe desarrollado por el Instituto Global McKinsey [172].

Según este informe, la obesidad es uno de los tres mayores conflictos sociales creados por los seres humanos, y los costes globales que supone en los Sistemas de Salud Pública son mayores que los asociados al alcoholismo, y casi equivalentes al impacto global del tabaco o la violencia armada, guerra y terrorismo [172]. Por ello, reducir la obesidad se ha convertido en una de las mayores prioridades para la salud pública en muchos países en desarrollo, donde viven casi 2 de cada 3 personas obesas en el mundo [169]. Pues de hecho, se prevé que estos costes ascenderán más aún en los próximos años a medida que las enfermedades asociadas a la obesidad comiencen a manifestarse [173].

Muchos trabajos de investigación han demostrado la asociación entre la obesidad y el incremento de la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) [174, 175], además de otros factores de riesgo de ECV como la hipertensión, disfunción endotelial, resistencia a la insulina (RI), dislipidemia y diabetes, algunos tipos de cáncer, osteoartritis, litiasis biliar y problemas de salud mental. También se asocia directamente con una supervivencia reducida a cardiopatías en casos de sobrepeso extremo [176, 177].

De acuerdo con la OMS, España es uno de los países de la Unión Europea con mayor prevalencia de niños con sobrepeso y obesos, además de ser el país en donde esta condición se ha incrementado más substancialmente en los últimos años [178]. Puesto que la prevalencia de la obesidad en niños es el mayor determinante de la prevalencia de obesidad en adultos, el escenario en el cual se sitúa España no es nada alentador. Esta afirmación es respaldada por el International Obesity Task Force (IOTF), organismo que sitúa a España en el segundo puesto en la lista de países europeos con mayor prevalencia de niños con sobrepeso en Europa [179].

## **2.2 La patofisiología de la obesidad**

Desde el punto de vista bioquímico, la causa del sobrepeso- definida como aquellos sujetos con un índice de masa corporal (IMC)  $25-30 \text{ kg/m}^2$  y obesidad -definida como aquellos sujetos con un  $\text{IMC} >30 \text{ kg/m}^2$ - obedece a un desequilibrio crónico de energía, ya sea por una ingesta elevada o un gasto reducido o, peor aún, debido a la combinación de ambos [180].

La patofisiología de la obesidad involucra predominantemente AG y TG, más que colesterol unido a LDL (LDL-c). Un incremento en la concentración de AG libres en circulación refleja la incapacidad del tejido adiposo de almacenar el exceso de absorción de nutrientes [181] y está relacionado con el estado dislipidémico que caracteriza a la obesidad y síndrome metabólico [182]. Cuando la capacidad que tiene el tejido adiposo subcutáneo y visceral de almacenar lípidos está saturada debido al exceso de nutrientes durante largo tiempo y al desequilibrio en el gasto energético, se produce un incremento de los niveles de VLDL, TG, colesterol total en circulación, un incremento de partículas pequeñas LDL, y una reducción del nivel de HDL plasmático [183], originándose hipertrigliceridemia [181]. Esta situación conduce a que otros tejidos como el hígado, músculos, páncreas y corazón acumulen lípidos [184]. Estos órganos no son capaces de almacenar lípidos sin causar daño en sus funciones, y ello provoca casos como la sobreproducción hepática de VLDL, que parece ser el principal defecto en la obesidad. Esta lipotoxicidad contribuye a su vez a

la RI [182, 185] ya que, cuando los AG son internalizados por hepatocitos o miocitos, los AG libres pueden sufrir oxidación en el compartimento mitocondrial o ser almacenados como TG. Un exceso de estos lípidos sobrecarga las vías de oxidación y almacenaje en las células, conduciendo a la acumulación de AG intermedios, como digliceroles y ceramidas [185, 186]. Mediante la activación de varias vías enzimáticas en las que participan serina kinasas, incluyendo dos de las cascadas proinflamatorias más potentes (IKK, JNK), los metabolitos de diacilglicerol, ceramida, y otros AG pueden inhibir la función de la insulina [185] reduciendo la sensibilidad a la insulina o lo que es lo mismo, induciendo resistencia de los tejidos a la insulina.

### **2.2.1 Obesidad y la resistencia a la insulina**

La RI es considerada un factor de riesgo de ECV, y puede ser responsable de los posibles mecanismos que relacionan la obesidad con los desórdenes metabólicos y ECV, entre ellos dislipidemias, incremento en los niveles de AG libres, lipotoxicidad, inducción de respuesta inflamatoria y una secreción de adipocinas alterada [187].

La RI asociada con la obesidad puede alterar el metabolismo lipídico ya que puede desestabilizar la actividad del receptor LDLR, contribuyendo al retraso en la eliminación de partículas VLDL plasmáticas [188], y a la inhibición de la actividad de la LPL por acción de la apo C-III contenida en ellas [189]. Debido a la reducida eliminación de las TRL en circulación, la acumulación de algunas TRL induce la activación del endotelio vascular y de células inflamatorias a través de la acción de la apo C-III [190]. Por otro lado, la propia acumulación de TRL induce un incremento de síntesis de VLDL por parte del hígado. Defectos en la lipólisis de TRL conduce a su vez a una reducida concentración de HDL por una disminución en la transferencia de apolipoproteínas y FL desde las partículas de TRL a las HDL, reduciéndose el mecanismo de transporte reverso de colesterol.

Una pérdida de sensibilidad a la insulina también induce una fuerte respuesta inflamatoria. La RI en el hígado, músculos y tejido adiposo provoca una incapacidad de suprimir la producción de glucosa hepática, un desequilibrio en la internalización y oxidación de la glucosa, e incapacidad de suprimir la liberación de AG libres desde el tejido adiposo [187]. Los AG libres pueden a su vez unirse al receptor toll-like 4 (TLR4), presente en la superficie celular de adipocitos y macrófagos, constituyendo un importante desencadenante de la inmunidad innata ya que tras esta interacción, los miembros de la familia de receptores toll-like activan las vías de señalización de la proteína-1 activadora de la proteína kinasa y el factor nuclear kB (NfκB), iniciando una potente respuesta

inflamatoria [191].

### **2.2.2 Obesidad y síndrome metabólico**

El síndrome metabólico se caracteriza por un conjunto de desórdenes metabólicos que tienen lugar en un individuo, que incrementa el riesgo de desarrollo de ECV, DMT2, y cáncer. La Federación Internacional de Diabetes define el síndrome metabólico como aquella situación en la cual un individuo presenta tres o más de los siguientes factores de riesgo: niveles elevados de TG (mayor o igual a 150 mg/dl), niveles reducidos de HDL-C (menos de 40 mg/dl en hombres o menos de 50 mg/dl en mujeres), elevados niveles de glucosa en ayunas (mayor o igual de 100 mg/dl), hipertensión (mayor o igual a 130/85 mmHg), u obesidad (circunferencia de cintura mayor o igual a 102 cm en hombre y mayor o igual a 88 cm en mujeres) [192]. Se puede presentar de varias maneras, según la combinación de los diferentes componentes del síndrome metabólico, y aún no se ha esclarecido cómo comienza y cómo los distintos componentes están causalmente conectados entre ellos [182]. Además, están emergiendo nuevos factores de riesgo para el síndrome metabólico que incluyen un estado proinflamatorio y protrombótico [193].

Inicialmente se propuso como hipótesis que la resistencia a la insulina era el principal factor de riesgo para el síndrome metabólico [194], sin embargo, definiciones recientes proponen la obesidad abdominal como el factor de riesgo predominante subyacente [192, 193, 195, 196].

El estilo de vida occidental presenta características poco saludables [197]. Entre ellas se incluye el estrés, falta de actividad física que conducen a un equilibrio positivo de energía (exceso de ingesta energética y baja actividad física), consumo de dietas aterogénicas de elevado contenido graso y densidad energética, y al mismo tiempo alimentos pobres en micronutrientes, y una alteración cronobiológica [182]. Estos factores han provocado que este estilo de vida tan negativo adoptado por la sociedad haya degenerado en una creciente incidencia de obesidad y síndrome metabólico en la población a nivel mundial.

### **2.3 La inflamación crónica en la obesidad y el síndrome metabólico**

La obesidad, inicialmente considerada una enfermedad de almacenaje de lípidos debido a la lipotoxicidad generada que causa daño en los tejidos, hoy día es vista por muchos investigadores como un proceso inflamatorio crónico de baja grado. La inflamación es una respuesta fisiológica del organismo a un estímulo dañino, físico-químico o biológico caracterizada por la activación de la respuesta inmune innata y adaptativa [158, 198]. La respuesta proporcionada implica la acción coordinada de muchas células (leucocitos y macrófagos) y mediadores (quimioquinas, citoquinas, moléculas vasoactivas, eicosanoides, y productos de cascadas proteolíticas), y generalmente conduce al reestablecimiento de la homeostasis. El endotelio activado permite la extravasación de neutrófilos y componentes solubles al tejido, donde son activados y liberan agentes tóxicos y enzimas proteolíticas con el fin de eliminar el agente dañino. Si tiene éxito, la respuesta inflamatoria cesa y se procede a la reparación del tejido mediante la conversión de los mediadores lipídicos proinflamatorios a antiinflamatorios y pro-resolutivos (lipoxinas, resolvinas, y protectinas) [199]. Los leucocitos del tejido sufren apoptosis y son eliminados por fagocitosis por los macrófagos [200]. Éstos adquieren un fenotipo que conduce a la resolución de la inflamación a través de la liberación de señales antiinflamatorias como interleuquina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [201]. Sin embargo, si la neutralización y eliminación del estímulo dañino o la propia retirada de las células inflamatorias apoptóticas del tejido inflamado falla, el proceso inflamatorio persiste y se establece un estado de inflamación crónica. La condición de inflamación crónica se ha asociado con obesidad mórbida y se caracteriza por una activación continua del sistema de inmunidad innata [202].

El estado de inflamación que acompaña al síndrome metabólico no se presenta con infección o signos de autoinmunidad y no parece que tenga lugar un tejido masivamente dañado. De hecho, la dimensión de la activación de la respuesta inflamatoria no es grande, por ello se le suele denominar inflamación crónica de “bajo grado” [182], pero es su persistencia a lo largo del tiempo lo que ocasiona el daño en los tejidos.

Desde el punto de vista inmunológico, también se ha demostrado que la obesidad está ligada a un estado de inflamación crónica evidente. Se ha detectado que el tejido adiposo está infiltrado por células del sistema inmunitario, que también son fuente de citoquinas inflamatorias [203]. Además, cuando incrementa la adiposidad, el tejido adiposo estimula la producción por parte del endotelio vascular de agentes trombogénicos como el inhibidor del activador tisular del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y agentes trombolíticos como el activador tisular del plasminógeno (PA). También induce el aumento de la concentración plasmática de moléculas de adhesión de la

membrana endotelial: ICAM-1, VCAM-1 y la P-selectina, contribuyendo a un mayor reclutamiento de monocitos y mayor infiltración. Los monocitos infiltrados en el tejido adiposo se diferencian por acción del factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF, macrophage-colonies stimulator factor) derivado de adipocitos, conduciendo a una mayor acumulación de macrófagos en el tejido. La interacción entre adipocitos y macrófagos, a través de señales quimioquina/citoquina generadas, aumenta la reacción inflamatoria en el propio tejido adiposo, incrementando aún más los niveles en circulación de quimioquinas/citoquinas en obesidad [204].

## **2.4 Marcadores de inflamación como predictores de riesgo cardiovascular en la obesidad**

El interés por las características inflamatorias de la obesidad y por sus factores de riesgo asociados, se ha intensificado en los últimos años. Esto es debido a que la inflamación crónica asociada a la obesidad, que parece también estar implicada en la resistencia a la insulina y disfunción endotelial, proporciona una posible explicación a la estrecha relación existente entre la obesidad y la aterosclerosis, la cual es la mayor causa de ECV y mortalidad [205, 206]. La elevada síntesis y liberación de citoquinas pro-inflamatorias circulantes procedentes del hígado y tejido adiposo (adipoquinas) durante la respuesta inflamatoria crónica, a largo plazo induce la disfunción del endotelio vascular, un mecanismo patogénico predictor de la aterosclerosis y ECV [207].

Gran parte de las moléculas proinflamatorias liberadas proceden del tejido adiposo, por lo que ya no es considerado como un órgano pasivo de almacenaje de TG y fuente de liberación de AG libres. Los adipocitos maduros han sido reconocidos como células secretoras endocrinas que liberan un gran número de sustancias biológicamente activas como hormonas, citoquinas, y otros factores que participan en los mecanismos de la activación plaquetaria, hipertrofia del miocardio, progresión de la enfermedad cardiovascular) [207], y de la resistencia a la insulina [187].

### **2.4.1. La sensibilidad a la insulina como biomarcador de inflamación**

Dada la implicación de la acción de la insulina en el desarrollo de las ECV, mejoras en el nivel de sensibilidad a esta hormona implicarían una reducción de la respuesta inflamatoria y del riesgo de ECV. Se ha verificado que la pérdida de peso en pacientes obesos está asociada con una reducción de biomarcadores de inflamación [208, 209], entre ellos principalmente la RI [210, 211].

### **2.4.2 Citoquinas y adipoquinas como biomarcadores de inflamación**

Las citoquinas participan en la regulación de las funciones y metabolismo celular a través de una red de señales paracrinas, endocrinas y autocrinas, que modulan la biología de la célula.

La mayoría de adipoquinas se producen en elevadísimas cantidades con el aumento de la adiposidad, y no solo están relacionadas con la regulación del consumo de energía y la homeostasis del peso corporal, sino también tienen una estrecha asociación con las patologías relacionadas con la obesidad [212]. Por este motivo, las adipoquinas son importantes mediadores aterogénicos.

La sustanciosa evidencia que une inflamación, aterosclerosis, y obesidad apoya el uso de las citoquinas y adipoquinas como biomarcadores de inflamación como una forma de medir el riesgo existente en condiciones de obesidad ya que la expresión de éstos biomarcadores plasmáticos se ve alterada en persona obesas con respecto a individuos con peso normal, siendo así de gran utilidad para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades cardiovasculares.

#### 2.4.2.1 Biomarcadores analizados en el presente proyecto:

##### **•Factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria, implicada en las alteraciones metabólicas presentes en la inflamación crónica, patogénesis de la resistencia a la insulina, anorexia, y pérdida de peso en individuos con sobrepeso [213]. Varios estudios han mostrado que TNF- $\alpha$  regula el metabolismo de lípidos y glucosa en adipocitos ya que inhibe la internalización de los AG derivados de los TG de lipoproteínas [214], y estimula la expresión de la lipasa sensible a hormonas [215]. Las acciones metabólicas de TNF- $\alpha$  conducen al incremento de los niveles en circulación de AG libres y RI. Otros estudios han demostrado que el tratamiento crónico con TNF- $\alpha$  resulta en un importante desequilibrio de la señalización de insulina pues reduce los niveles de expresión del

transportador de glucosa sensible a la insulina-4 (GLUT4) y el sustrato-1 del receptor de la insulina (IRS-1), inhibe la fosforilación de la tirosina de IRS-1, y estimula la fosforilación de la serina de IRS-1 y la fosforilación específica del receptor de insulina [216].

Los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  se incrementan en el tejido adiposo con el aumento de la adiposidad, y se reducen con la pérdida de peso [217, 218]. TNF- $\alpha$  actúa como un potente inductor de otras adipoquinas proinflamatorias como interleuquina-6 (IL-6), MCP-1, leptina, y el inhibidor del activador de plasminógeno- 1 (PAI-1) [217]. A su vez, también inhibe la síntesis de adipoquinas antiinflamatorias como la adiponectina, ya que inhibe su expresión y secreción, aunque posiblemente sea debido por la estimulación de la producción de IL-6, que también inhibe la secreción de adiponectina [219, 220]. Este hecho explica la correlación negativa existente entre la adiposidad visceral y los niveles de adiponectina en la que TNF- $\alpha$  parece estar implicado.

#### •**Proteínas quimioatrayentes del monocito -1 (MCP-1)**

MCP-1 es una quimioquina inflamatoria, proteína especializada perteneciente a la familia de las citoquinas, producida predominantemente por macrófagos y células endoteliales. Recientes estudios han mostrado que los adipocitos también son fuente de quimioquinas específicas como MCP-1 [206]. MCP-1 es un potente factor quimiotáctico para monocitos [221], cuya principal función es su reclutamiento y adhesión al endotelio [222], por lo cual MCP-1 juega un papel importante en la aterogénesis. Varios ensayos realizados en ratones como modelo de estudio, han demostrado que la expresión de esta quimioquina proinflamatoria se ve incrementada en las lesiones ateroscleróticas [223], y la inhibición de su expresión o la de su receptor, el receptor de quimiocina CC-2 (CCR2), resulta en una reducción del tamaño de la lesión y del número de macrófagos en la lesión en ratones hiperlipidémicos que no expresan LDLR o apo E [224]. Además, los niveles de ARNm de MCP-1 se han visto hasta 7.2 veces más sobreexpresados en el tejido adiposo y plasma de ratones obesos con respecto a ratones de peso normal [225].

La acción de MCP-1 afecta a la sensibilidad a la insulina ya que reduce los niveles de captación de glucosa estimulados por la insulina, y también afecta a la expresión de genes adipogénicos como LPL, GLUT4, receptor  $\beta$ -3-adregénico y  $\gamma$ -PPAR [159]. Se ha visto que los niveles de expresión de estos genes se encuentran potencialmente elevados en pacientes con elevado riesgo cardiovascular [226], y más significativamente en personas con diabetes [227].

### •Interleuquina 1- $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

La presencia de IL-1 $\beta$  ha sido demostrada en lesiones ateroscleróticas, pues se trata de una citoquina producida por los macrófagos presentes en las lesiones y son de elevada importancia en el inicio y amplificación de la lesión [228]. IL-1 $\beta$  puede alterar la función de las células endoteliales [229], potenciar la mitogénesis de las células del músculo liso vasculares [230], y reclutar leucocitos al espacio subendotelial [231].

### •Adiponectina

La adiponectina es una adipoquina antiinflamatoria cuya función metabólica principal es la utilización de la glucosa y la oxidación de los AG. La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina mediante el incremento de la expresión del receptor de la insulina, y de su proteína adaptadora de señalización IRS-1 en el músculo esquelético [232]. Al igual que la leptina, es un regulador a largo plazo del apetito y del metabolismo lipídico [180]. La adiponectina ejerce importantes funciones frente al desarrollo de aterosclerosis gracias a sus propiedades antiaterogénicas, antidiabéticas y antiinflamatorias, pues tiene la capacidad de inhibir la actividad fagocítica y la producción de TNF- $\alpha$  de los macrófagos [180, 233]. Entre sus actividades, merece la pena destacar que es capaz de suprimir la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales vasculares, y modula la señalización del NF-kB [234]. Asimismo, reduce los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  por monocitos/macrófagos y reduce la expresión del gen que codifica los SRA en macrófagos. Debido a ello, el nivel de internalización de partículas LDL oxidadas y la formación de células espumosas se ve reducido de manera importante [235]. La adiponectina inhibe también la proliferación y migración de células del músculo liso [236]. Esto sugiere que esta adipoquina puede ser protectora frente a la aterogénesis mediante la inhibición de la acumulación de células espumosas derivadas de monocitos/macrófagos en la pared vascular.

Los niveles circulantes de adiponectina en el plasma se correlacionan inversamente con el IMC, estando así, a diferencia de otras adipoquinas, muy reducidos en condiciones de obesidad y DMT2, al igual que en enfermedades arteriales coronarias [237, 238].

-

## •Leptina

La leptina es una hormona cuyo nombre deriva del vocablo griego *leptos*, que significa “delgado”. Es una sustancia bioactiva que se produce tanto en los adipocitos como en el hipotálamo, ovarios y placenta [239, 240]. Esta hormona juega un importante papel en la regulación del consumo de energía a través del hipotálamo y en el incremento del gasto energético tanto por la inhibición de la lipogénesis como por la estimulación de la lipólisis en animales y humanos [241].

Esta hormona se encuentra en la circulación sistémica y su secreción es estimulada por la insulina, glucocorticoides y citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, y es inhibida por catecolaminas, testosterona y agonistas de PPAR- $\delta$  [242]. En las personas delgadas, cerca del 50% de la leptina está unida a proteínas, encontrándose a baja concentración en circulación, mientras que en las personas obesas, la mayoría se encuentra en su forma libre [239, 240, 243]. Dada la asociación existente entre los niveles en circulación de la leptina y la obesidad, esta citoquina parece ser útil en la predicción de la obesidad pues los niveles en circulación de la leptina son mayores cuanto mayor es la capa grasa subcutánea del individuo [244].

Entre las funciones más importantes de la leptina está la de inhibir el apetito, mediando el balance de energía al enviar información al cerebro acerca de la acumulación y agotamiento de los depósitos grasos [180], pero también es importante en la regulación de la respuesta inmune inflamatoria [245]. Varios estudios *in vitro* han demostrado que la leptina es capaz de unirse a su receptor expresado en las células del sistema inmune (linfocitos, células NK, monocitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y eosinófilos), y por consecuencia, ocurre la activación, proliferación, maduración y producción de mediadores inflamatorios [246]. La leptina puede potenciar a su vez la agregación plaquetaria y la trombosis arterial [247], promover angiogénesis, perjudicar la distensibilidad arterial, inducir la proliferación y migración de células vasculares del músculo liso [248] y parece ser un potenciador de la calcificación de células vasculares. Se considera que la leptina está asociada con la inflamación crónica de bajo nivel responsable de la progresión de la obesidad ya que induce producción de IL-6, la proteína C reactiva (PCR), y otras citoquinas como IL-10 [249] [250], además de participar en la RI y síndrome metabólico. Por estos motivos, se ha propuesto que existe una relación directa entre la hiperleptinemia y el incremento de ECV [247].

### •Proteína C reactiva (PCR)

La PCR es una proteína de fase aguda, producida principalmente por el hígado y participa de forma muy importante en la inmunidad innata. El nivel circulante de PCR se asocia al IMC, por lo que individuos obesos presentan mayores niveles de este marcador en comparación con individuos con peso normal [251]. Asimismo, se ha observado una disminución de PCR cuando se presenta una reducción de peso. Un estudio realizado por Trayhurn y Wood en 2004 encontró que el gen que codifica la PCR está expresado en el tejido adiposo, mostrando una aparente correlación directa entre los niveles de ARNm PCR y la adiposidad. Eso aumenta la posibilidad de que el tejido adiposo contribuya directamente al aumento de los niveles circulantes de la PCR [252].

La distribución de la grasa corporal también constituye un factor determinante de los niveles de PCR, independientemente del IMC. La relación cintura-cadera, que se utiliza clínicamente para evaluar la adiposidad visceral abdominal, se asocia positivamente con la PCR incluso después del ajuste por IMC [251]. Esta asociación apoya la hipótesis de que el aumento de la adiposidad, particularmente visceral, está relacionado con un estado de inflamación sistémica de bajo grado. Los niveles basales de PCR también correlacionan con el riesgo de DMT2 incidente, independientemente de la obesidad y otros determinantes de la diabetes [253]. Este hallazgo sugiere que, aunque la producción de PCR por el hígado se correlaciona fuertemente con la obesidad y con la secreción de IL-6 por el tejido adiposo [254], existen otros factores ambientales en los procesos inflamatorios que podrían contribuir a los niveles en sangre de PCR.

Esta proteína es útil como biomarcador de inflamación y es un fuerte predictor independiente de eventos cardiovasculares tanto en individuos aparentemente sanos como en aquellos con manifestaciones de enfermedad aterosclerótica [255]. La PCR es una de las sustancias presentes en las lesiones ateroscleróticas, más específicamente en la íntima vascular, donde co-localiza con monocitos, macrófagos derivados de monocitos y lipoproteínas. Se ha sugerido que contribuye directamente al proceso aterosclerótico [256] mediante su participación en procesos como la activación del complemento, apoptosis, activación de células vasculares, reclutamiento de monocitos, acumulación lipídica y trombosis [257]. Adicionalmente, los componentes del síndrome metabólico (obesidad central, concentraciones elevadas de TG plasmáticos, baja concentración de HDL-c plasmático, hipertensión, y elevados niveles de glucosa en sangre) correlacionan con elevada concentración de PCR en plasma [258].

## •Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Cp) es una proteína sintetizada por el hígado con un papel muy importante en la regulación de la obesidad e inflamación. Esta molécula es abundante en el plasma humano y está involucrada en el transporte del cobre por el organismo, coagulación, angiogénesis, protección contra el estrés oxidativos, y la homeostasis del hierro [259]. Numerosos estudios epidemiológicos han informado de la observación de elevados niveles de Cp en pacientes con desórdenes cardiovasculares como aterosclerosis, aneurisma aórtico abdominal, angina inestable, vasculitis, y enfermedad arterial periférica [260, 261]. La Cp es importante en el control de la oxidación de lípidos de membrana, probablemente por la oxidación directa de cationes, previniendo así su catálisis por peroxidación lipídica [262]. Kim et al. [263] demostraron en 2011 la asociación entre unos niveles elevados de Cp y la obesidad, aunque no identificaron el mecanismo que los relaciona. No obstante, afirmaron que es posible que esté involucrada en la vía de inflamación inducida por la obesidad. Estos autores mostraron que elevados niveles de Cp se correlacionaban también con los niveles de PCR y ambos se identificaron como un factor independiente que contribuye al incremento de la obesidad .

La Cp es sintetizada en el hígado durante el proceso de inflamación agudo [264] en respuesta a las citoquinas liberadas por parte de los tejidos dañados. Se especula que elevados niveles de Cp en plasma pueden indicar un estrés oxidativo anormalmente elevado entre sujetos obesos [261], siendo un potencial contribuyente de la aterogénesis y, por tanto, un útil marcador de riesgo cardiovascular [265, 266]. Además, el valor de Cp se ha propuesto como una medida predictiva para el síndrome metabólico en adolescentes [267].

### 3. LA DIETA COMO EL PRIMER FACTOR DE INTERVENCIÓN PARA LA PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES (ECV)

La relación entre dieta y ECV ha sido una de las áreas más activas de investigación en la epidemiología nutricional durante los últimos 50 años. A través de numerosos estudios, el contenido graso de los alimentos ha demostrado ser una pieza clave en la determinación de una salud óptima en el individuo, debido a su capacidad para influir sobre los factores de riesgo cardiovascular y los mecanismos relacionados con el establecimiento y progreso de las placas de ateroma. Por ese motivo, una dieta de calidad constituye uno de los pilares fundamentales en la prevención de las ECV y su tratamiento [268, 269, 270, 271].

No obstante, actualmente se está considerando el estudio del efecto de distintos patrones alimentarios como un todo, más que focalizarse en nutrientes y alimentos de forma individual. Se trata de un acercamiento más acertado para la medición del efecto preventivo frente a ECV, ya que éstos miden la interacción sinérgica de diferentes alimentos y nutrientes contenidos en la dieta. La elección de unos patrones alimentarios de calidad está emergiendo como un potente paradigma para dirigir nuestros hábitos alimentarios, pues ha quedado demostrado que las elecciones de la dieta y estilo de vida son responsables de hasta el 40% de muerte prematura por enfermedad cardiovascular [272].

Las recomendaciones dietéticas de reducir el consumo de alimentos con un elevado contenido graso e incrementar la ingesta de frutas, verduras, y productos de grano entero es el factor común de las guías nutricionales proporcionadas hoy día a la población. La extensa información aportada por estudios de intervención nutricional indica que a través de la dieta se pueden reducir significativamente los niveles de lípidos plasmáticos, uno de los mayores factores de riesgo de las ECV. En las últimas décadas, los trabajos experimentales de intervención dietética realizados están haciendo impresionantes progresos con respecto a esta cuestión, y han permitido entre otras cosas identificar la dieta Mediterránea como la dieta que podría proporcionar beneficios superiores a aquellos observados con la adherencia a otros patrones alimentarios [273].

### **3.1 La dieta mediterránea**

La dieta mediterránea es el resultado de la historia milenaria de la cuenca del Mediterráneo, transmitida de generación en generación, con una popularidad cada vez mayor a nivel mundial, e incluida por la UNESCO en la Lista Representativa de Patrimonio Cultural Intangible de la Humanidad en el año 2010 [274]. Sin embargo, definir la dieta mediterránea es una tarea compleja dada la amplia región geográfica que rodea el mar Mediterráneo, que incluye al menos 16 países con diferencias culturales, étnicas, religiosas, económicas y agrícolas que resultan en prácticas dietéticas diferentes. Aún así, existe un patrón dietético que es característico de estas regiones, el cual fue identificado por primera vez en los años 60 en Grecia, el sur de Italia, España y otros países de la cuenca del Mediterráneo. El factor común de estos países es el empleo de generosas cantidades de aceite de oliva como principal fuente de grasa, además de un elevado consumo de alimentos derivados de plantas (frutas, verduras, legumbres, frutos secos, semillas, y cereales de grano entero); una frecuente pero moderada ingesta de vino (especialmente vino tinto), normalmente con las comidas; un consumo moderado de pescado y marisco y productos lácteos (yogures y queso, pero no leche entera, mantequilla o nata), aves de corral y huevos; y un bajo consumo de dulces y carnes rojas y procesadas [275, 276, 277].

La dieta mediterránea no es solo unos patrones nutricionales determinados, existen otros aspectos no nutricionales ligados al estilo de vida de los países vinculados con este tipo de alimentación, que también contribuyen a sus efectos saludables. El consumo de productos frescos y locales, las actividades tradicionales culinarias, los aspectos socio-culturales y nutricionales de la región, junto con la práctica regular de actividad física, son partes fundamentales del modelo o estilo de vida Mediterráneo [274].

#### **3.1.1 El carácter cardioprotector de la dieta mediterránea**

Existen evidencias científicas suficientes que apoyan los beneficios aportados por la adherencia a los patrones alimentarios tradicionales de la dieta mediterránea (cantidades, proporciones, combinaciones o variedades de los diferentes alimentos y bebidas consumidos y la frecuencia con la que normalmente se consumen) frente a la mortalidad y los eventos clínicos cardiovasculares [278, 279, 280]. De hecho, en términos de reducción de la morbilidad por ECV, mortalidad y eventos clínicos, la dieta mediterránea es comparable con otras intervenciones farmacológicas como aspirina y estatinas; con la actividad física, e incluso con antihipertensivos

como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o  $\beta$ -bloqueantes [281].

Entre las propiedades beneficiosas asociadas a la adherencia a la dieta mediterránea destacan su carácter antioxidante, antiinflamatorio, antitrombótico y su capacidad para prevenir la peroxidación lipídica y para mejorar en perfil lipídico y la función endotelial. Estos efectos beneficiosos parecen ser proporcionados debido a la combinación sinérgica de un ratio equilibrado de los AG esenciales n-6 y n-3, con un alto contenido de ácido oleico (18:1 n-9), elevadas cantidades de fibra dietética y antioxidantes, como los polifenoles [274].

### 3.1.1.1 Antecedentes históricos de los beneficios aportados por la dieta mediterránea frente a las ECV

Muchos son los trabajos científicos que han sido desarrollados a fin de estudiar el efecto protector que confieren los patrones de la dieta mediterránea frente a los factores de riesgo asociados a las ECV.

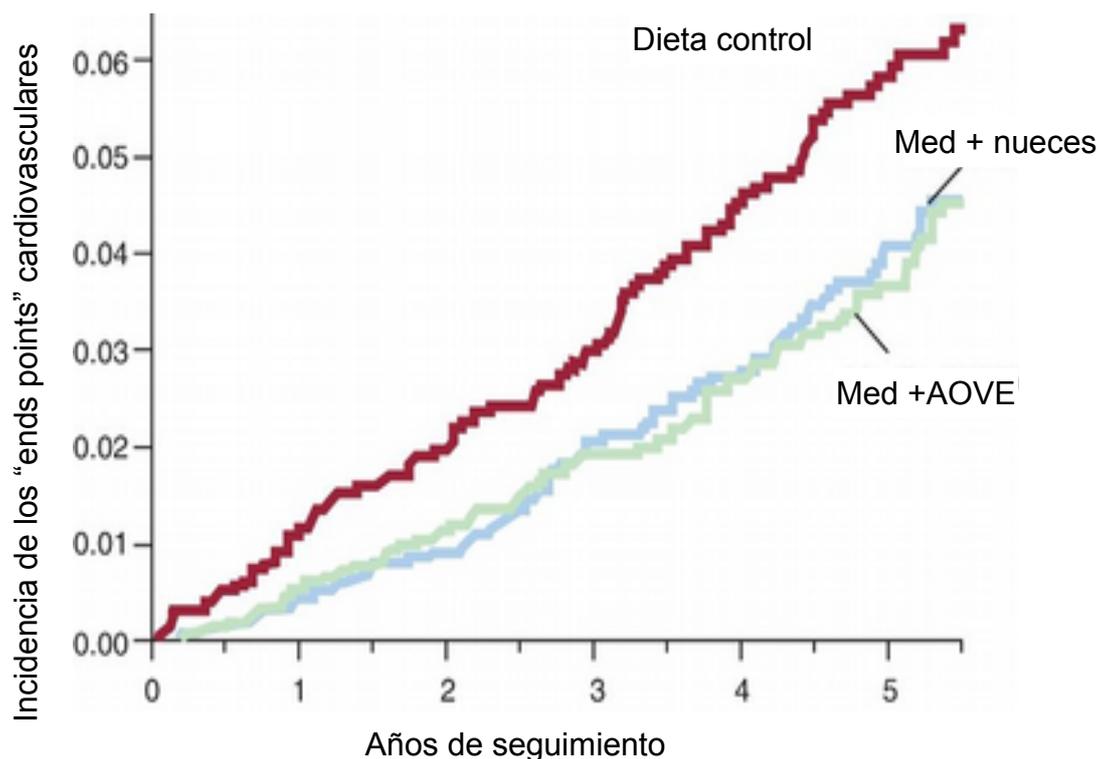
El estudio de los Siete Países, dirigido por Ancel Keys en los años 60, fue el primero en estudiar la incidencia de ECV entre siete países con diferentes patrones alimentarios y estilos de vida: EEUU, Finlandia, Holanda, Italia, Grecia, Yugoslavia y Japón. Tras un seguimiento de 10 años de los hábitos alimentarios detectaron que, en comparación con el resto de países desarrollados, los habitantes de Creta ingerían una elevada cantidad de grasas procedentes del consumo de aceite de oliva y, paradójicamente, mostraban la menor tasa de mortalidad por eventos cardiovasculares. Identificaron por primera vez el colesterol sérico, la presión sanguínea, la diabetes y el tabaquismo como factores de riesgo universales de las ECV, y demostraron que los patrones dietéticos en el Mediterráneo y en Japón, estaban asociados con una baja incidencia de enfermedad coronaria y mortalidad [282]. Mediante encuestas dietéticas, lograron demostrar una fuerte correlación directa entre el porcentaje promedio de energía obtenida por medio de los SFA y la incidencia de enfermedades coronarias y muerte. Así mismo, lograron detectar que la relación era inversa con el porcentaje de AG monoinsaturados (MUFA, monounsaturated fatty acids) incluidos de la dieta, y no encontraron relación con los PUFA, proteínas, carbohidratos, y alcohol. Gracias a estos resultados, los países con el aceite de oliva como principal fuente grasa de su dieta fueron identificados como aquéllos con la menor tasa de muerte de todo el estudio, y se puso de manifiesto la importancia del tipo de grasa consumida, en este caso, el aceite de oliva [283]. Sin embargo, se trató de un estudio observacional, y fallaron en demostrar la relación causa-efecto. Desde entonces,

ha habido numerosas investigaciones que se han centrado en estudiar los patrones dietéticos vinculados a las poblaciones del área del Mediterráneo, tan diferentes de aquellos de otras áreas del mundo.

Fue en 1994, con la publicación de los resultados preliminares del estudio Lyon Diet Heart [284], que el término de dieta mediterránea comenzó a ganar aceptación como un concepto científico en la epidemiología de las ECV y en su prevención a través de la nutrición. El estudio Lyon Diet Heart fue un ensayo aleatorio, controlado, con el que se evaluó la eficacia de la dieta de tipo mediterránea en la prevención de eventos coronarios recurrentes en pacientes que habían sobrevivido a un infarto de miocardio agudo previo. El informe final publicado en el año 1999 reveló una impresionante reducción del 50% del riesgo de sufrir de nuevo cualquier tipo de infarto cardíaco o complicación cardiovascular entre los pacientes del grupo que se adhirió a la dieta mediterránea en comparación al grupo control, cuya dieta era comparable a la actualmente consumida en EEUU. Además, se observó una menor incidencia de cáncer y una significativa reducción de todas las causas de mortalidad en el grupo experimental [285]. Este estudio fue el primer ensayo científico no-observacional que demostró los beneficios de la dieta mediterránea sobre la salud, cuyos resultados ilustraron la potencial importancia de los patrones dietéticos que enfatizan el consumo de frutas, verduras, pan, cereales, y pescado, así como del ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) en la dieta.

Más recientemente, el estudio PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) [286] realizado por investigadores españoles entre los años 2003 y 2011, fue diseñado para demostrar que la dieta mediterránea es mejor con respecto a una dieta baja en grasa como intervención primaria para la prevención de ECV. Se trata de un estudio de intervención nutricional mediante el cual se evaluó los efectos a largo plazo de la dieta mediterránea sobre la incidencia de ECV en hombres y mujeres con una media de edad de 67 años. Todos ellos presentaron elevado riesgo de ECV, además de DMT2 o al menos tres de los siguientes factores de riesgo: fumadores, sobrepeso u obesidad, hipertensión, dislipidemia, e historial familiar de eventos tempranos de ECV. Los 7447 participantes del estudio fueron distribuidos de forma aleatoria en una de las tres dietas experimentales: 1) dieta mediterránea suplementada con aceite de oliva virgen extra (AOVE) (un mínimo de 50 ml AOVE/día por participante); 2) dieta mediterránea suplementada con frutos secos (30g/día: 15 g de nueces, 7.5 g de almendras y 7.5 g de avellanas); y 3) dieta control baja en grasa. El “end-point” primario preestablecido al comienzo del estudio fue un incidente cardiovascular (compuesto por: infarto de miocardio (IM)/IM no fatal, derrame cerebral no fatal o muerte por ECV). Los secundarios incluyeron mortalidad total, DMT2, síndrome metabólico, enfermedad

arterial periférica, fibrilación atrial, enfermedades neurodegenerativas y cánceres mayores. Al evaluar el efecto de la adherencia a la dieta mediterránea con respecto a la incidencia de los “end points” primarios de ECV establecidos durante los más de siete años de seguimiento obtuvieron un efecto bastante remarcable. El estudio PREDIMED mostró por primera vez que la dieta mediterránea suplementada con AOVE o frutos secos es útil como intervención primaria de ECV, enfermedad arterial periférica, fibrilación arterial y DMT2 en individuos con elevado riesgo, ya que proporcionaba una reducción de un 30% del riesgo de desarrollar ECV [286, 287] (figura 7).



**Figura 7.** Incidencia de eventos cardiovasculares en los 7447 participantes del estudio PREDIMED durante más de cinco años de seguimiento. El “end-point” primario fue una combinación de infarto de miocardio, derrame cerebral y/o muerte cardiovascular. Med: Dieta mediterránea; AOVE, aceite de oliva virgen extra; N: nueces. Gráfico extraído de Estruch et al. (2013) [287].

Además, en subestudios desarrollados también por los investigadores del estudio PREDIMED, se hizo evidente que gracias al consumo de la dieta mediterránea suplementada tanto con AOVE como con frutos secos, era posible revertir el síndrome metabólico y reducir la presión sanguínea y riesgo de hipertensión [288] así como ralentizar la progresión de aterosclerosis [289].

Aunque los mecanismos de protección frente a las ECV mediante la adherencia a los patrones alimentarios de la dieta mediterránea no son del todo comprendidos, la riqueza de este patrón dietético en moléculas antioxidantes capaces de modular sistemas enzimáticos [290] y antiinflamatorias [291], parece ser una de sus cualidades más importantes. Una de las características más destacables de la dieta mediterránea es que aproximadamente el 85% del total de los lípidos consumidos en la dieta mediterránea está representado por el aceite de oliva, el cual contiene fundamentalmente MUFA en forma de ácido oleico en su composición. La investigación de la contribución del aceite de oliva sobre los efectos beneficiosos para la salud aportados por la dieta mediterránea ha demostrado que el aceite de oliva tiene una influencia beneficiosa sobre un amplio rango de procesos y factores de riesgo [292] y por tanto es reconocido como un elemento clave en su carácter cardioprotector [293].

### **3.2 El aceite de oliva**

Las grasas de origen vegetal han acompañado al hombre desde siempre con usos tan diversos que van desde la cocina hasta la iluminación, pasando por su uso cosmético. Pero sin duda, la grasa que más ha destacado debido a sus importantes beneficios sobre la salud, además de por sus cualidades organolépticas tan valoradas hoy día en el campo de la gastronomía, ha sido el aceite de oliva. El aceite de oliva llegó a convertirse, junto al pan y al vino, en uno de los pilares de la dieta mediterránea y, desde el siglo XI que llegó el olivo al sur de la península hasta hoy, tanto la oliva como el aceite que de ella se extrae, son considerados una extraordinaria fuente de vida, economía y salud.

De acuerdo con la Regulación EC no. 1638/98 OJEC 210 de 28/7/98, el aceite de oliva virgen (AOV) es aquel que se obtiene directamente de las olivas recolectadas del árbol del olivo (*Olea europaea*) mediante un proceso de presión mecánica, u otro proceso físico que no cause la alteración del aceite. Además, no ha de tener más tratamiento de purificación que el lavado, la decantación, la centrifugación en 3 fases (tradicional) o en 2 fases (ecológico), y el filtrado. Esta categoría no incluye aceites que han sido obtenidos mediante el uso de solventes o por procesos de re-estirificación o alguna otra mezcla con aceites de características diferentes. El AOV obtenido de esta manera es un producto natural, fresco, que conserva el sabor, los aromas y las vitaminas del fruto.

Una vez conseguido este requisito inicial, para que el aceite pueda obtener la etiqueta “extra”, el aceite debe reflejar los aromas y sabores propios del fruto del que proviene, lo que se representa mediante una graduación organoléptica igual o mayor de 6.5 y con un máximo de acidez de 1° (1 g de AG libres por cada 100g). El AOVE, como producto totalmente natural, es un reflejo directo de la variedad de aceituna de la que proviene, de la tierra donde se ha cultivado, del clima, de la cultura y de la forma de vivir y trabajar de su lugar de origen [294].

El AOV tiene un máximo de acidez de 2° (2 gramos de AG libres por 100 g). Aquellos aceites por encima de este valor se denominan “lampantes” y requieren ser refinados y combinados con AOV antes de ser comercializados. El AOV difiere poco en su composición de AG con la de los aceites refinados, aunque sí tiene importantes diferencias en sus componentes menores [294].

### **3.2.1 Composición del aceite de oliva**

Los componentes del aceite de oliva pueden dividirse en dos grandes fracciones de acuerdo a su capacidad de formar jabones cuando son tratados con una base fuerte. La fracción saponificable está representada principalmente por TG, que constituyen aproximadamente el 99% del aceite, y en segundo lugar por AG libres, mono- y diacilgliceroles. Los compuestos menores biológicamente activos del aceite constituyen solo el 1-2% de la composición total del aceite de oliva, aunque juegan un papel muy importante en las propiedades saludables del aceite de oliva. Estos compuestos menores se clasifican a su vez en dos subgrupos: (a) la fracción insaponificable, descrita como la fracción extraída con solventes tras la saponificación del aceite que incluye hidrocarburos, tocoferoles, alcoholes grasos, triterpenos, esteroides y pigmentos; y (b) la fracción soluble, que incluye los compuestos fenólicos [295].

Los AG presentes en el aceite de oliva son principalmente los ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), y linolénico (C18:3). Los ácidos mirísticos (C14:0), heptadecanoico (C17:0), y eicosaenoico (20:0) se encuentran en muy poca cantidad. El ácido oleico, un MUFA, es el principal componente del aceite de oliva, pues su contenido representa el 50-80% del total de AG. Sin embargo, su concentración así como la de otros AG y la cantidad de los componentes menores, varía dependiendo de la zona de producción, condiciones ambientales y fase de recolección de la fruta [296, 297]. Según esto, hay variedades como el aceite Picual con un contenido del 75% de ácido oleico y menos del 5% de ácido linoleico, y otras como el aceite Blanqueta con tan solo el 55% de ácido oleico y el 20% de ácido linoleico.

Estas remarcables diferencias entre variedades de AOV tienen efectos relevantes en las propiedades saludables atribuidas al aceite de oliva, como demostró el estudio realizado por Quintero-Florez et al. [298].

### **3.2.2 El aceite de oliva como elemento clave del carácter cardioprotector de la dieta mediterránea**

El consumo de aceite de oliva ha demostrado tener propiedades protectoras antiinflamatorias y antioxidantes [290, 291], contribuyendo a contrarrestar el desarrollo y progresión de enfermedades asociadas con un estado de inflamación crónica de bajo grado [293, 299]. Esto es particularmente beneficioso en poblaciones con un elevado riesgo cardiovascular (hipertensivas e hipercolesterolémicas).

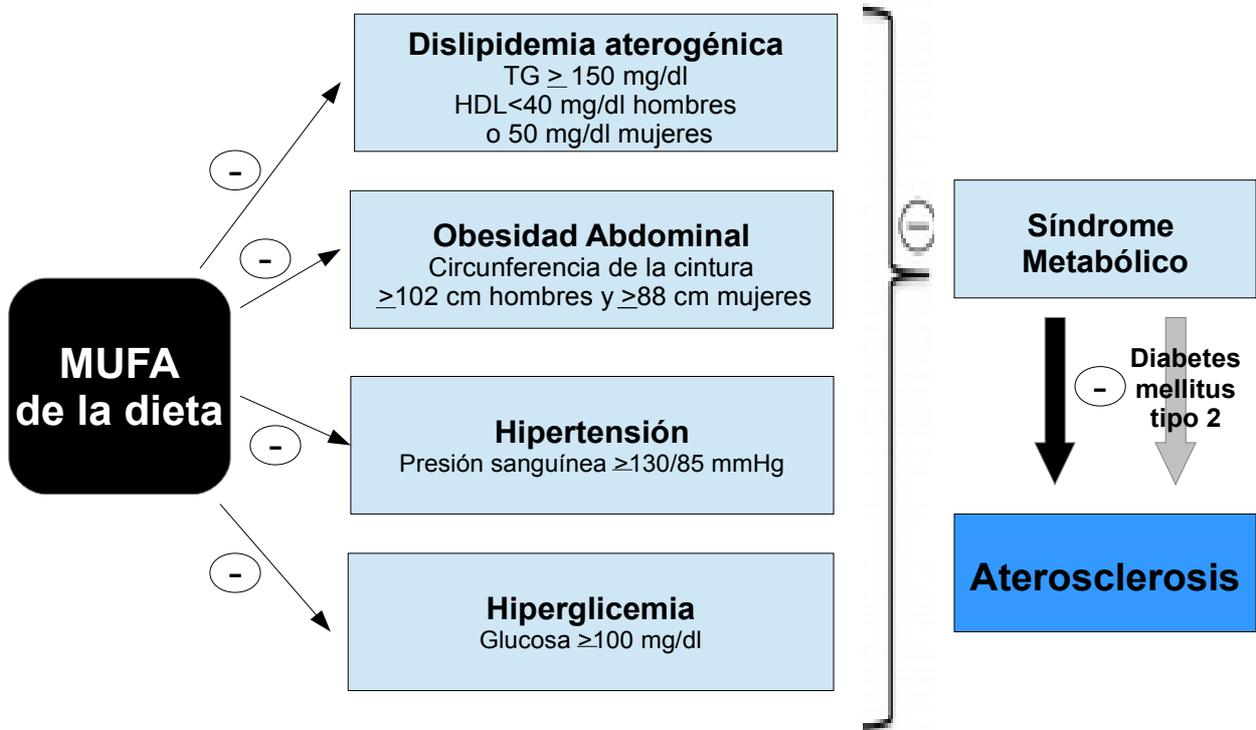
El perfil lipídico del aceite de oliva es el principal responsable de tales cualidades gracias al elevado contenido de ácido oleico [300, 301]. Sin embargo, los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la prevención del desarrollo de ECV no deben atribuirse únicamente a su perfil lipídico. Los compuestos menores que se encuentran en el AOV, aunque en proporciones limitadas en comparación con los AG, son cruciales no solo en términos de estabilidad y protección del AOV frente a la auto-oxidación, sino también porque le confieren importantes actividades biológicas [301, 302].

#### *3.2.2.1 Los MUFA del aceite de oliva y sus propiedades beneficiosas en la reducción del riesgo de ECV*

Hoy en día está más que reconocida la fuerte correlación existente entre el consumo de SFA, colesterol plasmático y la mortalidad por ECV. Este hecho ha sido suficiente para persuadir a los profesionales sanitarios de que el elevado consumo de SFA era el responsable de los elevados niveles de muerte cardiovascular en las sociedades occidentales de aquel momento [303], especialmente entre individuos con sobrepeso u obesos [304]. Por el contrario, se ha demostrado que el consumo de dietas con alto contenido de grasa pueden ser incluso beneficioso siempre y cuando estén enriquecidas en MUFA [304].

Los efectos antiaterogénicos proporcionados por MUFA han sido ampliamente documentados. Sus mecanismos de acción contribuyen no solo a reducir la inflamación, sino que también colaboran en la reducción de dislipidemia, hipertensión, hiperglicemia, resistencia a la

insulina y obesidad abdominal, siendo todos ellos factores de riesgo críticos que contribuyen con el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas [293, 305] (figura 8).



**Figura 8** Mecanismos de acción de los MUFA ingeridos con la dieta en la reducción de los factores de riesgo del síndrome metabólico y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas asociadas [305].

*a) Los MUFA y su influencia sobre el proceso inflamatorio*

Un proceso inflamatorio prolongado está involucrado en el inicio, progresión y etapas finales de la aterosclerosis [159]. Si además hay presentes otros factores como la hipercolesterolemia, hiperlipidemia y la hipertensión, éstos causan a su vez la activación del endotelio vascular, lo que perpetúa la liberación de mediadores inflamatorios, y mantiene activa la migración de monocitos al foco de la lesión, permitiendo la evolución de la placa de ateroma. Por tanto, reducir la respuesta inflamatoria es crucial para prevenir los eventos ateroscleróticos.

Un buen número de estudios han demostrado que el consumo de AOV tiene efectos antiinflamatorios. Salas-Salvado et al. [291] encontraron que, en situación de elevado riesgo cardiovascular, los sujetos con los niveles de consumo de AOV más elevados presentaban los niveles más bajos de VCAM-1, ICAM-1, IL-6 y PCR. En otro estudio en el que participó un grupo de pacientes con síndrome metabólico, observaron tras dos años de seguimiento, que los sujetos que se adhirieron a la dieta mediterránea enriquecida con aceite de oliva, también resultaron tener menor concentración plasmática de PCR, IL-6 y otras citoquinas inflamatorias al contrastarlos con el grupo control que no consumió AOV [306]. Resultados similares se han observado en otros ensayos clínicos realizados, como fue el desarrollado por Mena et al.[307], aunque Estruch et al. solo identificaron la reducción de citoquinas en el grupo de hombres hipercolesterolémicos [308]. Es importante mencionar que no solo las personas con riesgo de desarrollar ECV pueden beneficiarse de las propiedades antiinflamatorias aportadas por el AOV, sino que también individuos sanos han visto mejorada la respuesta inflamatoria tras un consumo de aceite de oliva. En poblaciones de sujetos sanos, se ha observado que la composición de partículas LDL se ha visto enriquecida en ácido oleico después de ingerir AOV [309] y, con ello, se reduce su capacidad para inducir la quimiotaxis de monocitos y la adhesión de monocitos al endotelio [310].

La lipemia postprandial tiene efectos inflamatorios, por lo que varias investigaciones en humanos se han centrado también en el estudio de la respuesta inflamatoria durante esta fase [311]. Tras la administración de una comida con aceite de oliva como principal fuente de grasa a voluntarios sanos, hipercolesterolémicos e hipertrigliceridémicos, se ha detectado una reducción en la concentración sérica de moléculas de adhesión, incluyendo ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina durante el periodo postprandial, en comparación con la línea basal o con la fuente de grasa alternativa de la dieta control (mantequilla, aceite de girasol alto palmítico o PUFA n-3) [312, 313]. También se ha demostrado que una dieta enriquecida en AOV es capaz de causar una significativa reducción de los niveles sanguíneos de tromboxano B<sub>2</sub> y LTB<sub>4</sub> [314]. Es más, se ha observado que la inducción de la expresión de ARNm de TNF- $\alpha$  en células de macrófagos periféricos sanguíneos (PBMCs) aisladas en el periodo postprandial era menor en sujetos sanos que previamente habían consumido un desayuno que contenía aceite de oliva o frutos secos en comparación con el grupo de sujetos cuyo desayuno contenía mantequilla [315]. Asimismo, ha sido demostrado que NF-kB, un factor de transcripción que controla la expresión de genes responsables de numerosos procesos proinflamatorios, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP1 [316] es activado en monocitos tras una comida que contiene mantequilla o frutos secos, mientras que una comida que contiene aceite de oliva no causa tal efecto [312].

Trabajos realizados con animales han proporcionado igualmente una importante evidencia de los efectos antiinflamatorios del aceite de oliva. En ratas, se ha demostrado que la administración de una dieta con un 20% de su composición de aceite de oliva, es capaz de reducir la actividad de las células natural killer [317]; la suplementación de la dieta con un 10% de aceite de oliva reduce la susceptibilidad de las lipoproteínas a la oxidación en animales hipercolesterolémicos [318]; y la producción de ROS y PGE2 también se redujo en neutrófilos tras ser alimentadas con un 15% de aceite de oliva con respecto a las que se alimentaron con una dieta baja en grasa durante dos meses [319]. Más aún, los niveles de secreción de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y PGE2 por macrófagos peritoneales murinos estimulados por liposomas aislados de ratones alimentados con 15-20% de aceite de oliva durante ocho semanas fueron también menores [317, 319].

Numerosos estudios *in vitro* también han proporcionado importantes resultados con respecto a la capacidad de modulación del proceso inflamatorio por el ácido oleico en cultivos de células endoteliales humanas. Se ha demostrado la capacidad del ácido oleico para reducir los niveles intracelulares de ROS, la expresión de moléculas de adhesión y la activación transcripcional de NF- $\kappa$ B cuando este AG es añadido a los cultivos celulares. Además, se ha visto reducida la inducción de la expresión de VCAM-1 y E-selectina por parte de partículas LDL-ox aisladas directamente de sujetos que consumieron una dieta suplementada con aceite de oliva en comparación con los que consumieron SFA [301, 310, 311]. Adicionalmente, la quimiotaxis de monocitos y la adhesión endotelial de las células se incrementa ante su exposición a liposomas que contienen ácido linoleico, mientras que este efecto es casi nulo cuando el ácido linoleico es reemplazado con ácido oleico 350 [320]. Esta acción antiinflamatoria del ácido oleico ha sido atribuida a su baja capacidad de oxidación con respecto al ácido linoleico, el cual puede ser reemplazado en la composición de las lipoproteínas por ácido oleico en aquellos individuos que consumen una dieta rica en aceite de oliva [309].

#### *b) Los MUFA y su influencia sobre el perfil lipídico plasmático*

La dislipidemia, uno de los componentes del síndrome metabólico, ha sido asociada con varias patologías inflamatorias, entre ellas la aterosclerosis [321]. El contenido graso de los alimentos juega un papel imprescindible en la modulación del perfil lipídico plasmático y en la determinación del riesgo de enfermedades cardiovasculares, así como en favorecer la reversión de enfermedades.

La capacidad del aceite de oliva para ayudar a proteger frente al desarrollo de la aterosclerosis incluye entre sus acciones la modificación del perfil lipídico a uno menos aterogénico, que consiste en un aumento de la concentración de colesterol unido a HDL (HDL-c) y una disminución de LDL-c, TG y colesterol total, además de la reducción de lipoproteínas oxidadas [322].

Desde los años 90, se han realizado varios meta-análisis que han confirmado que los MUFA y PUFA de la dieta tienen un efecto comparable en la reducción de los niveles de colesterol [310, 311, 323]. Desde que en estudios como el llevado a cabo por Hu et al. demostraran que la sustitución del 5% de los SFA de la dieta por ácidos grasos insaturados resulta en una reducción del 43% en ECV [324], cada vez hay mayor interés en incrementar la cantidad de MUFA y PUFA en la dieta, y reducir el consumo de SFA. De hecho, el reciente estudio PREDIMED dejó bien claro que la dieta mediterránea suplementada con el AOVE o nueces, ambos fuente de grasas insaturadas, se asocia con una mejora del perfil lipídico plasmático [322]. Otros estudios clínicos en humanos demostraron también el efecto del consumo de MUFA y PUFA en la mejora de los ratios colesterol total/HDL-c [325] y TG/HDL-c [322] debido a una reducción en los niveles de LDL-c. Sin embargo, a pesar de los beneficios cardiovasculares aportados por los PUFA, su consumo ha sido limitado a menos del 10% de la energía diaria ingerida. Paradójicamente, se ha observado que los PUFA pueden generar a su vez efectos adversos potenciales que incluyen la reducción de los niveles de HDL-c y el incremento de la susceptibilidad de las LDL-c a la oxidación [326, 327], por lo que no conviene abusar de ellos. En cambio, el consumo de MUFA ha demostrado reducir los niveles de HDL-c menos frecuentemente [325, 328].

Las lipoproteínas plasmáticas pueden sufrir modificaciones como la oxidación, que potencian su efecto dañino sobre el endotelio vascular y las hace más propensas a ser incorporadas por los macrófagos [329]. Un abundante número de estudios en humanos y animales han sugerido que el consumo de aceite de oliva reduce el estrés oxidativo, lo que ha sido en parte atribuido a su contenido de ácido oleico. Puesto que el único doble enlace de los MUFA hace que la formación de dienos conjugados sea menos favorable, es de esperar que las partículas LDL ricas en oleato sean más resistentes a la oxidación que las LDL ricas en PUFA [330]. Este hecho fue demostrado por Cicero et al. en el estudio EUROLIFE [331], cuyos resultados publicados en el año 2008 mostraron que gracias a la suplementación diaria de la dieta con 25 ml de aceite de oliva se incrementó el contenido de ácido oleico de las LDL, lo que se asoció con una reducción del daño oxidativo de los lípidos. Asimismo, Moreno et al. [332] demostraron que una dieta rica en MUFA reduce a su vez la

captación de las partículas LDL-ox por macrófagos, contribuyendo a disminuir la formación de células espumosas, uno de los eventos tempranos y clave en la aterogénesis

*c) Los MUFA y su efecto sobre el desarrollo o reversión de la obesidad*

Las recomendaciones nutricionales realizadas para el tratamiento de la obesidad han mostrado generalmente un especial énfasis en la importancia de reducir todo el contenido graso de la alimentación, y han promovido su reemplazo por carbohidratos. Sin embargo, cada vez es más evidente que dietas como la mediterránea, con un alto contenido graso procedente del aceite de oliva, pueden ser alternativas efectivas a las tradicionales dietas bajas en grasa para una pérdida inicial de peso en personas obesas [333].

Un meta-análisis de 21 estudios epidemiológicos realizado sobre la dieta mediterránea y la obesidad reveló que no existe documentación alguna que reporte un incremento significativo de obesidad en respuesta a la dieta mediterránea, a pesar del elevado consumo de grasa procedente del aceite de oliva asociado a ella. De hecho, cerca de la mitad de esos estudios proporcionaron evidencia científica de que la adherencia a estos patrones alimentarios está asociada con una pérdida de sobrepeso/obesidad o promoción de pérdida de peso [334]. Entre ellos, se encontraron el estudio EPIC (Investigación Europea Prospectiva en Cáncer y Nutrición) [335] y el estudio PREDIMED [308]. Este último, puso además de manifiesto que una intervención nutricional con la dieta mediterránea, con alto contenido de MUFA, en personas con adiposidad abdominal, el tipo de obesidad conocido más perjudicial, era capaz no solo de contrarrestar los elevados riesgos cardiovasculares asociados con el incremento de adiposidad [287, 336], sino que mostró una pérdida de peso después de tres meses de su consumo [308].

El Proyecto SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) [304], llevado a cabo por el equipo de Martínez-González de la Universidad de Navarra y publicado en el año 2015, es otro de los estudios cuyos resultados coinciden con los de PREDIMED, gracias a la virtud de la dieta mediterránea para contribuir a reducir el IMC y la circunferencia de la cintura. En este estudio se analizó la relación de la dieta o estilo de vida con la incidencia de varias enfermedades crónicas y la mortalidad. Evaluaron la relación entre la obesidad y la incidencia de los mayores eventos clínicos cardiovasculares según varias categorías o niveles de adherencia a la dieta mediterránea, en una muestra de 19,065 hombres y mujeres obesos o con sobrepeso, de 38 años de edad media y bajo riesgo de enfermedad cardiovascular al inicio del estudio. Tras un seguimiento de 10.9 años, se

detectó un riesgo de sufrir eventos cardiovasculares un 57% menor en aquellos participantes con la adherencia más alta a la dieta mediterránea. Estos resultados confirmaron que adoptar los hábitos alimentarios de la dieta mediterránea puede contrarrestar algunos de los efectos cardiovasculares adversos causados por el sobrepeso/obesidad gracias a sus efectos antiinflamatorios [205], aunque no solo en personas de avanzada edad con elevado riesgo cardiovascular, sino también en personas jóvenes, sanas y de alto nivel educativo.

Varios estudios de intervención clínica han comparado el efecto logrado sobre la pérdida de peso o ausencia de ganancia de peso corporal asociado a la dieta mediterránea con otras dietas que tradicionalmente se recomiendan adoptar. Iris Shai et al. [337] analizaron el efecto sobre la pérdida de peso en 322 pacientes que adoptaron una dieta con bajo contenido graso, otra con bajo contenido en carbohidratos, y la dieta mediterránea, tras un seguimiento de dos años. Aunque todos los grupos perdieron peso, la mayor reducción se detectó en los grupos que consumieron la dieta con bajo contenido de carbohidratos (con una pérdida de 4.7 kg de media) y la mediterránea (con una pérdida de 4.4 kg de media). En cambio, con el consumo de la dieta de bajo contenido graso, solo se logró una pérdida 2.9 kg de media. Esta ausencia de una pérdida significativa de peso corporal asociada a una dieta de bajo contenido graso también se observó en el ensayo clínico Women's Health Initiative Diet Modification Trial (WHI DMT) [338], lo que sugiere que la adherencia a la dieta mediterránea enriquecida con AOV es una mejor opción para perder peso que adoptar una dieta baja en grasa.

Se ha propuesto que esta ausencia de ganancia de peso y la mejora de la condición de sobrepeso u obesidad podría ser debida al incremento de la oxidación postprandial de las grasas, la termogénesis inducida por la dieta y, fundamentalmente, por el gasto energético estimulado por el consumo de aceite de oliva [339] y su efecto saciante [340].

#### *d) Los MUFA, la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo-2*

La calidad de las grasas procedentes de la dieta parece ser determinante en el efecto de la dieta sobre la sensibilidad a la insulina. De la misma manera que ocurre con los niveles en circulación de lípidos, los SFA han mostrado alterar el control glicémico y la sensibilidad a la insulina [341]. Así pues, el reemplazo de los SFA procedentes de la dieta por carbohidratos o MUFA ha permitido obtener importantes mejoras en la sensibilidad a la insulina y respuesta glicémica tanto en individuos predispuestos a desarrollar RI [342, 343] como en personas sanas [344, 345].

En el desarrollo de la DMT2, las células  $\beta$ -pancreáticas que secretan insulina para contrarrestar los picos postprandiales de glucosa en sangre, se ven saturadas y, como resultado, comienzan a fallar a la hora de proporcionar de manera efectiva los niveles de insulina necesarios para regular los niveles de glucosa. El consumo de dietas enriquecidas en MUFA ha mostrado ejercer una acción directa sobre la función de las células  $\beta$ -pancreáticas [346]. En 1988 ya se demostró que la administración de una dieta con alto contenido graso, enriquecida en MUFA (33% de la energía total) a pacientes con DMT2, resultó en una reducción de los requerimientos de insulina y una reducción de la concentración de glucosa en plasma con respecto a aquellos que consumieron una dieta de bajo contenido graso (25% de la energía total) pero alto en carbohidratos (60% de la energía total) [347].

Otro estudio que apoya el efecto beneficio de los MUFA en la reducción de la RI fue el realizado en el año 2008 por López S et al. [348], cuyos datos obtenidos revelaron que los MUFA mejoraron la sensibilidad a la insulina y la función de las células  $\beta$ -pancreáticas en los 14 hombres sanos que participaron en el ensayo clínico en comparación con los SFA, observándose una reducción lineal directa en la RI a medida que se sustituía SFA por MUFA [348]. De hecho, el estudio llevado a cabo en Pizarra por el grupo de Rojo-Martínez et al. en 2006 [349] mostró que los MUFA de la dieta procedentes del aceite de oliva y los PUFA contribuyen a la variabilidad de la función de las células  $\beta$ -pancreáticas. El enriquecimiento de las membranas celulares con ácido oleico a través de su consumo con la dieta también contribuye a reducir la RI. Ryan et al. [350] examinaron la relación entre los cambios en la composición de AG de la membrana celular y el transporte de glucosa, y encontraron una reducción en la RI cuando una dieta rica en ácido linoleico se cambiaba por una rica en ácido oleico.

#### *e) Los MUFA y su influencia sobre la presión arterial*

La hipertensión es la causa prevenible más importante de las enfermedades cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares del mundo. Si no se controla, puede provocar un infarto de miocardio, un ensanchamiento del corazón y, a la larga, una insuficiencia cardíaca. Los vasos sanguíneos pueden desarrollar protuberancias (aneurismas) y zonas débiles que los hacen más susceptibles de obstruirse y romperse. También puede ocasionar que la sangre se filtre en el cerebro y provoque un accidente cerebrovascular, e incluso provocar deficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo.

Las probabilidades de sufrir un infarto de miocardio, un accidente cerebrovascular o insuficiencia renal a consecuencia de la hipertensión, se pueden incrementar por otros factores como el consumo de tabaco, una dieta poco saludable, el uso nocivo del alcohol, la inactividad física y la exposición a un estrés permanente, así como la obesidad, el colesterol alto y la diabetes mellitus (OMS).

En la literatura científica se pueden encontrar estudios epidemiológicos y clínicos que corroboran el efecto beneficioso que tiene el consumo de dietas con elevado contenido en MUFA procedente del aceite de oliva sobre la presión arterial. Es el caso del meta-análisis realizado en el año 2011 por Schwingshackl et al. [351], a través del cual investigaron los efectos a largo plazo (>6 meses) de dietas con elevado contenido en MUFA (>12% MUFA) frente a dietas con bajo contenido en MUFA (<12% MUFA) sobre los factores de riesgo cardiovasculares. Sus resultados mostraron que las dietas ricas en MUFA reducen significativamente la masa grasa y la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD). Estos hallazgos coincidían con los obtenidos previamente en el estudio EPIC-NL [352]. A lo largo del estudio, los participantes mostraron una reducción del 44% del riesgo de mortalidad por ECV, y una menor incidencia de cardiopatías, entre otras cosas, gracias a la prevención de la hipertensión en la población que participó en el ensayo. Además, se hizo evidente una relación inversa entre el ratio MUFA:SFA en sangre y la presión sanguínea arterial, lo que corroboró el efecto del ácido oleico en la reducción de la presión sanguínea [353].

El proyecto SUN también reveló que la ingesta de aceite de oliva durante un tiempo promedio de 28.5 meses estaba asociado con una reducción en la incidencia de la hipertensión, aunque únicamente en la población masculina que participó en el estudio [304].

El efecto hipotensivo del aceite de oliva ha sido comparado con dietas ricas en SFA o PUFA, así como otras fuentes con alto contenido en MUFA distintas al aceite de oliva como es el aceite de girasol alto oleico. La adherencia a dietas con alto contenido en MUFA reducen la presión arterial en comparación con dietas ricas en SFA [310], y aunque el consumo de PUFA también logra reducir la presión arterial, este efecto es mayor con las dietas ricas en MUFA. Ferrara et al. [354] revelaron con su estudio que los pacientes a los que se les administró aceite de girasol (una fuente rica de PUFA) con la dieta, necesitaron más medicación para controlar su hipertensión que aquellos a los que se les dio una cantidad equivalente de aceite de oliva. Y cuando se ha comparado el consumo de aceite de oliva con el de aceite de girasol alto oleico, ambos con un contenido similar de MUFA, sobre un grupo de mujeres hipertensivas de elevada edad, se ha detectado que el AOV consumido

sigue siendo más efectivo en reducir la presión sanguínea [355]. Esto parece sugerir que los micronutrientes en el aceite de oliva juegan una parte importante en su efecto beneficioso sobre la hipertensión.

Los mecanismos a través de los cuales el aceite de oliva reduce la presión sanguínea no están del todo claros, pero deben estar relacionados con las alteraciones estructurales y funcionales que sufren las membranas de los eritrocitos en caso de hipertensión [355, 356], así como con cambios en la composición de AG de las membranas plasmáticas de las células del endotelio vascular de la aorta [354]. Además, las propiedades antioxidantes de los MUFA y de los componentes menores del aceite de oliva como los compuestos fenólicos, deben también contribuir a reducir la producción de ROS e incrementar la disponibilidad de NO, permitiendo así una mejora de la función endotelial [310, 357].

*f) Los MUFA, la composición lipídica de las lipoproteínas aterogénicas y su influencia en la formación de células espumosas*

El tamaño y composición de las nuevas partículas de QM sintetizadas, así como de los QMr, dependen del tamaño y composición de las gotículas lipídicas formadas en el interior del enterocito, lo cual viene determinado por la composición de los lípidos absorbidos de la dieta [74]. La presencia de determinados AG en las lipoproteínas aterogénicas, y la proporción en la que se encuentran con respecto a los AG totales, tiene una importante repercusión en el desarrollo de la placa aterosclerótica, ya que esto influye sobre las diferentes vías de incorporación de las lipoproteínas en los macrófagos, y por tanto, sobre la formación de células espumosas [298, 358].

Uno de los estudios que ha corroborado la influencia del grado de saturación de los AG componentes de la partículas sobre su interacción con los receptores celulares de superficie de los macrófagos fue realizado por De Pascale et al. [358]. En él, estudiaron el efecto de partículas de QMr artificiales enriquecidas con AG con diferentes grados de saturación: SFA, MUFA, PUFA n-6, y PUFA n-3, sobre la formación de células espumosas derivadas de macrófagos THP-1. Esos AG fueron obtenidos mediante la incorporación de TG aislados de aceite de palma, oliva, maíz, y aceites de pescado, respectivamente. Estos autores mostraron que las partículas artificiales de QMr que fueron sintetizadas con SFA o MUFA eran incorporadas por los macrófagos más rápidamente que las enriquecidas en PUFA n-6 o n-3, además de que aquellas enriquecidas en SFA fueron las que indujeron la mayor incorporación lipídica en el interior de las células. Esos mismo resultados fueron obtenidos posteriormente en el trabajo experimental realizado por Quintero-Florez et al.

[298]. Tales revelaciones pusieron de manifiesto que existen factores que influyen en la incorporación de las partículas QMr, unas de las lipoproteínas más aterogénicas, por los macrófagos, y su tamaño de partícula y composición de AG parecen ser relevantes en el proceso de captación y acumulación de lípidos [359]. Este hecho, a su vez, es determinante para la acumulación de colesterol y TG en los macrófagos, afectando a su metabolismo y modulando de su perfil aterogénico [360].

*g) Los MUFA y la modulación de los niveles de expresión de genes involucrados en la formación de células espumosas*

El contenido lipídico de los alimentos tiene la capacidad de modular los niveles de expresión génica y proteica y, en consecuencia, la producción de metabolitos, y la modulación de la expresión genética juega indudablemente un papel importante en la prevención de la aterosclerosis. Éste es un hecho del que tenemos conocimientos desde hace relativamente poco tiempo gracias a los avances científicos en el campo de la nutrigenómica, la ciencia que estudia la interacción entre los componentes dietéticos de los alimentos y los genes.

En los últimos años, están siendo publicados estudios que están demostrando la capacidad de los MUFA para modular la expresión de genes proaterogénicos involucrados en la inflamación vascular [226, 361], reclutamiento de monocitos en el lugar de la lesión y la modulación de los niveles de síntesis de marcadores de inflamación [308].

Además, se ha sugerido que uno de los efectos saludables del aceite de oliva en la protección frente a la aterosclerosis puede ser la reducción de la capacidad de los macrófagos presentes en la lesión aterosclerótica de incorporar lipoproteínas. Esto es posible gracias a la capacidad de los MUFA y polifenoles que contiene para modular los niveles de expresión de receptores de superficie tanto en humanos [226], como en ratones [362], reduciendo así la formación de células espumosas y los eventos trombóticos [361].

En el estudio desarrollado por Llorente-Cortés et al. [226], se evaluó el efecto de la dieta mediterránea sobre la expresión de genes proaterogénicos en poblaciones con elevado riesgo cardiovascular. Sus resultados indicaron que la dieta mediterránea enriquecida en AOV prevenía de forma específica la sobreexpresión de LRP-1, uno de los receptores de mayor importancia en la formación de células espumosas, lo que ha sido confirmado por otros estudios *in vivo* [363, 364] como *in vitro* [365, 366]. De hecho, pacientes con obstrucciones coronarias mostraron tener una expresión alterada del receptor LRP-1 en células sanguíneas mononucleares [367, 368]. Uno de los

factores de riesgo ateroscлерótico que contribuye a la sobreexpresión de LRP-1 es la hipercolesterolemia [369]. Sin embargo, en dicho estudio no encontraron la existencia de una correlación entre la expresión de LRP-1 y los niveles de LDL-c, lo que sugiere que el efecto de AOV en la expresión de LRP-1 no fue causado por una reducción en los niveles de colesterol plasmático [226].

Los mismos autores han encontrado un efecto específico sobre los niveles de expresión del receptor CD36 causado por el contenido PUFA de los alimentos, en este caso de nueces, promoviendo la acumulación de TG intracelular. Estos resultados son además corroborados por otros grupos de investigación [370]. El proceso por el que los PUFA inducen la sobreexpresión de CD36 es debido a que las grasas poliinsaturadas estimulan la expresión de CD36 a través de un mecanismo dependiente de PPAR [371, 372].

Otros estudios *in vitro* llevados a cabo en monocitos THP-1, han propuesto que una dieta rica en ácido oleico puede prevenir el exceso de acumulación lipídica mediante la reducción de la expresión del receptor de la apolipoproteína B48 [373]. Y estudios *in vivo* realizados en ratones a los que se les alimentó con una dieta rica en aceite de oliva obtuvieron una menor expresión de SRA1, SRA2, CD36 en macrófagos [362].

Los SFA de la dieta han mostrado también alterar los niveles de síntesis de LDLR. Mustad et al. [374] demostraron que mediante la reducción del contenido de SFA de la dieta, existía una mayor expresión de LDLR en células mononucleares, disminuyendo así la retirada de lipoproteínas aterogénicas de la circulación. De esta manera, sus resultados mostraron el carácter aterogénico de los SFA, que colaboran en que haya un mayor nivel de LDL en circulación, incrementándose el riesgo de desarrollar aterosclerosis.

### 3.2.2.2 Los componentes menores del aceite de oliva y su acción protectora frente al desarrollo de la aterosclerosis

Además de los MUFA, el AOV contiene muchos componentes menores con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que merecen una especial atención dado el potente carácter protector que proporcionan frente a la aterosclerosis. Estos compuestos altamente bioactivos pertenecen a la fracción insaponificable y soluble del aceite de oliva, y están presentes en concentraciones menores, del rango de mg/kg. Es importante tener en cuenta que solo el AOV

contiene compuestos menores y no se encuentran en el aceite refinado ya que la mayoría de ellos son eliminados como resultado del proceso de refinado al que son sometidos [375].

#### *a) Efecto de los Fitoesteroles.*

Los fitoesteroles representan una gran proporción de los componentes menores insaponificables de todos los aceites vegetales, incluyendo el AOV. El principal esteroles encontrado en el AOV es  $\beta$ -sitosterol, cuyo contenido es de 683-2600 mg/kg (Benitez-Sánchez et al, 2003), lo que representa en torno al 95% del total de los esteroides. Pero hay otras especies presentes, como el  $\Delta^5$ -avenasterol, campesterol,  $\Delta^7$ -estigmastanol, estigmasterol y campestanol.

Los fitoesteroles son secuestradores de ácidos biliares e inhibidores de la acil-CoA-colesterol-aciltransferasa. Se ha demostrado que el consumo de alimentos ricos en esteroides ayuda a reducir los niveles de colesterol plasmático [376], así como la biodisponibilidad de  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno en individuos normocolesterolémicos [377].

Resultados obtenidos en estudios realizados en animales sugieren que los fitoesteroles son capaces de reducir la aterosclerosis, pero esta asociación no ha sido lograda aún en humanos [378]. Por el contrario, algunos estudios epidemiológicos han mostrado una evidente asociación entre niveles elevados de esteroles en plasma y un historial clínico de enfermedad coronaria familiar o personal [379]. De modo que existen datos contradictorios que deben ser resueltos en lo que concierne a su papel cardioprotector en humanos.

#### *b) Efectos de los polifenoles*

Los polifenoles presentes en el AOV le protegen de la auto-oxidación y le confieren una excepcional estabilidad térmica [380], además de contribuir en su característico sabor. La concentración de los compuestos fenólicos en el AOV depende de muchos factores, incluyendo la especie, lugar, clima y maduración de los frutos.

Gran parte de la investigación realizada para explicar la reducida mortalidad cardiovascular y morbilidad observada entre las personas adheridas a la dieta mediterránea se ha concentrado en los componentes fenólicos [381] debido a su fuerte actividad antioxidante y captadora de radicales libres *in vitro*. Varios trabajos experimentales han permitido conocer las diferentes vías a través de las cuales ejercen que su potente carácter protector en el sistema cardiovascular: (1) mediante una directa defensa antioxidante, especialmente contra la peroxidación lipídica y el daño oxidativo del ADN [382]; (2) mediante la prevención de la disfunción endotelial, incluyendo un incremento de la producción de NO y una inducción de la síntesis de NO, así como una reducción en la expresión de las moléculas de adhesión endotelial, y secuestro de los radicales libres intracelulares en el endotelio vascular [383]; (3) mediante la inhibición de la agregación plaquetaria y la generación de trombina [384]; (4) mediante la estimulación de la transcripción de ARNm de enzimas involucradas en la defensa antioxidante [385] (5) mediante la inducción de la apoptosis y efectos antiproliferativos [386]; y (6) mediante la modulación de la función del sistema inmune [387]. Además, son capaces de modificar la homeostasis [387], ejerciendo efectos beneficiosos sobre el control de la presión sanguínea [301].

Entre los compuestos fenólicos, el hidroxitirosol y la oleuropeína se merecen una especial atención:

- La oleuropeína tiene actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiaterogénica, anticancerígena, antimicrobial, y antiviral, así como efectos hipolipidémicos e hipoglicémicos [388].
- El hidroxitirosol es el compuesto fenólico más abundante del AOV, y tiene una potente actividad antioxidante *in vivo*. Sin embargo, para beneficiarse de tales propiedades, este compuesto fenólico ha de ser administrado en una formulación lo más similar posible a su matrix original, pudiendo no sólo no ser útil si se administra de forma aislada, sino incluso puede ser dañino, provocando el aumento del tamaño de la lesión aterosclerótica por una mayor activación de monocitos [391].

### *c) Efecto de los triterpenos*

Los cuatro triterpenos simples más abundantes en el aceite oliva son: los ácidos oleanólico (OA) y maslínico (MA) (triterpenos pentacíclicos) y el eritrodiol y uvaol (alcoholes triterpénicos).

Un gran número de experimentos han sido realizados para esclarecer el efecto de los triterpenos sobre los factores de riesgo aterotrombóticos. Las propiedades cardioprotectoras que les han sido atribuidas destacan las siguientes:

- Antihiperlipémicas: En experimentos llevados a cabo con ratas, el OA ha demostrado ejercer un efecto antihiperlipidémico [392], gracias al control activo que ejerce de los niveles de expresión de genes lipogénicos hepáticos como acetil-CoA carboxilasa y glicerol-3-fosfato aciltransferasa [393].
- Antioxidantes: El MA ha mostrado un potente efecto antioxidante dosis-dependiente en la peroxidación de LDL *in vitro* [394], y también se ha demostrado su capacidad de reducir la generación de peróxido de hidrógeno por macrófagos estimulados de forma dosis-dependiente [395]. Resultados similares se han encontrado con OA en microsomas de hígado de rata aislados [396], así como con uvaol y eritrodiol [397].
- Hipoglicémicas: El MA ha demostrado también tener un efecto hipoglicémico mediante la reducción de la RI en modelos de ratones con DMT2 [398]. Resultados similares se han obtenido para OA de nuevo en ratas [393, 399] y en ratones obesos [400]. Adicionalmente, OA puede promover la señal de transducción de la insulina e inhibir la RI inducida por el estrés oxidativo y la gluconeogénesis [401].
- Vasodilatadoras: OA, MA, uvaol, y eritrodiol tienen también propiedades vasodilatadoras, mejorando la función endotelial, gracias a la estimulación de la producción endotelial de NO [402, 403] o por la inducción de una mayor liberación de prostaglandina I<sub>2</sub> [404]. Además, estos componentes ejercen efectos diuréticos y antidisrítmicos, por lo que pueden controlar la hipertensión y la isquemia cardíaca [405, 406].
- Antitrombóticas: Allouche et al. han demostrado que el uvaol y eritrodiol reducen significativamente la formación de trombina [394] y que son capaces de inhibir la proliferación celular. Además, se han encontrado estudios que han demostrado que OA reduce la muerte celular por apoptosis de las células vasculares del músculo liso inducida por peróxido de hidrógeno mediante la estimulación de la expresión y actividad

de HO-1 [407].

- Antiinflamatorias: Los triterpenos pentacíclicos cuentan con propiedades antiinflamatorias. Se ha observado que monocitos THP-1 humanos incubados con las TRL aisladas de sujetos con un elevado consumo de OA, hubo una reducción en la secreción de MCP-1 [408]. OA ha mostrado además ejercer un potente efecto inhibitorio de procesos celulares inflamatorios mediante la inducción de la NO sintasa y ciclooxigenasa 2 por IFN- $\gamma$  [409] o por inhibir la liberación de fosfolipasa A2 [410].

No obstante, a pesar del demostrado potencial antiaterogénico de los triterpenos consumidos con la dieta, se requieren más estudios para determinar su efecto beneficioso en humanos tras el consumo de aceite de oliva, dadas las bajas concentraciones a las que están presentes.

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## HIPÓTESIS

La obesidad es considerada la principal epidemia del siglo XXI debido a su crecimiento imparable entre la población mundial adulta y una prevalencia cada vez mayor entre la población infantil. Esta enfermedad, vista hoy día como un proceso inflamatorio crónico de bajo grado, se relaciona con un desorden en el metabolismo postprandial de los lípidos. Cuando éste se mantiene con el tiempo, acaba generando otras complicaciones como resistencia a la insulina, hiperglicemia e hipertensión. Es por ello que las personas obesas tienen mayor riesgo de desarrollar ECV, particularmente aterosclerosis, y se prevé que la obesidad será antes del año 2030 responsable del 80% de las muertes en todo el mundo.

Los costes globales que supone la obesidad en los Sistemas de Salud Pública son muy elevados, y cada vez serán mayores a medida que las enfermedades asociadas a la obesidad sigan manifestándose de forma progresiva. Por este motivo, reducir su prevalencia se ha convertido en una de las mayores prioridades para los sistemas sanitarios en muchos países tanto desarrollados como en vías de desarrollo.

El contenido graso de los alimentos ha demostrado ser una pieza clave en la determinación de una salud óptima en el individuo debido a su capacidad para influir sobre los factores de riesgo cardiovascular y de estar implicado directamente en el proceso aterosclerótico. Debido a ello, existe un gran interés por desarrollar e implementar estrategias efectivas para reducir los factores de riesgo por medio de las intervenciones dietéticas, pues han sido identificadas como una herramienta especialmente importante para terapias de prevención primaria y tratamientos secundarios.

Muchos son los trabajos científicos que han demostrado los beneficios aportados por la adherencia a los patrones alimentarios tradicionales de la dieta mediterránea frente a la mortalidad y los eventos clínicos cardiovasculares. Esto es posible gracias a su carácter antioxidante, antiinflamatorio, antitrombótico, su capacidad para prevenir la peroxidación lipídica y para mejorar en perfil lipídico y la función endotelial. Aunque los mecanismos de protección no son del todo comprendidos, una de sus características más destacables es su elevada concentración de grasas insaturadas, principalmente de MUFA proporcionados por el aceite de oliva como fuente de grasa mayoritaria, el cual representa hasta el 70% del total de los lípidos consumidos con esta dieta.

Los efectos antiaterogénicos proporcionados por los MUFA han sido ampliamente documentados, y se ha demostrado que ayudan a reducir no solo la dislipidemia, sino también la obesidad y su cuadro inflamatorio crónico, reduciendo con ello el resto de factores de riesgo que contribuyen con el síndrome metabólico y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas. En la actualidad, podemos encontrar en la literatura científica estudios sobre las propiedades cardioprotectoras proporcionadas por dietas ricas en grasas insaturadas, sin embargo, pocos han sido realizados con la participación de personas obesas.

**En este contexto, proponemos la hipótesis de que un desayuno tipo mediterráneo enriquecido en MUFA contribuye a mejorar el perfil lipídico postprandial y la respuesta inflamatoria presente en los sujetos obesos participantes del estudio, así como a reducir la formación de células espumosas durante las primeras fases del desarrollo de la aterosclerosis, con respecto a un desayuno de tipo occidental.**

## OBJETIVOS

**P**ara cumplir el presente propósito, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Valorar la influencia de una carga lipídica sobre el metabolismo lipídico postprandial e inflamación vascular en adultos obesos frente a controles normopesos.
2. Determinar los efectos diferenciales de un desayuno de tipo mediterráneo frente a un desayuno de tipo occidental sobre el metabolismo lipídico postprandial en adultos obesos.
3. Determinar los efectos diferenciales de un desayuno de tipo mediterráneo frente a un desayuno de tipo occidental sobre la síntesis de marcadores de inflamación en sujetos obesos con respecto a sujetos normopesos.
4. Estudiar el efecto de las lipoproteína ricas en triglicéridos postprandiales aisladas de adultos obesos sobre la formación de células espumosas.
5. Analizar la capacidad del componente lipídico de las lipoproteínas ricas en triglicéricos para modular la actividad de la LPL en macrófagos.

# MATERIALES Y MÉTODOS

# 1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA LIPÍDICA POSTPRANDIAL EN SUERO TRAS LA INGESTA DE UN DESAYUNO DE TIPO MEDITERRÁNEO Y UN DESAYUNO DE TIPO OCCIDENTAL EN ADULTOS OBESOS

## 1.1 Selección y características de los participantes del estudio

Un total de 24 sujetos fueron reclutados para participar en el presente estudio, todos ellos varones adultos con una edad media de  $26.2 \pm 4.3$  años. Se les tomó las medidas antropométricas y, atendiendo su índice de masa corporal (IMC), se les dividió en dos grupos: 12 controles o normopesos (IMC entre  $20-25 \text{ Kg/m}^2$ ) y 12 obesos (IMC  $> 30 \text{ Kg/m}^2$ ). La participación fue voluntaria, así como la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento.

Mediante historial médico se verificó que todos los voluntarios participantes del estudio carecían de problemas digestivos y de trastornos metabólicos, no tomaban suplementos alimenticios y no estaban bajo tratamiento con ninguna medicación. Además, todos ellos se sometieron a un análisis bioquímico y hematológico realizado por los profesionales sanitarios del Hospital Virgen del Rocío, para comprobar que se trataban de sujetos sanos y que no cumplían los criterios de exclusión establecidos, así como que presentaban unos valores de perfil lipídico plasmático dentro de los intervalos de referencia. En la tabla 2 se muestran los resultados del perfil lipídico plasmático y de los parámetros de bioquímica de los voluntarios obtenidos antes de comenzar el estudio. Los valores que se obtuvieron confirmaron que todos los participantes cumplían con los requisitos establecidos.

Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 2000), del Convenio del Consejo de Europa, y de la Declaración Universal de la UNESCO. Con este fin se elaboró un protocolo para el estudio con humanos que fue aprobado por el Comité Institucional para Investigación en Humanos del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Los sujetos voluntarios dieron consentimiento escrito a este protocolo después de ser convenientemente informados, tanto oralmente como por escrito, y fueron exhortados a evitar el consumo de bebidas alcohólicas y tabaco durante el día precedente al comienzo del experimento.

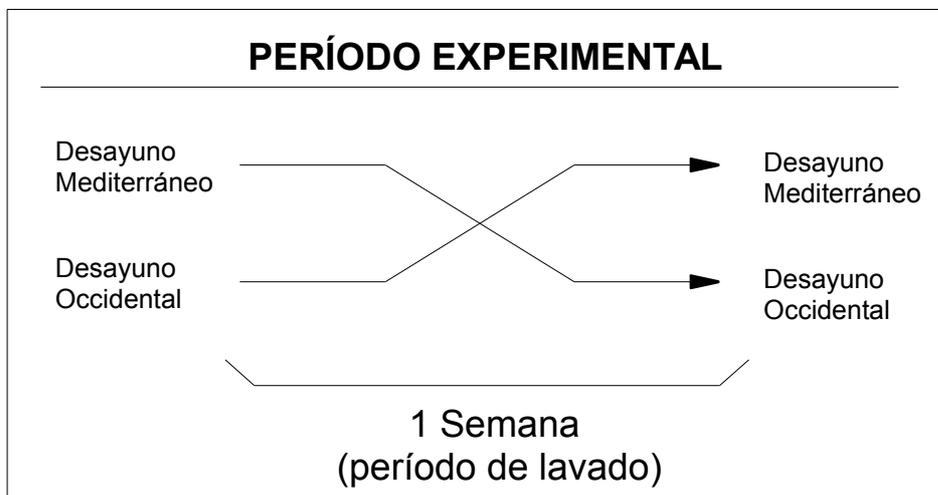
**Tabla 2** Características antropométricas, presión sanguínea, niveles basales de lípidos y concentración de glucosa e insulina en suero de los participantes del estudio.

Parámetros	Adultos	
	Normopesos	Obesos
Número de sujetos	12	12
Edad	27.3±3.0	35.8 ± 12.0*
Peso (Kg)	74.9 ± 7.8	112.9 ± 13.5****
Altura (cm)	179.6 ± 7.0	180.8 ± 5.2
IMC (Kg/m2)	23.2 ± 1.1	34.7 ± 5.0****
Presión sistólica (mmHg)	110.9 ± 12.7	130.8 ± 16.3**
Presión diastólica (mmHg)	68.9 ± 7.3	74.5 ± 10.1
Glucosa (mg/dl)	73.7 ± 4.7	83.6 ± 8.3**
Insulina (mU/ml)	4.9 ± 2.7	12.6 ± 3.5****
HOMA-IR	0.9 ± 0.5	2.4 ± 1.2****
Triglicéridos (mg/dl)	78.7 ± 24.5	129.7 ± 60.3*
Colesterol (mg/dl)	172.5 ± 32.6	202.9 ± 34.6*
LDL-c (mg/dl)	94.7 ± 19.4	158.7 ± 16.7****
HDL-c (mg/dl)	57.5 ± 9.5	45.9 ± 8.5**

Los datos están expresados como media ± SD; n=12 en todos los grupos. IMC: índice de masa corporal; HOMA-IR: modelo homeostático de medida de la resistencia a la insulina; LDL-c: colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad; HDL-c: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad. Las diferencias estadísticas entre los dos grupos fueron analizadas mediante test t de Student no pareado. \* =P <0.05, \*\*= P <0.01, \*\*\*\* =P <0.001 vs. Normopesos.

## **1.2 Diseño experimental de la intervención dietética**

La intervención dietética postprandial se realizó en dos etapas siguiendo el siguiente esquema de intervención:

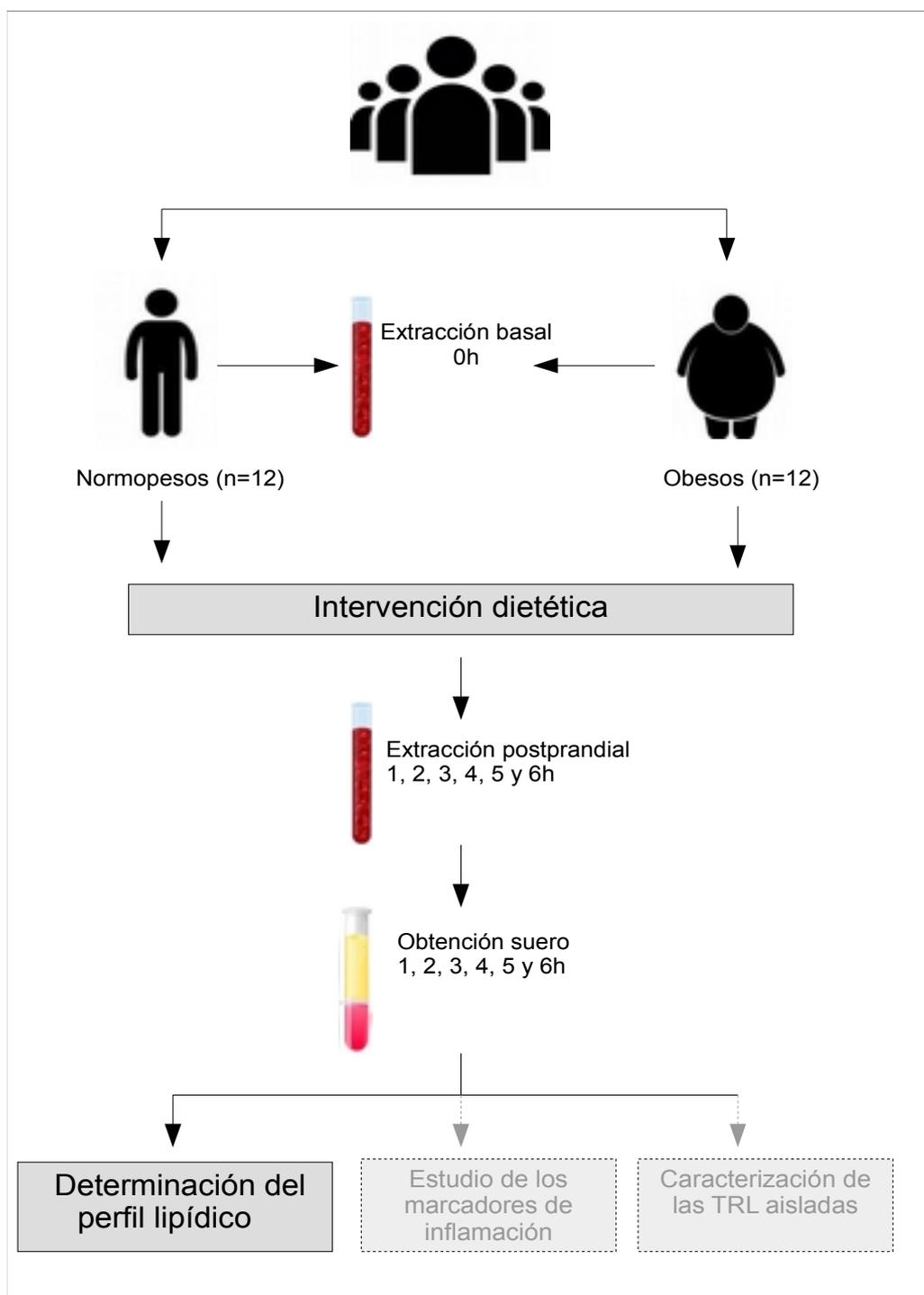


**Figura 9.** Esquema del diseño experimental.

Antes de comenzar con la ingesta de las dietas experimentales, se le realizó a los voluntarios una extracción de sangre para medir de los niveles basales de los parámetros a considerar, siendo esta muestra la correspondiente a las 0 horas del ensayo. Las dietas experimentales fueron administradas a los voluntarios como un único desayuno tras un ayuno de 12 horas. Al inicio del ensayo, los voluntarios consumieron uno de los tipos de desayuno estudiados (mediterráneo u occidental), realizando inmediatamente después la extracción de sangre a diferentes tiempos durante el periodo postprandial. Transcurrida al menos una semana de lavado para evitar interferencias entre períodos experimentales, se procedió con la segunda fase del ensayo. En ella, aquellos participantes que inicialmente consumieron el desayuno mediterráneo, en la segunda fase consumieron el desayuno occidental, y viceversa. Tras la ingesta de la dieta experimental de la segunda fase, de nuevo se llevó a cabo la toma de muestras sanguíneas en fase postprandial. De esta manera, todos los participantes del estudio consumieron ambos tipos de dietas experimentales, siguiendo un diseño aleatorizado y cruzado (figura 9).

### 1.3 Ensayo postprandial

El proceso seguido para la toma de muestras durante el ensayo postprandial y estudio posterior de la respuesta lipídica postprandial en suero de los voluntarios tras la ingesta de las dietas experimentales se representa en la figura 10.



**Figura 10.** Esquema representativo del proceso seguido para la toma de muestras sanguíneas de los voluntarios en ayunas y durante el periodo postprandial, con el fin de obtener el suero sobre el que se realizarán los análisis experimentales.

### 1.3.1 Extracción basal

Tras 12 horas de ayuno nocturno, a cada voluntario se le extrajo una muestra de 9 mL de sangre en condiciones basales por punción de la vena cubital con un sistema Smartsite™ equipado con vacutainer (Vacutainer®, Meylen, Cedex, Francia). La sangre fue recogida en tubos Vacuette® con separador para suero Clot Activator.

### 1.3.2. Ingesta de las comidas experimentales

Inmediatamente después de la extracción basal, los sujetos recibieron la comida experimental. Las dietas experimentales empleadas consistieron en un desayuno de tipo mediterráneo y un desayuno de tipo occidental. La cantidad de grasa administrada en ambos desayunos fue equivalente a 0.75 g por Kg de peso corporal de los voluntarios participantes del estudio.

- El **desayuno de tipo mediterráneo** se compone por aceite de oliva “Cardioliva®” (55 g), tomate natural triturado (20 g), pan “Panrico línea” (marca comercial) (tres rebanadas por voluntario; 23.7 g/rebanada), zumo de naranja (250 ml) y un vaso de leche desnatada (200 ml).

El aceite de oliva ingerido con el desayuno de tipo mediterráneo denominado “Cardioliva” fue proporcionado por la compañía Oleícola El Tejar S.C.A (El Tejar, Córdoba). Los datos de la composición de la fracción saponificable e insaponificable fueron facilitados por dicha compañía, y se detallan en la tabla 3.

- El **desayuno de tipo occidental** estaba formado por mantequilla (55 g), pan “Panrico línea” (tres rebanadas por voluntario; 23.7 g/rebanada) y un vaso de leche desnatada (200 ml) con cacao (20 g).

La mantequilla suministrada a los voluntarios fue una comercial, y la composición de AG y colesterol fue previamente analizada por nuestro laboratorio del Instituto de la Grasa. La composición de la mantequilla se indica también en la tabla 3.

**Tabla 3.** Composición de AG del aceite de oliva, como fuente de grasa del desayuno de tipo mediterráneo, y de la mantequilla, como fuente de grasa del desayuno de tipo occidental.

AG	Aceite de oliva		Mantequilla	
	MEDIA (%)	SD	MEDIA (%)	SD
10:0			1,77	0,03
12:0			2,66	0,03
14:0			10,15	0,04
14:1			1,13	0,01
16:0	9,94	0,02	33,18	0,17
16:1 n-7	0,81	0,00	2,33	0,04
18:0	3,31	0,01	13,85	0,07
18:1 n-9t			3,11	0,13
18:1 n-9c	77,69	0,05	27,47	0,11
18:2 n-6			3,47	0,03
18:3 n-3	1,14	0,01	0,56	0,02
20:0	0,45	0,02		
20:4 n-6			0,32	0,01

Los datos están expresados como: media  $\pm$  SD; n= 3 (aceite de oliva) y n=5 (mantequilla). La cantidad de cada AG se expresa como % del total de AG contenidos.

La composición de la comida experimental se detalla en la tabla 4, y fue recogida de la información declarada en los envases de cada uno de los alimentos incorporados en los desayunos.

**Tabla 4.** Tabla de la composición de los desayunos administrados.

	Desayuno tipo mediterráneo	Desayuno tipo occidental
Energía (kJ)	2022	1963
Energía (kcal)	485	471
Proteínas (g)	15	14
Hidratos de carbono (g)	62	53
Azúcares (g)	36	26
Grasas (g)	57	53
- Saturadas (g)	8	32
- Monoinsaturadas (g)	44	15
- Poliinsaturadas (g)	5	2
Colesterol (mg)	0	104
Fibra (g)	7	6,4

### **1.3.3 Extracciones de sangre durante el periodo postprandial y obtención del suero.**

Durante el periodo postprandial, se extrajeron muestras de sangre a los sujetos a las 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de la ingesta de los dos desayunos experimentales. Las muestras de sangre se recogieron en tubos Vacutainer®, de las mismas características que los empleados para la extracción basal, hora 0.

Una vez que todas las muestras de sangre fueron tomadas a las 0 horas y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas postprandiales, el suero fue separado mediante centrifugación a 3.000 rpm, durante 8 min a 15 °C en una centrífuga de rotor vasculante (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Alemania). El suero obtenido fue dividido en tres alícuotas: una de ellas fue empleada para la determinación del perfil lipídico de los voluntarios a las distintas horas postprandiales, una segunda alícuota se utilizó para determinar los marcadores de inflamación de los voluntarios tras la ingesta de las comidas experimentales a distintas horas postprandiales, y la tercera alícuota del suero se congeló a -80 °C hasta el momento de proceder al aislamiento de las TRL.

### **1.4 Determinaciones bioquímicas y estudio del perfil lipídico basal y postprandial en suero**

La concentración postprandial de glucosa, TG y colesterol en suero fue determinada mediante métodos enzimáticos colorimétricos (Triglyceride GPO-PAP y Cholesterol CHOD-PAP, Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania). La concentración de HDL-c se determinó por un método enzimático directo (HDL-C-plus 2nd generation, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), mientras que la concentración de LDL-c fue calculada mediante la fórmula de Friedewald [411]. Las concentraciones de apo B se determinaron mediante un ensayo inmunturbidimétrico (Tina-quant; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Todos estos análisis se realizaron de forma automatizada mediante el sistema modular Roche/Hitachi Modular Analytics V1.1 (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) ubicado en el HH.UU. Virgen del Rocío (Sevilla).

Los niveles de insulina fueron medidos a través de inmunoensayos (Abott Laboratorios, Maidenhead, UK) y el marcador del modelo de medición homeostático de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) fue calculado utilizando el software HOMA Calculator (Diabetes Trial Unit, Churchill Hospital, Oxford, UK).

## 2. ESTUDIO DEL PERFIL DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN POSTPRANDIALES EN SUERO DE ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS TRAS LA INGESTA DE LOS DESAYUNOS EXPERIMENTALES

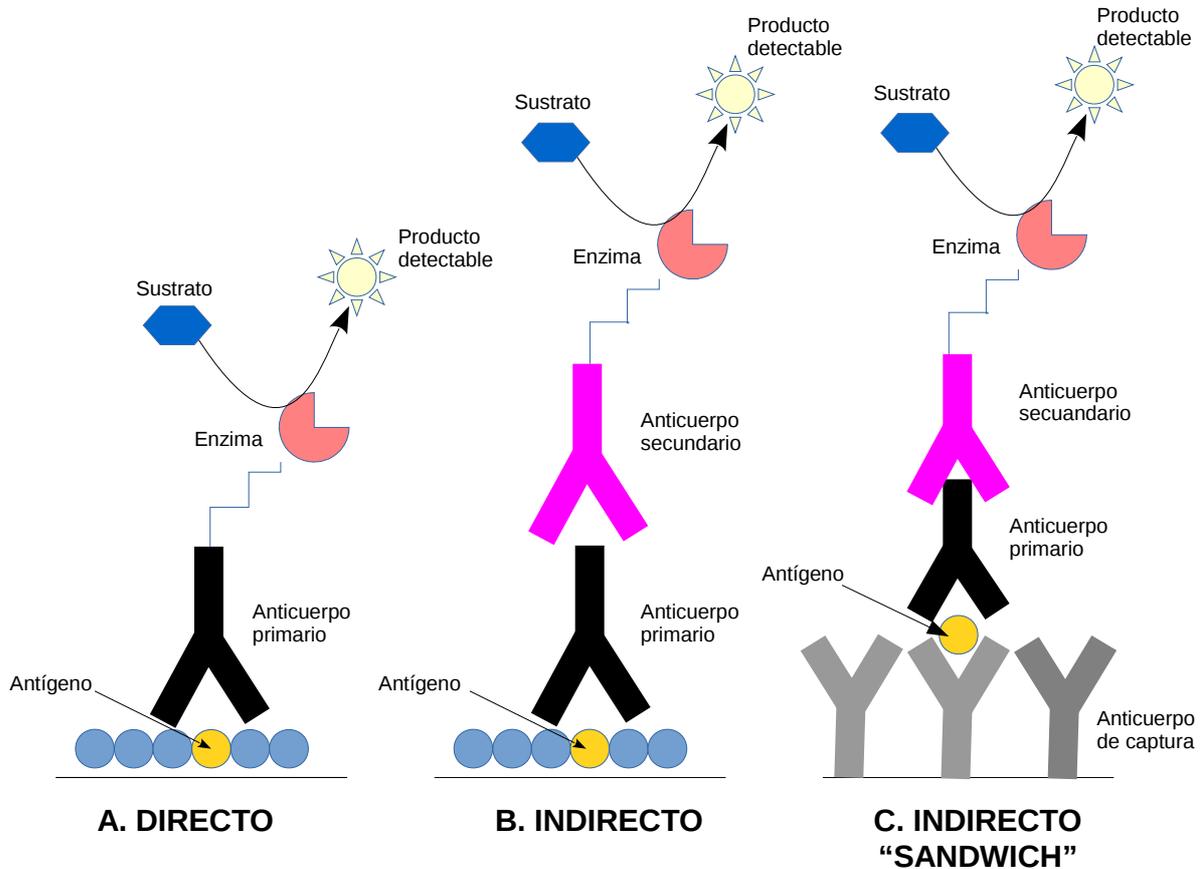
**P**ara medir la presencia de las adipoquinas, se empleó la técnica inmunoenzimática ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sobre el suero aislado de las muestras de sangre tomadas de los participantes del estudio.

### *Principio del ensayo*

La técnica de ELISA es un ensayo inmunoenzimático ampliamente utilizada en el diagnóstico médico, industria alimentaria y en el estudio y control del medio ambiente. Sin embargo, es en el área médica donde tiene mayor importancia para la cuantificación de moléculas, especialmente de aquellas que experimentan cambios en diferentes estados como pueden ser hormonas, anticuerpos, proteínas plasmáticas, antígenos tumorales y toxinas debido a infecciones por bacterias, virus, hongos o parásitos o fases activas de enfermedades autoinmunes.

Existen numerosas variantes de este tipo de ensayo. Entre ellos se encuentran los métodos directo e indirecto, ambos representados esquemáticamente en la figura 11. El método directo permite la detección del antígeno con un anticuerpo específico conjugado con una enzima como sistema de marcaje (figura 11.A). En el método indirecto existen a su vez dos tipos. Uno de los métodos indirectos es el que consiste en permitir que el antígeno reaccione con el anticuerpo primario específico. El anticuerpo primario, al cual está anclado el antígeno, será reconocido por un anticuerpo secundario que suele ser específico de especie, y que está conjugado con una enzima como sistema de marcaje. Esto permite que sea reconocido posteriormente por el complejo estreptavidina-peroxidasa (figura 11.B). El otro de los métodos indirectos consiste en una variante en la que previamente es necesario capturar al antígeno por un anticuerpo de captura que se encuentra forrando la superficie del pocillo donde tendrá lugar la reacción. El complejo formado anticuerpo-antígeno será reconocido por un anticuerpo primario que reconoce dominios constantes de anticuerpos, quedando así el antígeno anclado como un “sandwich” (figura 11.C). En ambos métodos, directo e indirecto, la reacción enzimática desarrolla color cuya intensidad es

detectada y medida espectrofotográficamente con un lector ELISA.



**Figura 11 Métodos del ensayo ELISA.** A: método directo; B: método indirecto; C: método indirecto tipo “sandwich”.

## 2.1. Medición de los niveles de adipocinas y citoquinas en suero

Una vez que el suero fue aislado de las muestras de sangre durante el ensayo postprandial, una de las alícuotas fue empleada para medir los niveles de los marcadores de inflamación basales y a las 2 y 4 horas tras la ingesta de los dos desayunos experimentales, el de tipo mediterráneo y el de tipo occidental.

■ Para la detección de los niveles de **adiponectina**, el procedimiento seguido fue el descrito en el protocolo del kit de ELISA específico para esta adipocina, adquirido a AssayPro (St. Charles, MO, USA). Se siguieron las mismas condiciones que indica el fabricante, las cuales se describen brevemente a continuación:

Una vez se han preparado los reactivos proporcionados por el kit, diluir la muestra de suero 1:500 en Mix diluyente (x1), y realizar una curva patrón de siete puntos cuyas concentraciones van de 30 a 0.78 ng/ml mediante diluciones seriadas del estándar de adiponectina proporcionado y reconstituido. Posteriormente, añadir 50 µl de muestra y estándar preparados en los pocillos correspondientes en la microplaca proporcionada. Cubrir la placa e incubar durante 1 hora. Lavar 5 veces con 200 µl de tampón de lavado, y añadir 50 µl por pocillo de anticuerpo específico de adiponectina biotinilado. Incubar nuevamente 1 hora. Lavar 5 veces la placa con 200 µl de tampón de lavado y añadir a continuación 50 µl de anticuerpo conjugado con estreptavidina-peroxidasa por pocillo. Transcurridos 30 minutos, se repite el lavado de la placa 5 veces con 200 µl de tampón de lavado. Añadir 50 µl de sustrato cromógeno por pocillo. Después de 10 minutos, añadir 50 µl de solución de parada y leer inmediatamente la absorbancia en un lector de microplacas, a una longitud de onda de 450 nm. Medir también la absorbancia a 570 nm y substrair dicha lectura a la obtenida a 450 nm para corregir imperfecciones ópticas. Determinar la concentración de la muestra desconocida a partir de la curva patrón preparada y multiplicar por el factor de dilución aplicado.

■ Para la detección de los niveles de la **leptina**, el procedimiento seguido fue el descrito en el protocolo del kit de ELISA específico, adquirido a AssayPro (St. Charles, MO, USA). Se siguieron las mismas condiciones que indica el fabricante, las cuales se describen brevemente a continuación:

Una vez se han preparado los reactivos proporcionados por el kit, diluir la muestra de suero 1:2 en Mix diluyente (1x), y realizar una curva patrón de cinco puntos con un rango de concentración de 32 a 0,125 ng/ml mediante diluciones seriadas del estándar de leptina proporcionado y reconstituido. Posteriormente, añadir 50 µl de la muestra y estándares preparados en los pocillos correspondientes de la microplaca proporcionada. Cubrir la placa e incubar durante 2 horas. Lavar 5 veces con 200 µl de tampón de lavado, y añadir 50 µl de anticuerpo específico de leptina biotinilado por pocillo. Incubar nuevamente 2 horas. Lavar 5 veces la placa con 200 µl de tampón de lavado y añadir a continuación 50 µl de anticuerpo conjugado con estreptavidina-peroxidasa por pocillo. Transcurridos 30 minutos, repetir el lavado de la placa 5 veces con 200 µl de tampón de lavado. Añadir 50 µl de sustrato cromógeno por pocillo e incubar 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación, añadir 50 µl de solución de parada y leer inmediatamente la absorbancia en un lector de microplacas, a una longitud de onda de 450 nm. Medir también la absorbancia a 570 nm y substrair dicha lectura a la obtenida a 450 nm para

corregir imperfecciones ópticas. Determinar la concentración de la muestra desconocida a partir de la curva patrón preparada y multiplicar por el factor de dilución aplicado.

■Para la detección de los niveles de la **ceruloplasmina**, el procedimiento seguido fue el descrito en el protocolo del Kit de ELISA específico, adquirido a AssayPro (St. Charles, MO, USA), bajo las mismas condiciones que indica el fabricante, las cuales se describen brevemente a continuación:

Una vez se han preparado los reactivos proporcionados por el kit, diluir la muestra de suero 1:400 en Mix diluyente (1x), y realizar una curva patrón de siete puntos cuyas concentraciones van de 40 a 0.625 µg/ml de ceruloplasmina mediante diluciones seriadas del estándar proporcionado y reconstituido. Posteriormente, añadir 25 µl de muestra y estándares en los pocillos correspondientes de la microplaca proporcionada e inmediatamente añadir 25 µl de anticuerpo específico de ceruloplasmina biotinilado por pocillo, mezclando suavemente. Cubrir la placa e incubar durante 2 horas. Lavar 5 veces con 200 µl de tampón de lavado, y añadir 50 µl por pocillo de anticuerpo conjugado con estreptavidina-peroxidasa. Transcurridos 30 minutos, repetir el lavado de la placa 5 veces con 200 µl de tampón de lavado. Añadir 50 µl de sustrato cromógeno por pocillo e incubar 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación, añadir 50 µl de solución de parada y leer inmediatamente la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450 nm. Medir también absorbancia a 570 nm y substraer dicha lectura a la obtenida a 450 nm para corregir imperfecciones ópticas. Determinar la concentración de la muestra desconocida a partir de la curva patrón preparada y multiplicar por el factor de dilución aplicado.

■Para la detección de los niveles de **IL-1β**, se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante del kit de ELISA GEN-PROBE de Diaclon (Besançon, Francia). Dichas instrucciones se describen brevemente a continuación:

Una vez se han preparado los reactivos proporcionados por el kit, se realiza una curva patrón de seis puntos con un rango de concentración de 250-7.8 pg/ml mediante diluciones seriadas del estándar de IL-1β proporcionado y previamente reconstituido. Añadir 200 µl de muestra de suero sin diluir, patrones, controles y blanco en los pocillos correspondientes de la microplaca y, a continuación, añadir a los mismos pocillos 50 µl del anticuerpo anti-IL-1β biotinilado. Cubrir la placa e incubar 3 horas. Lavar la placa 3 veces con 300 µl de solución de

lavado y añadir 100 µl de conjugado estreptavidina-HRP a todos los pocillos. Cubrir de nuevo e incubar 30 minutos. Lavar la placa 3 veces con 300 µl de solución de lavado y añadir 100 µl de solución del reactivo quimioluminiscente tetrametilbenzidina (TMB). Proteger de la luz e incubar 10-20 minutos. La reacción enzima-sustrato se detiene añadiendo 100 µl de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Medir inmediatamente la absorbancia en el lector de placas a 450 nm. Medir también la absorbancia a 620 nm y sustraer dicha lectura a la obtenida a 450 nm para corregir imperfecciones ópticas. Determinar la concentración de la muestra desconocida a partir de la curva patrón preparada.

■Para la detección de los niveles de **MCP-1**, se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante del Kit de ELISA adquirido a Boster (CA, EEUU), las cuales se describen brevemente a continuación:

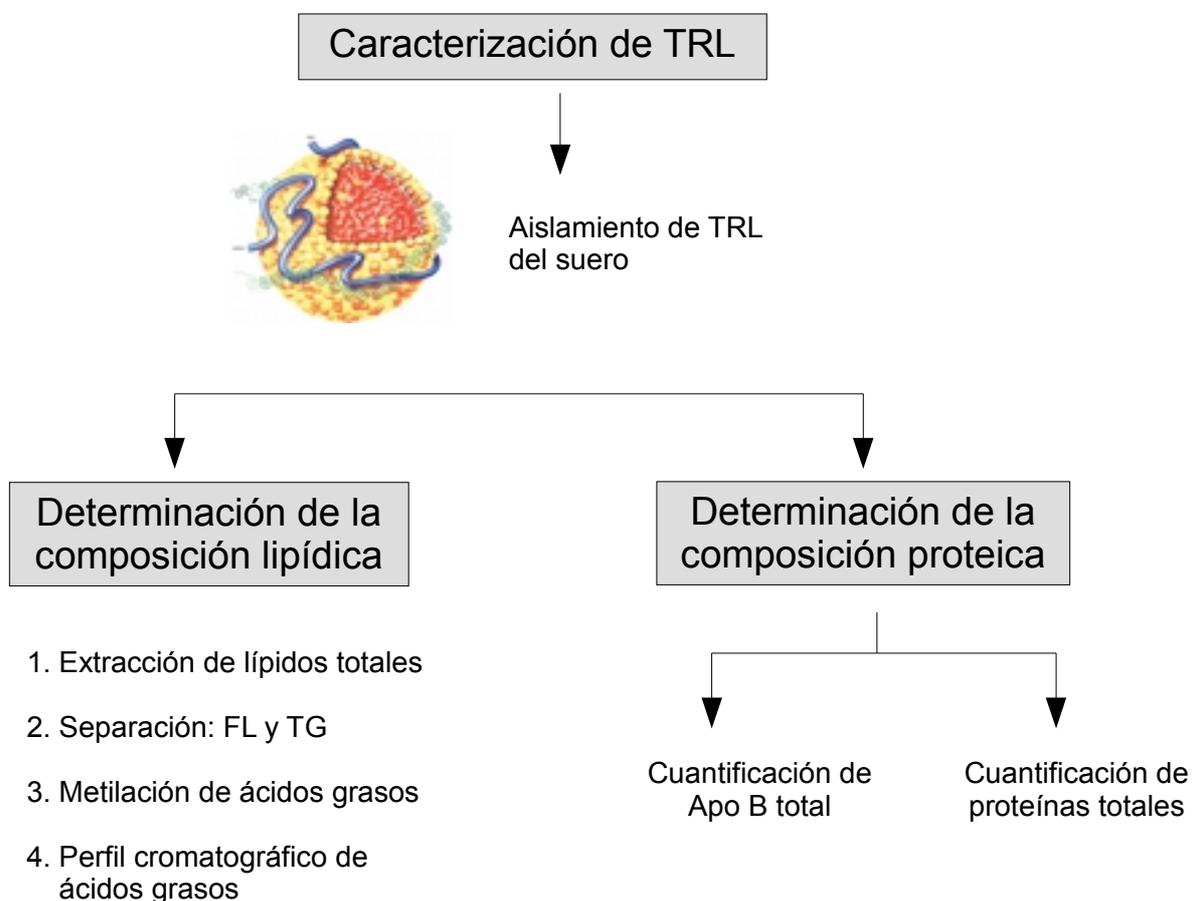
Una vez se han preparado los reactivos proporcionados por el kit, se realiza una curva patrón de ocho puntos con un rango de concentración de 1000-7.8 pg/ml de MCP-1 mediante diluciones seriadas del estándar de MCP-1 proporcionado y previamente reconstituido. Diluir las muestras de suero 1:10 con el tampón diluyente de la muestra. Añadir 100 µl de muestra, estándar y blanco en sus correspondientes pocillos de la microplaca proporcionada. Tapar la placa e incubarla durante 90 minutos a 37°C. Transcurrido el período de incubación, desechar el contenido de la placa sin lavar, y añadir 100 µl de anticuerpo anti-MCP-1 biotinilado. Incubar durante 1 hora a 37°C. Lavar tres veces con 200 µl de 1x tampón fosfato salino (Phosphate Buffer Saline, PBS) 0.01M. Añadir 100 µl de solución avidina-biotina-peroxidasa (ABC) precalentado a cada pocillo e incubar 30 minutos a 37°C. Lavar cinco veces con 1x PBS 0.01M y añadir 90 µl del reactivo quimioluminiscente TMB. Incubar durante 25-30 minutos a 37°C en oscuridad. Añadir a continuación 100 µl de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de parada. Pasados 30 minutos después de parar la reacción, proceder a leer la absorbancia a 450 nm de longitud de onda. Determinar la concentración de la muestra desconocida a partir de la curva patrón preparada y multiplicar por el factor de dilución aplicado.

■Para la detección de los niveles de **TNF-α**, se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante del Kit de ELISA de Bionova científica S.L. (Madrid, España). Dichas instrucciones se describen brevemente a continuación:

Una vez se han preparado los reactivos proporcionados por el kit, realizar una curva patrón de seis puntos con un rango de concentración de 400-12.5 pg/ml mediante diluciones seriadas del estándar de TNF- $\alpha$  proporcionado y previamente reconstituido. Añadir 200  $\mu$ l de muestra de suero sin diluir, estándares, controles y blanco en los pocillos correspondientes de la microplaca y, a continuación, añadir a los mismos pocillos 50  $\mu$ l del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  biotinilado. Cubrir la placa e incubar 3 horas. Lavar la placa 3 veces con 300  $\mu$ l de solución de lavado y añadir 100  $\mu$ l del anticuerpo conjugado con estreptavidina-HRP a todos los pocillos. Cubrir de nuevo e incubar 30 minutos. Lavar la placa 3 veces con 300  $\mu$ l de solución de lavado y añadir 100  $\mu$ l de solución TMB a todos los pocillos. Proteger de la luz e incubar 12-15 minutos. La reacción enzima-sustrato se detiene añadiendo 100  $\mu$ l de solución H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Medir inmediatamente la absorbancia en el lector de placas a 450 nm. Medir también la absorbancia a 620 nm y substrair dicha lectura a la obtenida a 450 nm para corregir imperfecciones ópticas. Determinar la concentración de la muestra desconocida a partir de la curva patrón preparada.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS POSTPRANDIALES

**T**ras haber realizado el estudio de la influencia de dos fuentes de grasa diferentes, aceite de oliva y mantequilla, proporcionadas por los desayunos experimentales (mediterráneo y occidental) sobre el perfil lipídico postprandial y parámetros bioquímicos en adultos obesos, se analizó la composición lipídica de las partículas de TRL sintetizadas tras la ingesta de los desayunos. Para ello, se caracterizará la composición de las TRL aisladas a nivel lipídico y proteico (figura 12).



**Figura 12.** Esquema del proceso seguido para la caracterización de las TRL aisladas de los sueros de los pacientes, que fueron obtenidos de las muestras de sangre extraídas antes (0 h) y 2 h y 4 h después de consumir las dietas experimentales.

### **3.1 Aislamiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de suero**

Las TRL (densidad <0.93 Kg/L) fueron obtenidas a partir de 4-4.5 ml de suero depositado bajo 7 ml de una solución de NaCl al 0.9% (m/v) (densidad 1.006 Kg/L) contenida dentro de tubos Polyallomer™ (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, EEUU). Las TRL se aislaron mediante ultracentrifugación como describieron Mills et al. (1986) (39.000 rpm, 16 horas, 12°C), utilizando un rotor SW 41 Ti en una ultracentrífuga preparativa Beckman Coulter L90K (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, EEUU). Tras el proceso de separación, se recogió la fase blanquecina que quedó separada por flotación en la parte superior del tubo.

### **3.2 Caracterización de la composición de las lipoproteínas ricas en triglicéridos**

#### **3.2.1 Extracción de lípidos totales de las TRL**

Los volúmenes de TRL obtenidas a partir del suero, fueron ajustados a 1.5 ml de volumen final con una solución de cloruro potásico (KCl) 0.1 M (Merck, Darmstadt, Alemania). Seguidamente, los lípidos totales fueron extraídos siguiendo una modificación del método de Folch *et al.* [412], como se describe a continuación.

Las TRL se colocaron en un tubo cónico y se añadieron 5 ml de cloroformo:metanol (2:1, v/v) (BDH/Prolabo, París, Francia). Tras agitarse vigorosamente durante 1 minuto, los tubos permanecieron en reposo hasta separarse dos fases bien diferenciadas con una pequeña interfase entre ambas. En caso de no obtener dicha separación, se añadieron varias gotas de KCl 0.1 M y se agitó vigorosamente de nuevo, seguido de un período de reposo. Con el fin de favorecer el proceso de separación de las fases, se centrifugó a 3.000 rpm durante 10 minutos y se obtuvieron tres fases: en la parte superior, la *fase metanólica o hidroalcohólica*, formada por metanol y la solución de KCl; en el centro, la *interfase*, que contenía precipitados de proteínas, y puede presentar lípidos adsorbidos sobre éstas; y por último, en la parte inferior se encontraba la *fase clorofórmica* que contenía los lípidos.

La fase clorofórmica fue recogida y filtrada sobre un papel de filtro Whatman nº1 (Whatman Paper Ltd., Maidstone, Reino Unido) que contenía sulfato sódico anhidro (Merck, Darmstadt, Alemania), con el objeto de retener las trazas de agua que pudieran haber sido

arrastradas, y se colocó en un tubo para evaporador.

La fase acuosa fue lavada con 2 ml de la mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v) que se añadieron al tubo original. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 1 minuto y se centrifugaron de nuevo a 3.000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de rotor vasculante (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Alemania). La fase clorofórmica se recogió y se añadió a la obtenida anteriormente tras su filtración.

Una vez finalizada la segunda extracción, el extracto clorofórmico fue evaporado a sequedad con ayuda de un rotavapor (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a una velocidad de rotación de 160 rpm. El rotavapor estaba acoplado a un baño con agua destilada a 40 °C y a una bomba de vacío para acelerar el proceso.

Los lípidos obtenidos se redisolviéron en 0.5 ml de cloroformo:metanol (2:1, v/v), del cual se tomó una alícuota de 200 µl para la separación de TG y FL mediante extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE). Los viales, herméticamente cerrados con tapón de teflón, se mantuvieron a -20 °C, en atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación de los lípidos hasta el momento de su procesamiento.

### **3.2.2 Separación de fracciones de lípidos mediante extracción de fase sólida**

Los TG y FL presentes en la fracción de lípidos totales se aislaron mediante extracción en fase sólida (SPE). Esta técnica está basada en el mismo principio que la cromatografía líquida, por lo que en el interior de dichas columnas tienen lugar fuertes interacciones de tipo reversible entre el analito y la fase estacionaria. Los procesos de separación en fase normal implican: un analito polar disuelto en una matriz de polaridad media o no polar y una fase estacionaria polar, formada por grupos polares unidos a una superficie de sílice. La retención de un determinado analito bajo las condiciones de una columna normal se debe, principalmente, a interacciones entre los grupos funcionales polares del analito y los grupos polares sobre la superficie del adsorbente. Los compuestos absorbidos por estos mecanismos son eluidos al pasar a través de la columna un solvente que altere su mecanismo de unión, normalmente un solvente más polar que la matriz original de la muestra.

En nuestro estudio se emplearon columnas de fase normal tipo LC- Diol que presentan grupos hidroxilo unidos a la sílice (Supelclean™ LC-Diol, Supelco, Bellefonte, EEUU) con 3 ml de capacidad y 45  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula. Las columnas LC-Diol se colocaron en un sistema de elución acoplado a una bomba de vacío y se acondicionaron lavando con dos volúmenes de hexano (3ml x 2), evitando que la columna volviera a sequedad tras el segundo lavado. A continuación, se dispusieron 200  $\mu\text{l}$  de lípidos totales sobre las columnas. Una vez entró la muestra en contacto con la columna, se añadieron dos volúmenes de hexano:cloruro de metileno (9:1, v/v) (VWR Chemicals, Int., EEUU ) y se dejaron pasar por la columna para recoger los TG eluidos en el tubo correspondiente.

Para obtener los FL se añadió un volumen de metanol seguido de otro volumen de acetona (VWR Chemicals, Int., EEUU), que tras su paso a través de la columna arrastraron los FL eluyéndolos en los tubos preparados para tal efecto. Finalmente, se lavó la columna con cinco volúmenes de acetona y se secó bajo corriente de nitrógeno.

Los TG y FL obtenidos fueron llevados a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se redisolviaron en 500  $\mu\text{l}$  de cloroformo:metanol (1:1, v/v). Los TG y FL aislados serán empleados para el análisis de los ésteres metílicos de AG mediante la técnica de cromatografía de gases (CG).

### **3.2.3 Análisis de ésteres metílicos de AG de triglicéridos y fosfolípidos**

La determinación de la composición de AG de TG y FL se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (GC). La GC es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La CG se desarrolla en una columna cerrada en la que se encuentra retenida la fase estacionaria y por la que se hace pasar el gas portador, siendo la técnica de separación la elución. Iniciado el proceso cromatográfico los componentes de la mezcla se distribuyen entre la fase estacionaria y la fase móvil, por lo que la elución tiene lugar forzando el paso de un gas inerte a través de la columna. A diferencia de otros tipos de cromatografía la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito y su única función es la de transportar la muestra a través de la columna.

Para ello, los AG fueron previamente derivatizados a ésteres metílicos de ácidos grasos (fatty acid methyl esters, FAME) de bajo punto de ebullición, siguiendo el procedimiento de metilación en caliente basado en el método B del anexo 10 contenido en el Reglamento de la UE CE 2568 /91 (punto 4.2 del método IUPAC nº 2.301). El principio por el que se obtienen los FAME a través de este método se basa en una neutralización de los AG libres y una metanólisis de los glicéridos, seguida de una esterificación de los AG en medio ácido.

Con este fin, las alícuotas de 200 µl de TG y FL fueron transferidas a tubos de metilación, donde el disolvente fue evaporado a sequedad en corriente de nitrógeno empleando un evaporador conectado a corriente de nitrógeno (Techne Dri-Block DB-3D, Bibby Scientific Limited, Stone, Reino Unido). Tras añadir un plato poroso a los tubos de metilación, las fracciones lipídicas fueron saponificadas por la acción de 10 ml de metóxido sódico (Alfa Aesar, Massachusetts, EEUU) a una concentración del 0.5% en metanol anhidro (m/v) y calentamiento durante 30 minutos a 80°C en un termobloque (Grupo-Selecta, Barcelona, España). Los FAME se formaron tras una neutralización con aproximadamente 2 ml de ácido sulfúrico (Sigma Aldrich, Missouri, EEUU) al 6% (v/v) en metanol anhidro, que se visualizó gracias a la presencia de fenoltaleína (Scharlau, Barcelona, España) añadida previamente; y después de un segundo calentamiento de 10 minutos a 80°C, en el caso de FL fueron otros 30 minutos. Tras atemperar los tubos, con el fin de favorecer la separación de las distintas fases para el proceso de extracción, se añadieron 6 ml de una disolución saturada de NaCl (Sigma-Aldrich, Missouri, EEUU) y se agitó suavemente. Para la extracción de los FAME se añadieron 2 ml de hexano, se agitó vigorosamente, y tras un período de reposo se recogió la fase superior (hexano). Esta operación se repitió dos veces más para optimizar la extracción. El hexano recogido se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno y los FAME se redisolviéron en 100 µl de hexano. Los FAME se mantuvieron bajo refrigeración en tubos herméticamente cerrados hasta proceder con el análisis cromatográfico.

Un volumen de 2 µL de los FAME resultantes fueron inyectados en el cromatógrafo de gases con la ayuda de una microjeringa integrada en un inyector automático Hewlett-Packard 6890 Series (Hewlett-Packard, Avondale, EEUU) acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II (Hewlett-Packard, Avondale, EEUU) y controlado por una estación de datos ChemStation Rev. A-03-02 (Hewlett-Packard, Avondale, EEUU). El cromatógrafo, equipado con un detector de ionización de llama (Flame Ionization Detector, FID) separó los FAME gracias a una columna capilar de sílice fundida BPX70 SGE Analytical Science (Trajan,

Victoria, Australia) de 10 m de longitud, 0.1 mm de diámetro interno y 0.2  $\mu\text{m}$  de film de recubrimiento interior. Como gas portador se empleó nitrógeno a 2.0 bares de presión, además de una presión de 1.5 bares de aire y 1.5 bares de hidrógeno. Las temperaturas del detector y del inyector se mantuvieron constantes a 270 °C, mientras que la del horno varió a lo largo del análisis, partiendo de una temperatura inicial de 190 °C, para pasar a una rampa de 5 °C/min, con la que se alcanzaron los 250 °C, y terminar en régimen isoterma hasta el final del análisis. Todo el proceso supuso un tiempo total de 12 minutos. Los AG fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los patrones inyectados en las mismas condiciones. La cuantificación se llevó a cabo mediante el cálculo del porcentaje relativo de cada FAME respecto al total.

### **3.3 Caracterización de la composición proteica en las lipoproteínas ricas en triglicéridos**

#### **3.3.1 Cuantificación del contenido de apolipoproteína B total en TRL**

La cantidad de apo B total se determinó mediante inmunoturbidimetría. El kit utilizado (BioSystems, Barcelona, España) permite que la apo B presente en la muestra precipite en presencia de los anticuerpos de cabra específicos que contiene. La dispersión de la luz generada por los complejos antígeno-anticuerpo es proporcional a la concentración de apo B y puede ser cuantificada por turbidimetría. Las medidas de turbidez se tomaron a 340 nm con un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU). Las condiciones del ensayo fueron las indicadas por el fabricante, a excepción de la curva de calibrado con la que calcular la concentración de apo B, la cual se elaboró a partir del patrón apo B, con cinco puntos cuyas concentraciones estaban comprendidas entre 0- 1.278  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

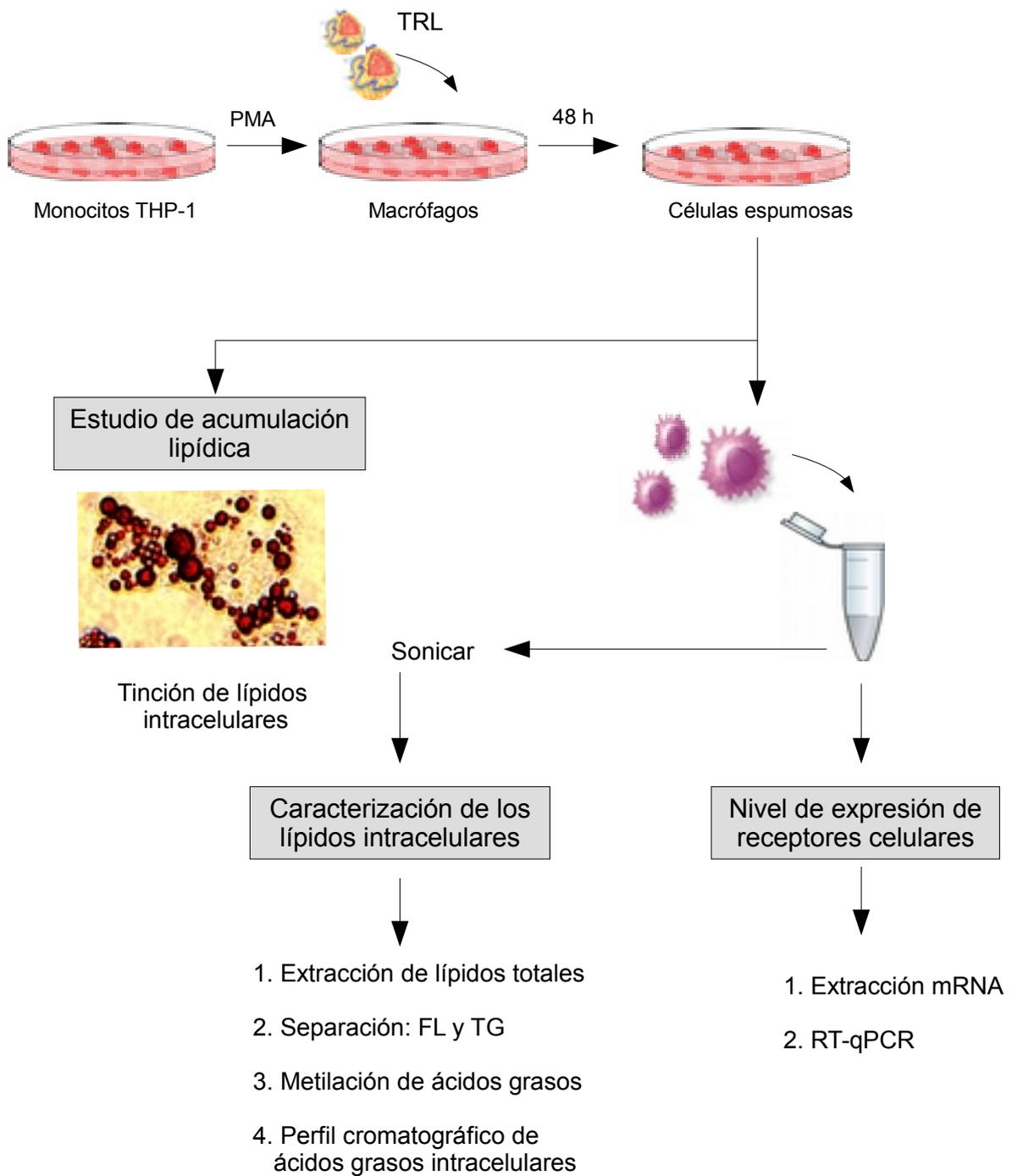
### 3.3.2 Determinación del contenido proteico de las TRL

La concentración de proteína total en la fracción de TRL se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Bradford [413], utilizando el reactivo Bradford 5x (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania). El método de Bradford se basa en el cambio que se produce en el espectro de color del reactivo Comassie Brilliant Blue G-250 al unirse con proteínas y que resulta en un cambio de su absorbancia máxima, pasando de 465 nm a 595 nm.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos y los valores de absorbancia se registraron en un lector de placas de Thermo Scientific Multiskan Spectrum (Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU), a 595 nm tras 15 segundos de agitación. Para el ensayo, se diluyeron 20  $\mu$ l de TRL hasta la mitad de su concentración (1:2), por lo que se añadieron 20  $\mu$ l de una solución de NaCl al 0.9% (m/v). La recta de calibrado se elaboró con albúmina de suero bovino (BSA) a distintas concentraciones (200-700  $\mu$ g/ml) en NaCl al 0.9% (m/v). En cada pocillo se dispusieron 10  $\mu$ l de muestra y 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Todas las placas incluyeron una recta de calibrado y un blanco, realizado con NaCl al 0.9% (m/v). Por último, la reacción se dejó reposar en oscuridad durante 15 minutos antes de medir su absorbancia a 595 nm en el lector de placas.

#### 4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS LIPOPROTEINAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS POSTPRANDIALES EN LA FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS

**U**na vez la composición de las TRL ha sido caracterizada, procedemos a estudiar *in vitro* la capacidad del componente lipídico de las TRL para modular la captación de las partículas por los macrófagos a través de su interacción con los receptores celulares de superficie. De esa manera, se evaluará su efecto en el proceso de formación de células espumosas por la acumulación de lípidos intracelularmente. La figura 13 representa el proceso experimental que se ha seguido en esta parte del estudio.



**Figura 13.** Diseño del proceso experimental seguido en el estudio de la influencia de las TRL postprandiales sobre el proceso de incorporación en macrófagos y la posterior formación de células espumosas.

## **4.1 Cultivos celulares de monocitos THP-1 y diferenciación a macrófagos**

Los experimentos *in vitro* se llevaron a cabo con la línea celular de monocitos humanos THP-1 (línea celular de leucemia monocítica humana). Esta línea celular se utiliza como modelo para el estudio de enfermedades cardiovasculares ya que proporcionan una población homogénea de células diferenciadas a macrófagos tras ser tratadas con ésteres de forbol [414].

Las células fueron suministradas por *The European Collection of Cell Cultures* (Public Health England Culture Collection, Salisbury, Gran Bretaña) en fase de crecimiento exponencial en suspensión.

### **4.1.1 Medio de mantenimiento y determinación de la viabilidad celulares**

Las células THP-1 se mantuvieron en suspensión, a una densidad de  $(3-9) \times 10^5$  células/ml, en medio RPMI 1640 suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino previamente inactivado (a 56°C durante 30 minutos), 2 mM L-alanil-glutamina, penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 µg/ml), a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> /95% aire. La viabilidad celular se determinó con la técnica de exclusión del azul tripán al 0.4% en una proporción 1:1 (v/v) y se contaron en la cámara de Neubauer. La viabilidad de las células se mantuvo superior al 95 % en todos los experimentos.

El medio de cultivo RPMI 1640 con L-glutamina y el suero fetal bovino se obtuvieron de Biowest SAS (Nuaille, Francia). El azul tripán de Alfa Aesar (Massachusetts, EEUU) y la Penicilina–Estreptomycin (5000 U/ml) fue adquirida a Gibco (Paisley, UK).

### **4.1.2 Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos**

Tras alicuotar los monocitos a una densidad de  $8 \times 10^5$  cel/ml en placas de cultivo de 6 pocillos (área de cultivo de 9,6 cm<sup>2</sup>/pocillo) en un volumen final de 2 ml/pocillo, se indujo su diferenciación celular a macrófagos añadiendo a la suspensión celular 13-acetato-12-miristato de forbol (Phorbol 12-myristate-13-acetate, PMA) (Sigma-Aldrich, Poole, Reino Unido) a una concentración final de 200 ng/ml. Las placas sembradas se mantuvieron durante 72 horas a 37°C

en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> /95% aire. Transcurrido ese período de incubación, las células diferenciadas crecieron adheridas a la placa de cultivo. El exceso de éster de forbol, así como las células indiferenciadas, se retiraron de la placa de cultivo mediante tres lavados con medio de cultivo, y se mantuvieron las 24 horas siguientes con medio de mantenimiento con suero para favorecer su viabilidad y adherencia antes de comenzar con los estudios de acumulación lipídica.

## **4.2 Estudio de la acumulación lipídica en macrófagos**

### **4.2.1 Tinción con aceite rojo O**

La incorporación lipídica en el interior de los macrófagos THP-1 tras su incubación con TRL se ensayó histológicamente mediante tinción con “aceite rojo O”, un colorante altamente hidrofóbico que presenta alta afinidad por los lípidos.

Los monocitos THP-1 tratados con PMA fueron sembrados en placas de 6 pocillos (área de cultivo de 9,6 cm<sup>2</sup>/pocillo) a una densidad celular de 8x10<sup>5</sup> células/ml en un volumen final de 2 ml/pocillo. Tras su diferenciación a macrófagos, el exceso de éster de forbol y las células indiferenciadas se lavaron con 1ml de medio de cultivo/pocillo (x3), y se mantuvieron 24 horas en incubación con medio de mantenimiento con suero y sin PMA. A continuación, para realizar el estudio de acumulación lipídica, se sustituyó el medio de cultivo por 1 ml de medio de mantenimiento sin suero, y a éste se añadió el volumen necesario de TRL para alcanzar una concentración de 25 µg apo B/proteína total por cultivo.

Tras 48h de incubación a 37°C, las células se lavaron con 1x PBS, 1 ml/pocillo (x3) y se trataron con 1 ml de isopropanol al 60% en agua (v/v) durante 2 minutos. Una vez que el isopropanol fue retirado, se añadió 1 ml del colorante aceite rojo O (0.2% (m/v) en isopropanol al 40% en agua (v/v)) y se incubó con las células a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de eliminar el colorante, se lavaron las células con 1 ml de PBS (x3) y se añadió 2 ml de glicerol al 30% en agua (v/v) para preservarlas. Las células se visualizaron con un microscopio invertido Motic AE21 Series (Barcelona, España) acoplado a una cámara Moticam 2500 5.0M Pixel Live Resolution (Motic, Barcelona, España) con la que se capturaron imágenes de los pocillos (40X).

## **4.2.2 Caracterización de los AG acumulados en el interior de los macrófagos**

Para la realización de este estudio se determinó la concentración de apo B total y proteína total de las TRL aisladas como se indica en los apartados 3.3.1 y 3.3.2. Posteriormente, los monocitos diferenciados a macrófagos se incubaron con las partículas a una concentración de 25 µg apo B/proteína, y tras un período de 48 horas de incubación, las células fueron recogidas para realizar los estudios de acumulación lipídica intracelular.

### 4.2.2.1 Ensayos de acumulación lipídica

Los monocitos THP-1 tratados con PMA fueron sembrados en placas de 6 pocillos a una densidad celular de  $8 \times 10^6$  células/ml en un volumen final de 2 mL/pocillo. Tras su diferenciación a macrófagos y los correspondientes lavados, se añadieron a la placa 1.5 mL de medio de mantenimiento sin suero para realizar el experimento. A continuación, se añadió el volumen necesario de TRL para alcanzar una concentración de 25 µg de apo B/proteína total.

Tras 48 horas de incubación a 37°C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub> /95% aire, las células fueron lavadas con 1x PBS, 1ml/pocillo (x3). Para obtener las células se añadieron 400 µl de 1x PBS y se despegaron mediante raspado, se recogieron y se depositaron en un tubo eppendorf en hielo. Se realizó un segundo raspado del cultivo celular tras añadir 300 µL de 1x PBS, obteniéndose un volumen final aproximado de 700 µl/pocillo.

Del volumen total, 350 µl fueron almacenados a -80°C hasta su empleo para los estudios de expresión de receptores. Los 350 µl de células restantes se lisaron mediante sonicación durante 5 seg (x2) a 50 Watios de potencia en un sonicador Bandelin Sonopuls HD2070 (Bandelin electronic, Berlin, Alemania). De dicho lisado celular, 300 µl fueron empleados para caracterizar los lípidos acumulados intracelularmente en los macrófagos tras su incubación con las TRL. Para caracterizar el contenido lipídico intracelular, 300 µl del lisado se trasvasó a un tubo largo de vidrio para proceder a su extracción lipídica, separación en TG y FL y posterior metilación de AG y análisis por CG, siguiendo el mismo procedimiento ya indicado anteriormente en la sección 3.2.3.

Los ensayos de acumulación lipídica con las diferentes muestras de TRL aisladas por voluntario fueron realizados por duplicado, según la hora postprandial a la que se obtuvieron (0, 2 y 4 horas) y el tipo de desayuno ingerido (mediterráneo u occidental). De tal manera que el número de ensayos por cada voluntario fue igual a doce, y se repitió tantas veces como voluntarios participaron en el estudio.

### **4.3 Estudio de los niveles de expresión de los receptores celulares de superficie implicados en los procesos de captación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en macrófagos**

Para realizar este estudio las TRL se incubaron con monocitos diferenciados a macrófagos con PMA y se determinó la expresión relativa de ARNm de receptores en macrófagos relacionados con la formación de células espumosas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction, PCR) a tiempo real o cuantitativa (quantitative PCR, qPCR).

Las muestra recogidas para este estudio proceden del ensayo de acumulación lipídica descrito en el apartado anterior, de forma que el análisis de la modulación ejercida por las TRL sobre los niveles de expresión de los receptores celulares de superficie de macrófagos se realizó a las 48 horas tras la incubación de las células con las partículas.

Para evitar la posible influencia de los lípidos presentes en el suero fetal bovino sobre la expresión de receptores, así como interferencias entre éstos y las TRL en el proceso de captación de lípidos por parte de las células, se utilizó medio de mantenimiento sin suero durante el período de incubación en el que los macrófagos estuvieron expuestos a las TRL.

#### **4.3.1 Tratamiento de las células**

Los monocitos THP-1 tratados con PMA fueron sembrados en placas de 6 pocillos a una densidad celular de  $8 \times 10^5$  células/ml en un volumen final de 2 ml/pocillo. Tras su diferenciación a macrófagos y los correspondientes lavados con medio de mantenimiento sin suero, se añadieron a cada pocillo 1.5 ml de medio, también sin suero, y se añadió el volumen necesario de

TRL para alcanzar una concentración de 25 µg apo B/proteína total. Tras 48 horas de incubación a 37 °C en una atmósfera con 5% CO<sub>2</sub>/95% aire, se retiró el medio y se lavaron los pocillos con 2 ml de 1x PBS templado.

#### 4.3.2 Extracción de ARN total y cuantificación del ARN mensajero

La extracción de ARN total de las células se realizó sobre un volumen de 350 µl de células obtenidas tras el raspado celular del cultivo de células espumosas formadas tras el ensayo de acumulación lipídica.

Para evitar la degradación del ARN por ARNasas, se utilizó material estéril y agua destilada autoclavada y tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) durante todo el procedimiento. La extracción de ARN total de las células se realizó siguiendo las indicaciones para el aislamiento de ARN con TRIsure™ de Bioline (Londres, Reino Unido), según se detalla a continuación:

La suspensión de células fue centrifugada a 2000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 800 µl de TRIsure para realizar el lisado de las células, homogeneizando el reactivo y el pellet de células con ayuda de la pipeta. A continuación se añadió 0,16 ml de cloroformo a la muestra, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y tras un tiempo de incubación de 2-3 minutos a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó (12000 x g, 15 minutos, 2-8°C) favoreciendo su separación en 3 fases: la fase fenolclorofórmica, una interfase, y la fase superior acuosa e incolora que contenía el ARN. Posteriormente, se procedió a transferir la fase acuosa a otro tubo eppendorf para precipitar el ARN extraído. Para ello, a la fase acuosa se le añadió 0,4 ml de alcohol isopropílico y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó la muestra durante 10 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó (12000 x g, 15 minutos, 2-8°C). Tras eliminar el sobrenadante, se procedió a lavar el ARN precipitado con 1 ml de etanol 75%. Se empleó el vortex para lavar eficazmente la muestra y a continuación se centrifugó a 7500 x g, 5 minutos a 2-8°C. El etanol fue retirado, el ARN se disolvió en un volumen de 25 µl de agua tratada con DEPC y se procedió a incubar la muestra durante 5 minutos a 55-60°C. Transcurrido ese tiempo, el tubo eppendorf que contenía el ARN se transfirió de inmediato a hielo.

La concentración y pureza del ARNm extraído se determinó por medida de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ) directamente en Nanodrop Lite (Spectrophotometer, Thermo Scientific, Massachusetts, EEUU). A una longitud de onda de 260 nm, 1 unidad de absorbancia corresponde aproximadamente a 44  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ARN. El ratio de las absorbancias medidas a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) indica la pureza del ARN, y debe estar comprendido entre 1.8 y 2.1, pues valores fuera de este rango indicaría una posible contaminación de la muestra.

### **4.3.3 Retrotranscripción y PCR cuantitativa (qPCR)**

El nivel de expresión relativa de los genes bajo estudio se determinó mediante la técnica de qPCR. Para ello, el ARNm se retrotranscribió a ADN complementario (ADNc) y a partir de éste se llevó a cabo una reacción de PCR para cada gen analizado.

#### 4.3.3.1 Retrotranscripción de ARN

La retrotranscripción (RT) del ARNm consiste en sintetizar una cadena de ADNc monocatenario a partir de una cadena de ARN mediante una enzima transcriptasa inversa.

En el presente estudio se utilizó el sistema de síntesis de ADNc iScript™ Reverse transcription Supermix for RT-qPCR de BIORAD (California, EEUU). Los compuestos que se incluyen en el supermix iScript RT son: la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), iScript RNasa H+, inhibidor de RNasa, dNTPs, oligo(dT), cebadores random, buffer,  $\text{MgCl}_2$ , y estabilizadores.

Para llevar a cabo la reacción de RT se preparó una solución madre que contuviera 4  $\mu\text{l}$  de la Supermix y 11  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC por cada número de reacciones que se fueran a realizar. Se añadió 15  $\mu\text{l}$  de esta solución en cada uno de los pocillos de la placa P96 en los que iba a tener lugar la reacción. Posteriormente, se añadió 5  $\mu\text{l}$  de ARN en cada uno de los pocillos, llegando así a un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  por reacción. Para que la RT se llevara a cabo, se introdujo la placa P96 en un termociclador (C1000 TM Thermal Cycler, BIORAD, California, EEUU), siguiendo el protocolo indicado por las instrucciones del producto: 5 minutos a 25°C para que tenga lugar el anillamiento; 30 minutos a 42°C, fase en la que se desarrolla la reacción de síntesis de ADNc; y 5 minutos a 85°C para la inactivación de la enzima. Una vez terminada la

reacción, las muestras fueron transferidas a hielo. Siempre que se desarrolló una reacción de RT se incluyeron entre la batería de muestras un control negativo sin ARN, para confirmar la pureza de los reactivos utilizados y descartar posibles contaminaciones por ADN genómico en las muestra de ARN.

### *Reacción de PCR cuantitativa*

La técnica de PCR permite amplificar el número de copias de una secuencia de ADN o ADNc gracias a la acción de una enzima polimerasa, mediante la repetición sucesiva de un ciclo que consta de tres fases. Dichas fases se caracterizan por su duración y sus diferentes temperaturas, las cuales permiten la desnaturalización de las cadenas de ADNc, la hibridación de los cebadores, y la extensión de la cadena por la enzima polimerasa.

La reacción de PCR requiere la presencia de cebadores, pequeños oligonucleótidos que se unen específicamente a una secuencia complementaria de ADN, permitiendo que la enzima polimerasa comience la extensión de la hebra de ADN. Las secuencias codificantes de los genes estudiados se obtuvieron de la base de datos Genebank<sup>TM</sup>. El diseño de las secuencias de los cebadores se realizó con el software Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, EEUU), intentando que el producto final no superase los 100 pares de bases (pb) y que fuera posible someter a todos los cebadores a las mismas condiciones de temperatura de anillado (60°C). Además, el uso de la herramienta para la búsqueda de alineamientos BLASTN permitió confirmar que la homología entre la secuencia de los cebadores y los genes de interés era única. Las secuencias de los cebadores diseñados se muestran en la tabla 5 y fueron sintetizados por Sigma-Genosys Ltd. (Haverhill, Reino Unido).

**Tabla 5.** Características de los cebadores sentido y antisentido utilizados en la técnica de qPCR.

Gen	Genebank™	Cebadores sentido y antisentido (5'- 3')	Nucleótidos	Tamaño amplión (pb)
LDLR	AY114155	TGAAGTTGGCTGCGTTAATGTG	812-833	69
		CATTCGCCGCTGTGACACT	862-880	
LRP-1	NM_002332	CCGGAGTGGTATTCTGGTATAAGC	13779-13802	126
		CTCCGCCTTCGTACATCTTGTA	13883-13904	
VLDLR	D16493	ATGTTATCCAGCGTGGACTTGA	1937-1958	74
		GGATGAGCTAGGAACTCCAGAGACT	1986-2010	
SRA2	NM_002445	GCCAACCTCATGGACACAGA	519-538	79
		GCTGCAGAAGAATGTCATTAAATCTT	572-597	
SRB1	BC080647	TTCTACACTCAGCTGGTGTGATG	1415-1438	65
		AGCGCCAGGAGGAGCTACT	1461-1479	
CD36	L06850	CTCTTTCCTGCAGCCCAATG	468-487	75
		ACTGTGAAGTTGTCAGCCTCTGTT	519-542	
GAPDH	AF261085	CAACGGATTTGGTCGTATTGG	127-147	72
		GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA	171-198	

Abreviaturas: LDLR, receptor de las lipoproteínas de baja densidad; LRP-1, proteína-1 relacionada con el LDLR; VLDLR, receptor de lipoproteínas de muy baja densidad; SRA2, receptor scavenger de clase A tipo 2; SRB1, receptor scavenger de clase B tipo 1; CD36, receptor scavenger CD36 y GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

La técnica de qPCR se caracteriza por monitorizar la cantidad de ADNc amplificado a lo largo de la reacción de PCR mediante el uso de técnicas de fluorescencia, emitiéndose una señal proporcional a la cantidad de producto amplificado. Aunque existen diversos tipos de sondas y marcadores fluorescentes para la detección de los productos de qPCR, en nuestro estudio se utilizó SYBR Green I, un agente intercalante fluorescente específico de ADN bicatenario, cuyas longitudes de onda máximas de excitación y emisión son 494 nm y 521 nm, respectivamente.

Para llevar a cabo la reacción de qPCR se adquirió el reactivo Precision PLUS™ Mastermix, de Primer Design (Chandler's Ford, Reino Unido). Por reacción, se añadió 150 ng de ADNc, 10 µl de Precision PLUS™ mastermix (Primer Design, Chandler's Ford, Reino Unido), 1 µl de cada uno de los cebadores específicos sentido y antisentido (10 µM) y agua Milli-Q (Millipore, Watford, Reino Unido) hasta un volumen final de 20 µl por reacción. Como control negativo se incluyó una reacción con todos los elementos salvo ADNc. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado para cada muestra en placas de 96 pocillos y se procesaron en un termociclador CFX96™ Real-Time System de BIORAD (California, EEUU). La descripción de los tiempos y temperaturas aplicados en cada ciclo de la reacción qPCR se detallan en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de tiempo, temperaturas y número de ciclos aplicadas a la reacción de pPCR.

Fase	Ciclos	Tiempo	Temperatura	Objetivo
1	1	2 min	95°C	Desnaturalización inicial y activación de la enzima
2	39	15 seg	95°C	Desnaturalización
		60 seg	60°C	Hibridación de los cebadores y extensión. Colección de datos.
3		Curva de disociación		Comprobación de la especificidad de los cebadores

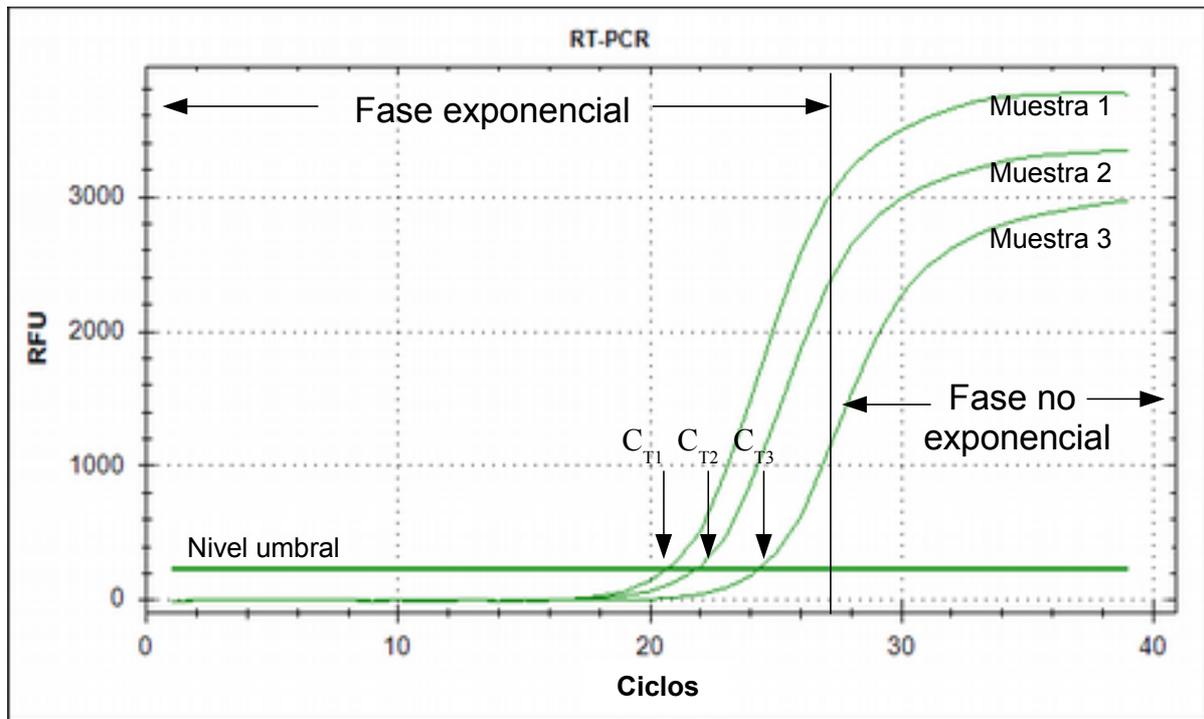
La detección de los productos de qPCR con SYBR Green I posee la ventaja de su alta sensibilidad, aunque no es tan específico como las sondas fluorescentes y su uso requiere el análisis de la curva de “*melting*” o curva de disociación del producto. Dicha curva se obtiene tras la amplificación del ADNc, al representar gráficamente el descenso de la señal fluorescente (eje de ordenadas) debido a la disociación del producto de la qPCR conforme se incrementa la temperatura (eje de abscisas). La derivada de dicha curva debe resultar en un sólo pico cuyo máximo corresponde a la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del producto de qPCR, la cual es específica para cada amplicón. Esto nos informa que el diseño de los cebadores es correcto y específico del gen estudiado, así como de la ausencia de *primer dimer* o contaminaciones en la reacción. Así mismo, la  $T_m$  permite monitorizar en distintos días la correcta formación del amplicón esperado.

Los productos de la qPCR fueron analizados con el software Opticon Monitor™, Analysis Software V 2.01 (MJ Research Inc., Waltham, EEUU). El análisis de la curva de disociación mostró un único pico con la temperatura esperada para cada transcrito amplificado.

Los datos obtenidos se analizaron siguiendo un método de cuantificación relativa, el cual indica el cambio de expresión de un gen diana en una determinada situación experimental (células incubadas con TRL), respecto a una situación control (células sin TRL). Además, para normalizar el resultado de la qPCR respecto a las posibles diferencias en la cantidad de ARN añadido a la reacción de RT, este método incluye la determinación de la expresión de un gen control interno cuya expresión es constante y no se ve afectada por las condiciones experimentales. En el presente estudio, la cuantificación del ADNc amplificado se corrigió en función de la expresión del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Finalizada la reacción de qPCR con el fluoróforo intercalante de la doble hélice SYBR Green I, se obtuvieron distintos valores del parámetro ciclo umbral ( $C_T$ , *cycle threshold*) para cada gen en las distintas condiciones experimentales.

El valor de  $C_T$  nos informó sobre el ciclo de la reacción de la polimerasa a partir del cual comenzaron a existir un número suficiente de copias de ADN para que la fluorescencia emitida sea superior al nivel umbral. Así, una “muestra 1” de ADNc con un elevado número de copias inicial tendrá un valor  $C_T$  más bajo que otra “muestra 2” con un menor número de copias, pues la “muestra 1” necesitará menos ciclos para alcanzar el nivel umbral de fluorescencia (figura 14).



**Figura 14. Detección de ADN por PCR cuantitativa (qPCR).** El número de ciclos (eje de abscisas) se representa frente a la fluorescencia emitida por las dobles cadenas de ADNc (eje de ordenadas). La cuantificación de cada muestra (Muestra 1, 2 y 3) se realiza a partir del número de ciclos (valor  $C_{T1}$ ,  $C_{T2}$ , y  $C_{T3}$ , respectivamente) que necesita cada muestra para alcanzar el nivel umbral de fluorescencia.

Para cuantificar los cambios de expresión relativos de los genes estudiados se empleó el método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . Para que este método sea válido, la eficiencia de amplificación del gen diana debe ser igual a la del gen de control interno. Se realizaron diluciones seriadas del ADNc, y se calculó la diferencia entre el  $C_T$  del gen diana y el del gen de control interno para cada dilución ( $\Delta C_T = C_{T,Diana} - C_{T,GAPDH}$ ) tanto en las muestras procedentes de la situación control como experimental. Seguidamente, se hizo una segunda corrección entre ambas, para lo cual se calculó el parámetro  $\Delta\Delta C_T = [(C_{T,Diana} - C_{T,GAPDH})_{+TRL} - (C_{T,Diana} - C_{T,GAPDH})_{-TRL}]$ .

Así, se pudo concluir que las diferencias de ciclo entre las distintas condiciones eran atribuidas al tratamiento con TRL. Finalmente, para dar un valor relativo de la variación de la expresión del gen diana en las células incubadas con TRL frente a la situación control se calculó el parámetro  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , cuya función es transformar el dato obtenido en las correcciones de  $C_T$  anteriores en un valor numérico que expresa la cantidad relativa con respecto a la situación control, a la cual se le asigna arbitrariamente una cantidad igual a 1.

## 5. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEL COMPONENTE LIPÍDICO DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEÍN LIPASA DE MACRÓFAGOS

### 5.1 Procedimiento experimental

Los cultivos de monocitos THP-1 crecidos en medio RPMI-1640 con L-Glutamina, 10% (v/v) de SFB y 50 µg/ml de Garamicina, fueron sembrados a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo con PMA (160 mM). Después de 72 horas, se le cambió el medio de cultivo a los monocitos THP-1 ya diferenciados a macrófagos, por medio fresco sin PMA. Transcurridas 24 horas, se añadió 0.3 mM TG/ml de las partículas de QM sintetizadas artificialmente (chilomycron remnant-like particles, CRLP) a los cultivos celulares. Los cultivos celulares control, a los que no se les añadió partículas artificiales (-CRLP), permanecieron con el mismo medio de cultivo.

Los macrófagos THP-1 se mantuvieron a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> /95% aire y, tras un periodo de incubación de 6 y 24 horas en presencia de las CRLP, se procedió a recolectar las diferentes fracciones en las que tendría lugar el análisis de la actividad de la LPL. Se trabajó sobre hielo en todo momento para evitar la pérdida de actividad de la enzima. Tras recoger el medio de cultivo, las células se trataron con nuevo medio de cultivo preparado con heparina (100 IU/ml RPMI) (Lövens, Malmö, Suecia) y 0.2% BSA (Sigma-Adrich, St. Louis, MO), durante 30 minutos a 4°C. Ese medio se recolectó de nuevo, ya que contendría la LPL anclada a la superficie celular, siendo liberada al medio por su unión a la heparina. Posteriormente, los macrófagos fueron tratados con buffer de solubilización frío y, tras causar la rotura celular, el contenido intracelular también fue recolectado para el estudio de la actividad de la LPL intracelular. Todas las alícuotas fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de análisis.

En paralelo, otros cultivos de macrófagos THP-1 fueron tratados bajo las mismas condiciones e incubados con o sin las CRLP, para analizar la acumulación intracelular de lípidos. Además, con ellos se realizaría también el estudio de la modulación de los niveles de expresión de los genes codificantes de la LPL y ANGPTL4 por acción de las CRLP preparadas con diferente contenido de TG.

## **5.2 Preparación de las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP)**

Todos los lípidos fueron adquiridos a Larodan Inc. (Malmö, Sweden). Las partículas artificiales fueron preparadas empleando una mezcla de lípidos, con la siguiente composición: 70% TG (OOO, LLL, o POP), 2% colesterol, 5% éster de colesterol (CE) y 25% de FL en NaCl al 0.9% preparado en buffer tricina (20 mmol/L, pH 7.4), como fue descrito por Redgrave & Maranhao [415]. La composición de la fracción de FL fue: 70.50% fosfatidilcolina, 6.88% lisofosfatidilcolina, 11.00% fosfatidiletanolamina, 2.58 % fosfatidilinositol, 2.58% fosfatidilserina y 6.54% esfingomielina.

La mezcla lipídica fue sonicada mediante inmersión de una sonda ultrasónica (Bandelin Electronics Berlin, Alemania) directamente en la mezcla y aplicando un voltaje de 50W durante 20 minutos (pulsos de 5 minutos alternados con 5 minutos de reposo para permitir que se enfríe) a una temperatura de 56°C. La emulsión resultante fue ajustada a una densidad de 1.21 g/ml con KBr, y se llevó a un tubo de plástico con capacidad para 12 ml (Beckman). Sobre la solución lipídica, se preparó un gradiente de densidad (2.5 ml, d1.065 g/ml; 2,5 ml, d1.020 g/ml; 3 ml, d1.006 g/ml) como fue descrito por Diard et al. [416]. La preparación se centrifugó a 11000 rpm durante 20 minutos a 12°C en una centrífuga Beckman Optima L-90 K (Beckman Coulter, Palo Alto, CA), utilizando un rotor basculante SW41 Ti. Finalizada la centrifugación, se eliminó la capa superior, se reemplazó ese mismo volumen por solución NaCl (d1.006 g/ml), y se volvió a centrifugar a 23500 rpm durante 1 hora a 12°C en el mismo rotor. La capa superior formada que contiene las CRLP fue recolectada e incubada con el doble de su volumen de suero d<1.020 deficiente, durante 5 horas a 37°C con agitación. La mezcla CRLP/suero fue posteriormente situada en los tubos de centrifugación (Beckman Coulter, Palo Alto, CA) con solución d1.006 sobre ella hasta completar el volumen del tubo, y fue centrifugada a 3000 rpm durante 16 horas a 12°C, de nuevo en un rotor basculante SW41 Ti. La capa superior se recogió, se le añadió 15 mg de NaCl, y se centrifugó una vez más bajo una solución d1.006 a 4000 rpm durante 5 horas a 12°C. Por último, después de volver a recolectar la capa superior formada, ésta fue dializada en 2 L de solución salina NaCl 0.9% durante 2 horas con membranas 4MWCO 12K-14K, 25mm, 1x30M (Spectra). El producto final fue almacenado a 4°C hasta su uso, sin exceder los 3 días.

### **5.3 Preparación de suero d<1.020 deficiente**

El suero fue aislado de una muestra de sangre humana extraída en ayunas, mediante centrifugación a 3000 rpm, 20 minutos a temperatura ambiente. Se ajustó un volumen de 5 ml del suero obtenido a una densidad de 1.020 g/ml usando KBr y, posteriormente, se transfirió a un tubo de centrifugación. El suero depositado en el tubo se cubrió por una solución de densidad 1.020 g/ml hasta completar los 14 ml de la capacidad del tubo, y se centrifugó a 40000 rpm a 22°C, durante la noche (16 horas). La capa superior formada fue desechada, y el suero que permaneció en el fondo del tubo de centrifugación se recogió y se sometió a diálisis durante 6 horas en 2 L de solución salina al 0.9% NaCl a 4°C, empleando las membranas 4MWCO 12K-14K, 25mm, 1x30M (Spectra). Cada dos horas la solución salina fue cambiada por otra preparada en el momento. Después de la diálisis, el suero obtenido fue almacenado a -20°C hasta que fue requerido.

### **5.4 Cuantificación de los triglicéridos incorporados en las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP)**

Para poder añadir 0.3  $\mu\text{mol}$  TG/ml de CRLP en cada cultivo de células, los TG incorporados en las partículas fueron cuantificados mediante el kit “Triglyceride Colorimetric Assay” (Cayman Chemical, MI, EEUU). Los TG empleados como estándar fueron diluidos 1:5, 1:10 y 1:20 en  $\text{dH}_2\text{O}$ , al igual que las preparaciones de CRLP, que se diluyeron 1:10, 1:20 y 1:40 en  $\text{dH}_2\text{O}$ . Los reactivos fueron reconstituidos según las indicaciones del fabricantes. Se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de estándar de triglicéridos y muestras en los pocillos correspondientes de una placa P96, por triplicado. Se inició la reacción mediante la adición de 150  $\mu\text{l}$  de la solución de mezcla enzimática a cada pocillo. La placa se cubrió y se agitó cuidadosamente durante unos segundos para mezclar los compuestos correctamente. Se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió a medir la D.O de cada muestra a 500 nm y 570 nm, siendo empleada la primera medición para la eliminación de ruido.

## **5.5 Ensayo de medición de la actividad de la LPL**

La actividad de la LPL recogida en cada una de las diferentes fracciones de los cultivos celulares, fue medida bajo las mismas condiciones que han sido previamente descritas por Holm C et al. [417]. Para ello, se empleó leche fresca extraída de vacas como emulsión lipídica, con trioleína marcada radiactivamente con tritio (trioleína- $H^3$ ), incorporada por sonicación. Se preparó una mezcla de incubación para todas las reacciones y se añadió 180  $\mu$ l/tubo en tubos Kimble 13x100 mm. La solución de incubación por tubo se constituía por: por 100  $\mu$ l de buffer de incubación (12% BSA, 16.65 U/ml 0.2 mg heparina/ml, 0.2M NaCl, 0.3M Tris HCl, pH 8.5), 50  $\mu$ l de la emulsión lipídica con trioleína- $H^3$ , 5  $\mu$ l de suero de rata congelado tratado con fenilmetilsulfonil fluorido inactivado por calor (PMSF-HIFRS), que es la fuente del activador de LPL, y 25  $\mu$ l de  $dH_2O$ . A cada tubo se le añadió 20  $\mu$ l de la correspondiente fracción del cultivo celular, que contiene la LPL activa. Cada reacción se mezcló con vórtex y todos los tubos fueron incubados durante 3 horas en un baño de agua a 25°C, con agitación continua. La hidrólisis lipídica se detuvo mediante la adición de 2 ml por tubo de la solución de extracción (isopropanol, heptano y 1M  $H_2SO_4$ , 40:48.3:1), más 0.5 ml de  $dH_2O$ . Cada uno de los tubos se centrifugó a 2250 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. La fase superior fue recogida y mezclada por vortex con 1ml de etanol alcalino (95% etanol, 1 N NaOH,  $dH_2O$ ) y 3 ml de heptano para el lavado de la muestra. Los tubos fueron nuevamente centrifugados a 2250 rpm durante 3 minutos y la fase superior fue eliminada por succión, que contenía el heptano de lavado. A la solución resultante se le añadió otros 3 ml de heptano, se mezcló con el vortex y se centrifugó otra vez para un segundo lavado bajo las mismas condiciones. Del fondo del tubo fueron recogidos 800  $\mu$ l y llevados a los tubos de centelleo, donde fueron mezclados con la solución Opti-phase “Hi safe” 3 mezclada previamente con ácido acético. Finalmente, la radioactividad emitida de cada uno de los tubos que contenían las muestras fue medida en el contador- $\beta$  (contador de centelleo).

## **5.6 Cuantificación de la acumulación lipídica en macrófagos**

El contenido lipídico intracelular de los cultivos de monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos después de ser incubados durante 24 horas en presencia de las diferentes preparaciones de CRLP, fue teñido con el colorante aceite rojo O de la misma manera que ha sido descrito en la sección 4.2.1. Como diferencia hubo lo siguiente: tras los 10 minutos de incubación con el colorante de elevada afinidad lipídica, y de ser lavados adecuadamente con 1x PBS, se añadió 0.5 ml de Isopropanol al 98% a cada uno de los cultivos. Fueron incubados en oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente, y las células fueron recogidas para proceder con la medición de la D.O a 510 nm.

Los resultados son expresados como acumulación intracelular de lípidos/proteína total, y se tomó la media del valor de todos los controles (-CRLP) como valor de referencia, siendo todos divididos por esa cifra, para poder realizar la comparación entre los diferentes ensayos.

## **5.7 Cuantificación de la proteína total celular**

Se preparó una curva patrón con BSA como estándar, en las siguientes concentraciones: 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$  BSA/ ml en  $\text{dH}_2\text{O}$ , en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . De las fracciones intracelulares recolectadas para la medición de la actividad de LPL intracelular, se tomó una alícuota para cuantificar la proteína total de cada uno de los cultivos celulares. Cada muestra se diluyó 1:8, 1:4 y 1:2 en  $\text{dH}_2\text{O}$ , también en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . Como Blanco, para el estándar se empleó  $\text{dH}_2\text{O}$ , mientras que para cada muestra intracelular se dispuso de 0.2M NaOH 1:2 en  $\text{dH}_2\text{O}$ . Las diluciones de estándar y de las muestras, así como los blancos, fueron tratados siguiendo el mismo procedimiento. Se preparó una mezcla constituida por el Reactivo A (2.0%  $\text{NaCO}_3$ , 0.4% NaOH, 0.16% Na-tartrate, 1% SDS) y el Reactivo B (4%  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) (A:B=100:1), y se añadió 0.6 ml de ésta a cada tubo y se mezcló por vortex. Después de una incubación de 10-60 minutos a temperatura ambiente, se añadió 60  $\mu\text{l}$  del reactivo 1N Folin-Ciocalteu a cada reacción, se mezcló adecuadamente, y de nuevo se incubó durante 45 minutos, esta vez en oscuridad. A continuación se midió la D.O. de cada muestra a 750 nm.

## **5.8 Análisis de expresión génica de LPL y ANGPTL4**

Los cultivos celulares de macrófagos THP-1 incubados con o sin las CRLP, fueron tratados con buffer de lisis de Qiagen Nordic (Sollentuna, Suecia), con  $\beta$ -mercaptoetanol, para extraer el ARN total. El producto de la extracción fue purificado mediante el Kit de purificación RNA GeneJET, de ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. EL ARNm extraído fue posteriormente tratado con ADNasas, de Fermentas (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), y se procedió a su retrotranscripción con el Kit RT-PCR cDNA first strands synthesis, de ThermoScientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos.) Finalmente, se realizó la qPCR para los genes LPL y ANGPTL4 con el gen  $\beta$ -actina para normalizar.

## 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados han sido expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM), excepto allí donde se indique. En todos los casos se indica el número de repeticiones de los experimentos que conforman la media (n). El análisis de los datos han sido realizados con el paquete estadístico GraphPad Prism <sup>®</sup> 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

La significancia estadística de los niveles basales de lípidos y de los marcadores de inflamación entre los grupos de individuos obesos y normopesos fue analizado mediante el test t-Student no pareado.

La significancia estadística de los cambios postprandiales en los ensayos realizados con los dos desayunos experimentales en los sujetos obesos y normopesos, fueron analizados mediante el test t-Student pareado, al igual que el estudio de acumulación lipídica intracelular entre células tratadas con TRL y las células control.

Los resultados obtenidos de la actividad de la LPL se expresan como media  $\pm$  desviación típica (SD), y la significancia de la diferencia estadística entre ensayos fue analizada también por el test-t de Student. Todos los valores fueron normalizados con la media del valor del control (-CRLP) mediante la división de todos los valores obtenidos por dicha cifra, que se usó como referencia =1.

Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor de  $P < 0.05$ .

# RESULTADOS

# 1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA LIPÍDICA POSTPRANDIAL EN SUERO TRAS LA INGESTA DE UN DESAYUNO DE TIPO MEDITERRÁNEO Y UN DESAYUNO DE TIPO OCCIDENTAL EN ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS

## 1.1 Estudio del perfil lipídico y bioquímico basal en suero

**E**l perfil lipídico y bioquímico de los 24 participantes del estudio fue caracterizado antes de que se iniciase el ensayo postprandial, lo que permitió dividir a los participantes del estudio en dos grupos según sus características antropométricas, en obesos y normopesos, y determinar las condiciones basales de los dos grupos que formarían parte del ensayo. Además, los valores basales obtenidos fueron empleados como referencia para el estudio de los cambios experimentados en el período postprandial tras las ingesta de las dos dietas experimentales, el desayuno de tipo mediterráneo y el de tipo occidental.

En la figura 14.A se representan los niveles basales de los lípidos en suero analizados, con diferencias importantes en todos los casos al compararse los dos grupos de estudio. La concentración sérica basal de TG y colesterol total detectada en ayunas fue en ambos casos significativamente mayor en los sujetos obesos ( $P < 0.05$ ). La concentración sérica basal de LDL-c también mostraba diferencias considerables, siendo sus niveles superiores en los participantes obesos con respecto a los detectados en los normopesos, con una diferencia estadística muy significativa ( $P < 0.001$ ). La comparación de los niveles basales de HDL-c en suero entre los dos grupos de estudio también dio lugar a diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ), obteniéndose unos niveles basales de HDL-c menores en el grupo de sujetos obesos con respecto a la concentración basal medida en los normopesos.

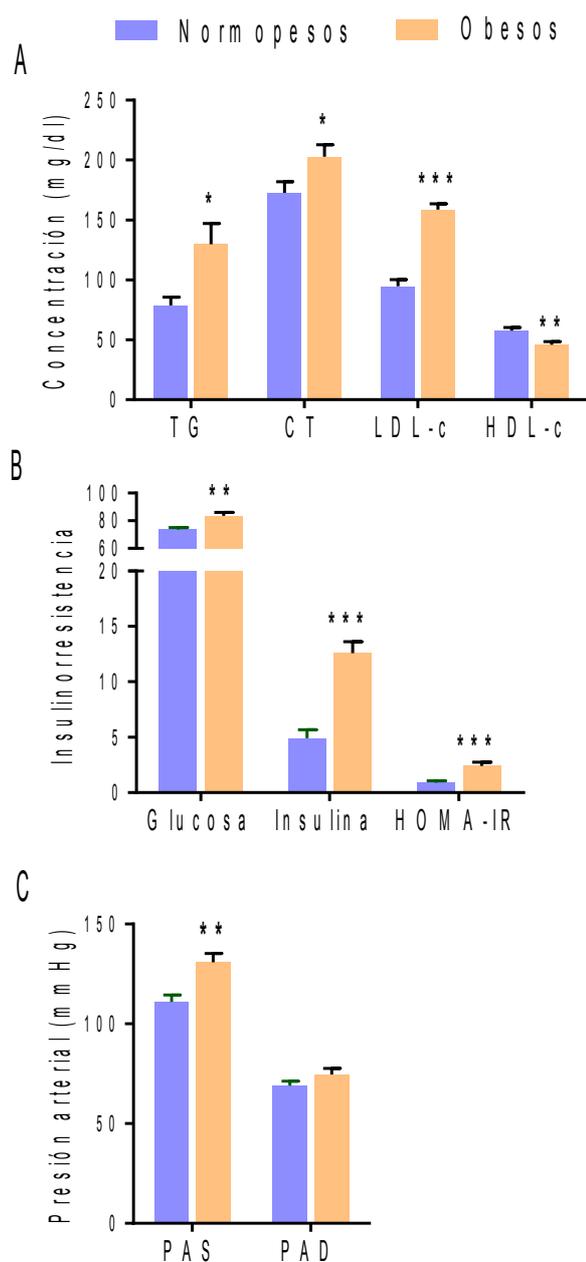
Los niveles de glucosa e insulina sérica basales fueron también medidos en ayunas en todos los participantes del estudio (figura 14.B). Los resultados revelaron que la concentración de glucosa en los participantes obesos fue significativamente mayor a la concentración basal de glucosa sérica de los normopesos ( $P < 0.01$ ), aunque se encontraba dentro de los niveles normales en ayunas (70-100 mg/dL), según indica la Federación Internacional de la Diabetes [192]. La diferencia encontrada en los niveles de insulina entre ambos grupos del estudio fue más acusada, ya que el valor de insulina en suero que presentaron los sujetos obesos era casi 3 veces mayor con respecto al de los normopesos ( $12.60 \pm 1.02$  mU/ml y  $4.90 \pm 0.77$  mU/ml, respectivamente,

P<0.001). A pesar de la elevada concentración de insulina medida en el grupo de personas obesas, los valores se encontraron también dentro del rango de referencia (> 25 mU/ml en ayunas [418]).

En base a los resultados obtenidos de glucosa e insulina en los dos grupos que participaron en nuestro estudio, se determinó la RI que presentaba cada uno de ellos. Para su cálculo, se empleó el modelo homeostático de medida de la resistencia a la insulina (HOMA-IR), desarrollado por Matthews en 1985 [419], el cual estima la homeostasis basal mediante las concentraciones en ayunas de la glucosa y la insulina. Este método ha demostrado ser un buen equivalente de las mediciones de RI frente a pruebas como el *clamp* euglicémico, el *clamp* hiperglicémico o el modelo mínimo, en diferentes grupos de edad e incluso en pacientes diabéticos en tratamiento [420].

El valor de HOMA-IR calculado en el grupo de individuos obesos no sobrepasó el punto de corte establecido para RI (HOMA-IR igual o superior a 2.6, [421]), aunque fue significativamente muy superior al valor obtenido en el grupo de sujetos normopesos (P<0.001) (figura 14.B).

Asimismo, se midió la presión arterial en los participantes del ensayo antes de su comienzo. Los valores de PAS fueron iguales en los dos grupos del estudio, obeso y normopeso. En cambio, la cifra de PAD fue ligeramente superior en el grupo de sujetos obesos, aunque la diferencia no fue significativa al compararse con el valor PAD detectado en los sujetos normopesos. Normalmente, la obesidad es responsable de un aumento de la presión arterial, sin embargo, se pudo determinar que sus niveles eran normales ya que no igualaron ni superaron el valor 140 mmHg para PAS y 90 mmHg para PAD, considerado como hipertensión según la OMS (figura 14.C).



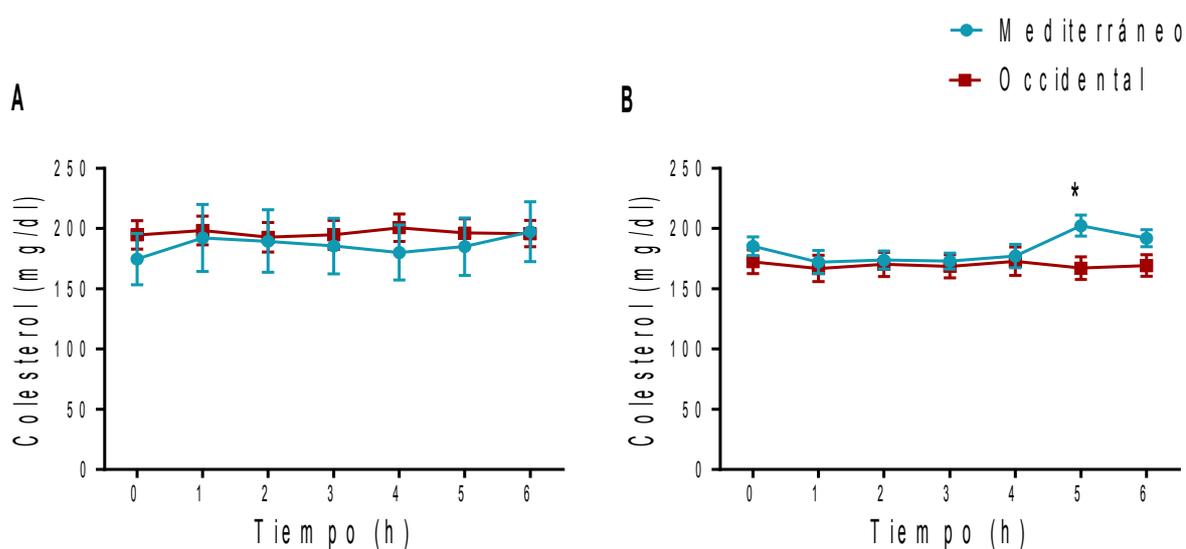
**Figura 14. Parámetros lipídicos y bioquímicos basales en los sujetos obesos y normoobesos participantes del estudio** A. Concentración basal en suero de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol LDL (LDL-c), y colesterol HDL (HDL-c); B. Concentración sérica basal de glucosa, insulina, y el marcador del modelo de medición homeostático de la resistencia a la insulina (HOMA-IR); C. Valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD). Datos expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12 en todos los grupos. \*=P<0.05, \*\*=P<0.01, \*\*\*=P<0.001 obesos vs normoobesos (Test t de Student no pareado).

## 1.2. Estudio del perfil lipídico y bioquímico postprandial en suero

El ensayo postprandial comenzó con la administración de los dos desayunos experimentales, el de tipo mediterráneo y el de tipo occidental, a todos los sujetos participantes del estudio. Durante las 6 horas siguientes a la ingesta de los desayunos, se fue extrayendo una muestra de sangre a cada hora, lo que permitió determinar la influencia de la carga lipídica de la dieta en la evolución del perfil lipídico y de la glucosa e insulina a lo largo del periodo postprandial, en el grupo de obesos y normopesos.

### 1.2.1 Colesterol total

Tanto en el grupo de obesos (figura 15.A) como en el de normopesos (figura 15.B), el consumo de los dos tipos de desayunos no demostró alterar los niveles postprandiales de colesterol total (CT) respecto a los valores basales a lo largo de las 6 horas posteriores a la ingesta de las dietas experimentales, manteniéndose los niveles constantes en ambos grupos del estudio. Además, no hubo diferencias significativas en los valores de colesterol obtenidos al comparar entre los desayunos, el de tipo mediterráneo y el de tipo occidental. Tan solo a la hora 5 en el grupo de sujetos normopesos se encontró una diferencia significativa entre el consumo de los desayunos experimentales ( $P < 0.05$ ), con una concentración de colesterol en suero más elevada tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo.

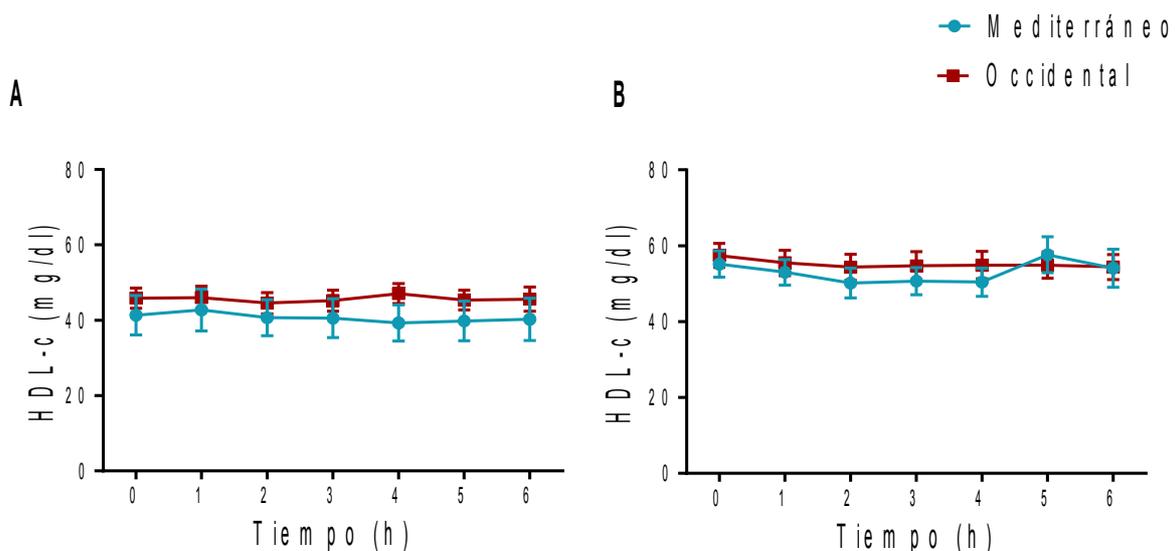


**Figura 15.** Concentración de colesterol sérico antes (0h) y después (1-6h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12. \*= $P < 0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

### 1.2.2 HDL-c

En el grupo de sujetos obesos, la concentración de HDL-c postprandial se mantuvo constante con respecto al nivel basal durante las 6 horas analizadas después de consumir tanto el desayuno de tipo mediterráneo como el de tipo occidental, con valores similares entre ambas dietas. Además, desde la hora 0 y a lo largo del periodo postprandial, se mantuvieron unos niveles de HDL-c en circulación dentro de los niveles considerados normales, superiores a 40 mg/dl en varones según NCEP ATP III (figura 16.A).

En cambio, los valores postprandiales de HDL-c en el grupo de normopesos fueron superiores al grupo de sujetos obesos (figura 16.B). Y al igual que ellos, no presentaron ninguna variación durante el periodo postprandial con respecto a los valores basales tras el consumo de los dos desayunos experimentales. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre los valores de HDL-c postprandial obtenidos con los dos desayunos.

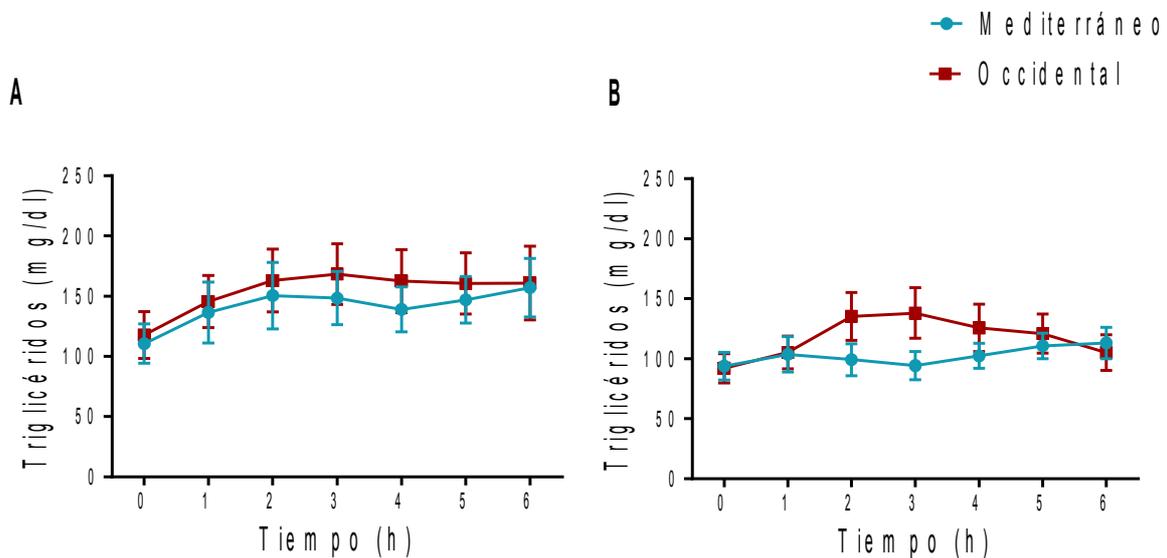


**Figura 16.** Concentración de colesterol HDL (HDL-c) sérico antes (0h) y después (1-6h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12. (Test t de Student pareado).

### 1.2.3 Triglicéridos

Al determinar la evolución de la concentración de TG en suero a lo largo del periodo postprandial después de que los sujetos obesos consumieran las dietas que se les administró, se observó que los niveles postprandiales de TG fueron experimentando un incremento gradual causado tanto por el desayuno de tipo mediterráneo como por el de tipo occidental (figura 17.A). No se identificaron diferencias significativas en el efecto causado sobre los niveles de TG entre desayunos.

El grupo de normopesos experimentó un incremento en la concentración de TG plasmáticos entre las 2-4 horas del periodo postprandial con respecto al valor basal después de consumir el desayuno de tipo occidental (figura 17.B). A continuación, la concentración sérica postprandial de TG comenzó a sufrir un descenso constante. Por el contrario, el consumo del desayuno de tipo mediterráneo solo causó un ligero incremento en la concentración postprandial de TG, aunque los valores a las 3 horas fueron similares a los basales. A pesar de la diferencia encontrada entre ambos desayunos, ésta tampoco fue estadísticamente significativa.



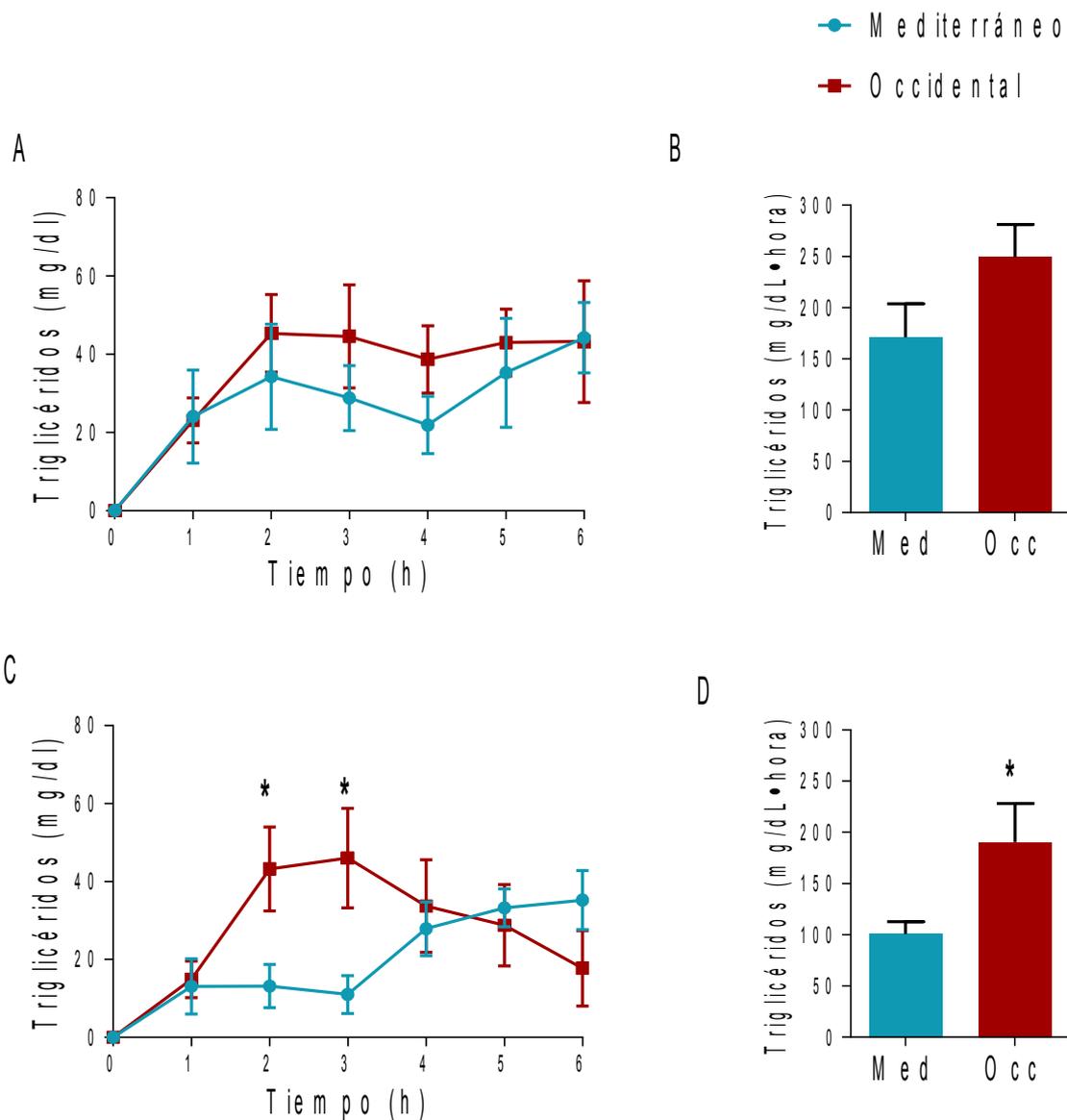
**Figura 17.** Concentración de triglicéridos séricos antes (0h) y después (1-6h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12. (Test t de Student pareado).

Para calcular la respuesta postprandial que tiene lugar tras la ingesta de la dieta con contenido graso, diversos métodos han sido a menudo empleados en varios estudios [422, 423]. Entre ellos, es frecuente realizar el cálculo del área bajo la curva (AUC) y el área bajo la curva incremental (iAUC). Ha sido demostrado que el AUC correlaciona con la concentración de TG en ayunas, sin embargo, es el cálculo del iAUC el que se asocia fuertemente con el incremento de TG durante el periodo postprandial. Tanto en individuos sanos como en individuos que presentan algún desorden metabólico, el iAUC describe mejor la situación postprandial que el AUC total, el cual parece ser más un factor descriptivo, relacionado con el nivel basal, tal y como quedó demostrado mediante el estudio realizado por Carstensen et al. en el año 2003 [424].

El cálculo del valor incremental de la concentración de TG a cada hora con respecto al nivel basal permitió apreciar más claramente el incremento y/o reducción experimentado de sus niveles tras el consumo de los dos desayunos a lo largo del período postprandial.

En el grupo de obesos, se hizo más evidente el incremento que sufrió la concentración de TG tras el consumo del desayuno de tipo occidental frente al de tipo mediterráneo (figura 18.A). Esta diferencia en los niveles alcanzados de TG en el periodo postprandial después de consumir los dos desayunos experimentales fue confirmada con el cálculo del iAUC en este grupo de individuos. El nivel total de TG plasmáticos postprandiales fue mayor por el consumo del de tipo occidental, aunque sin representar una diferencia significativa respecto al desayuno de tipo mediterráneo (figura 18.B).

En el caso del grupo de normopesos, el cálculo de los valores incrementales a todas las horas con respecto al nivel basal (figura 18.C) sí reveló una diferencia significativa entre ambos desayunos a las 2 y 3 horas del periodo postprandial ( $P < 0.05$ ), siendo, como ya se ha comentado anteriormente, los niveles de TG plasmáticos más elevados con el consumo del desayuno de tipo occidental. Además, el cálculo del iAUC (figura 18.D) ayudó a verificar que la concentración total de TG en el período postprandial era estadísticamente superior tras la ingesta del desayuno de tipo occidental ( $P < 0.05$ ).

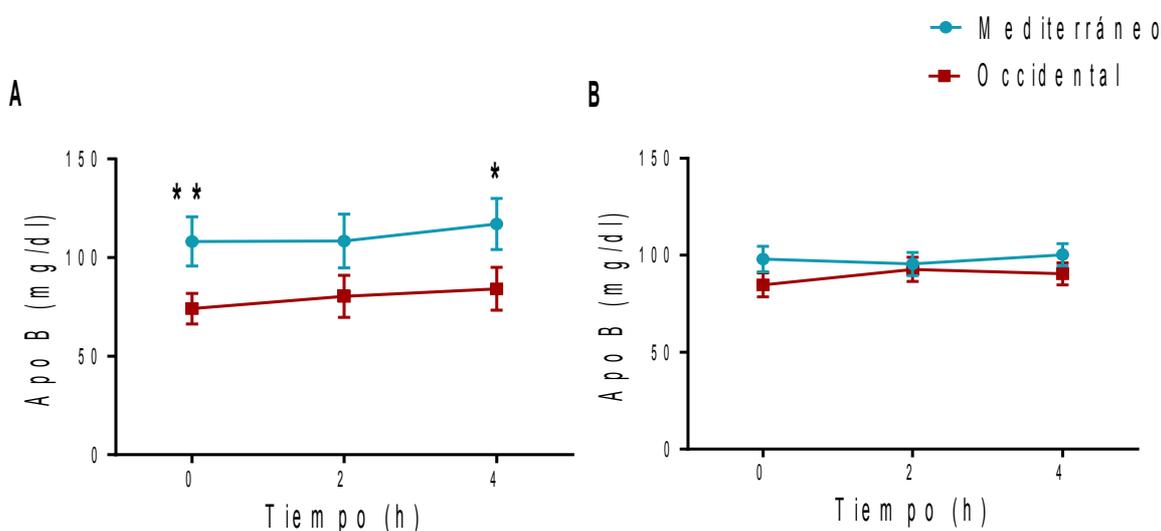


**Figura 18.** Valor incremental de la concentración sérica de triglicéridos (TG) en el periodo postprandial con respecto al nivel basal de TG (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de TG en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; \*=P<0.05 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

### 1.2.4 Apolipoproteína B (apo B)

La variación de la concentración de apo B durante el periodo postprandial en el grupo de sujetos obesos se muestra en la figura 19.A. Después de ingerir los dos tipos de desayunos experimentales, los valores de apo B aumentaron ligeramente con respecto a la concentración basal en ambos casos. La diferencia en los valores de apo B después de la ingesta de los dos desayunos resultó ser significativa a las 4h ( $P<0.05$ ) debido a la mayor concentración detectada a causa del de tipo mediterráneo. No obstante, esto tuvo como explicación la significativa diferencia entre los niveles basales al comienzo del ensayo postprandial mediterráneo y occidental, que fueron bastante más elevados en el caso del desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.01$ ).

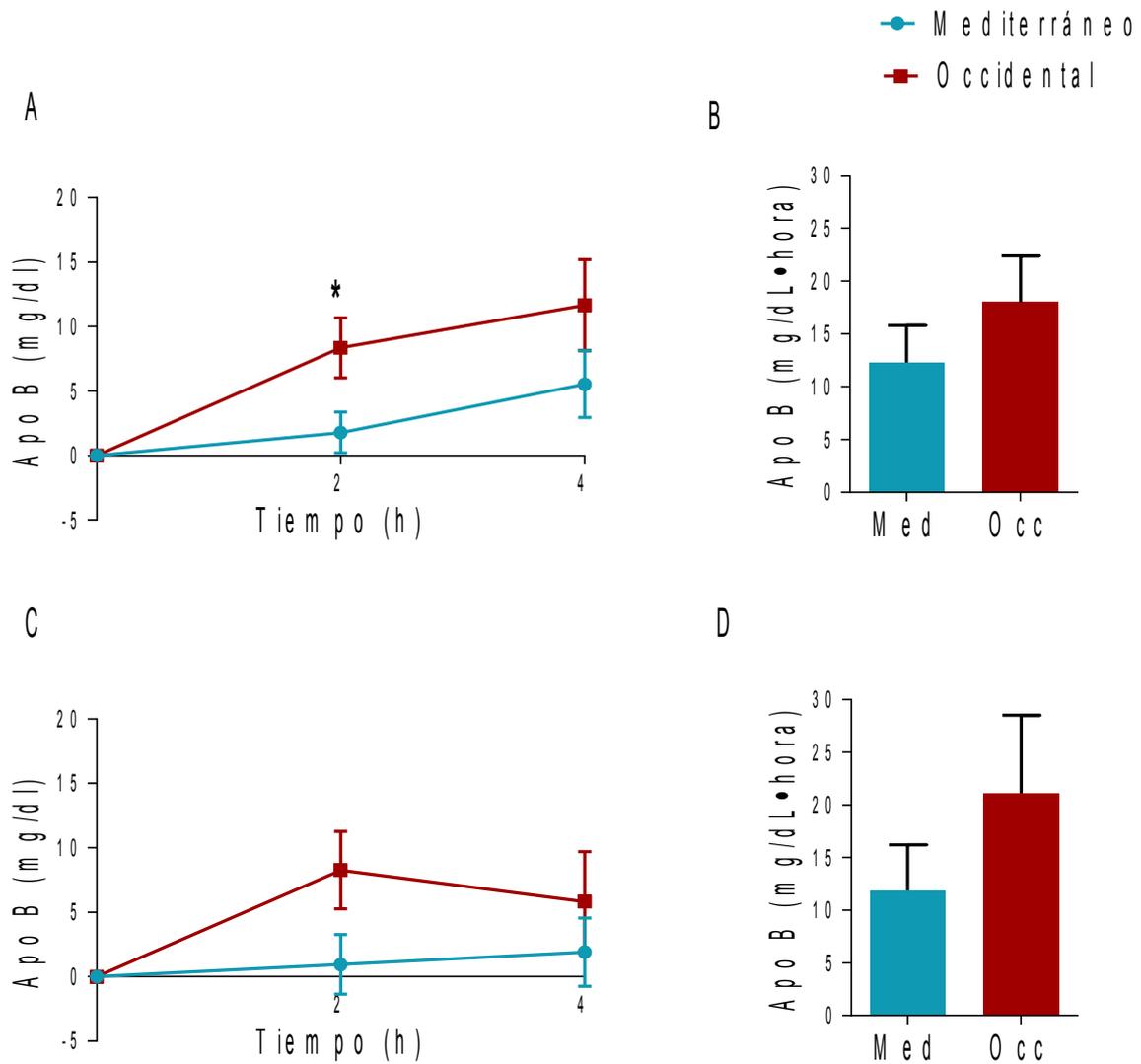
De la misma manera, el grupo de sujetos normopesos (figura 19.B) experimentó un ligero incremento en los valores de apo B durante el periodo postprandial frente a los valores basales tras la ingesta del desayuno occidental. En cambio, el desayuno de tipo mediterráneo mantuvo aparentemente constante el nivel de apo B durante las 4 horas siguientes a su consumo.



**Figura 19.** Concentración de apolipoproteína B (Apo B) sérica antes (0h) y después (2 y 4h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ .  $*=P<0.05$ ;  $**=P<0.01$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

Debido a la diferencia en los valores basales detectados en los sujetos obesos al inicio de los ensayos postprandiales, el cálculo de los valores incrementales de apo B con respecto al nivel basal permitió un análisis más objetivo de la evolución de su concentración a lo largo del periodo postprandial después de ingerir las dos dietas experimentales.

Tanto en el grupo de obesos (figura 20.A) como en el de normopesos (figura 20.C), se observó una concentración de apo B mayor después de ingerir el desayuno de tipo occidental a las 2 y 4 horas del periodo postprandial. Tal diferencia resultó ser estadísticamente significativa al compararse con el desayuno de tipo mediterráneo sólo en el grupo de los obesos a la hora 2 ( $P < 0.05$ ). Esta diferencia en la concentración postprandial de apo B entre desayunos fue confirmada con el cálculo del iAUC en los dos grupos del estudio, los sujetos obesos (figura 20.B) y los sujetos normopesos (figura 20.D). En los dos casos, los niveles de apo B séricos detectados en todo el periodo postprandial fueron superiores después de que se consumiera el desayuno de tipo occidental, aunque en ningún caso resultó ser estadísticamente significativa la diferencia frente al valor obtenido con el desayuno de tipo mediterráneo.

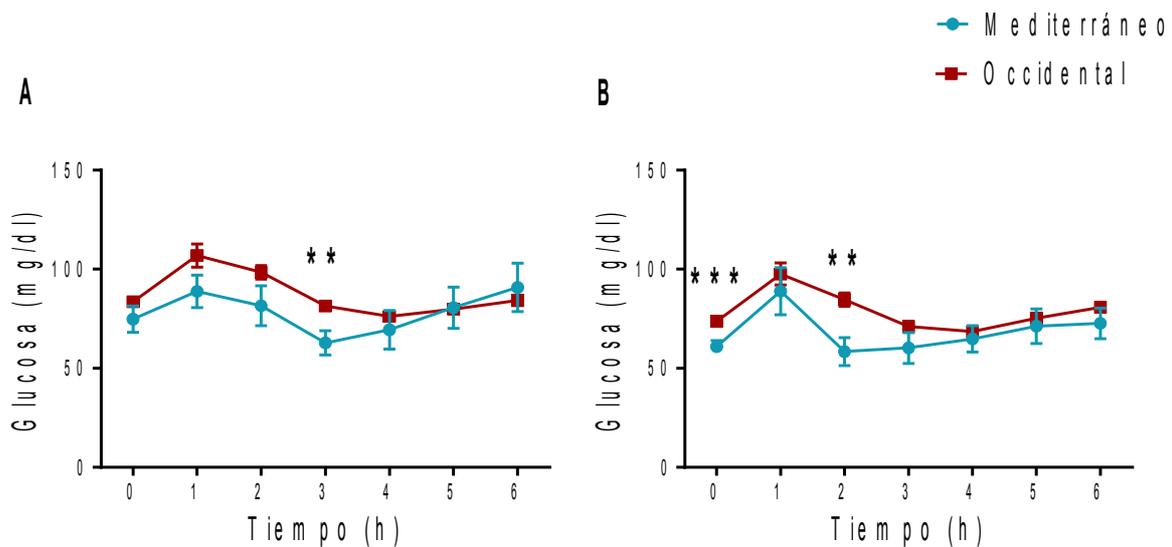


**Figura 20.** Valor incremental de la concentración de apolipoproteína B (ApoB) sérica en el periodo postprandial con respecto al nivel basal de Apo B (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de Apo B en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; \*=P<0.05 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

### 1.2.5 Glucosa

La concentración de glucosa en sangre experimentó un pico máximo 1 hora después de ingerir los dos desayunos en el grupo de sujetos obesos (figura 21.A.) y en el de sujetos normopesos (figura 21.B). Se observó que los niveles de glucosa alcanzados en ese momento fueron ligeramente superiores tras el consumo del desayuno de tipo occidental en los dos grupos de participantes. A partir de la hora 1 del periodo postprandial, la concentración tendió a disminuir en todos los sujetos, alcanzando de nuevo los niveles plasmáticos basales. En el caso del grupo de los obesos, esto ocurrió a las 3 horas después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo, y a las 4 horas del consumo del desayuno de tipo occidental (figura 21.A), mientras que en el grupo normopeso, sucedió algo más temprano, 2 horas después de la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo, y a las 3 horas tras el desayuno de tipo occidental (figura 21.B). Sin embargo, una vez se recuperaron los valores basales, éstos sufrieron de nuevo un ligero incremento en todos los casos a partir de las 3-4 horas.

Los dos desayunos experimentales generaron diferencias significativas entre los niveles de glucosa obtenidos tras su consumo. De hecho, la diferencia en la concentración de glucosa resultó ser estadísticamente significativa a las 3 horas del periodo postprandial en obesos ( $P < 0.01$ ) (figura 21.A), y a las 2 horas ( $P < 0.01$ ) en el grupo de normopesos (figura 21.B), en ambos casos debido a que el desayuno de tipo occidental provocó que los niveles de glucosa fuesen más elevados en comparación con el de tipo mediterráneo. Hay que mencionar que, antes de que los dos tipos de desayunos fuesen administrados a los individuos normopesos, el nivel de glucosa basal (0h) del ensayo que se realizó con el desayuno de tipo occidental fue superior con respecto a la concentración basal del ensayo que se llevó a cabo con el de tipo mediterráneo, siendo muy significativa estadísticamente la diferencia entre ellos ( $P < 0.001$ ). Por esa razón, la concentración de glucosa postprandial se mantuvo más elevada después de consumir el desayuno de tipo occidental, en comparación con los resultados del desayuno de tipo mediterráneo.



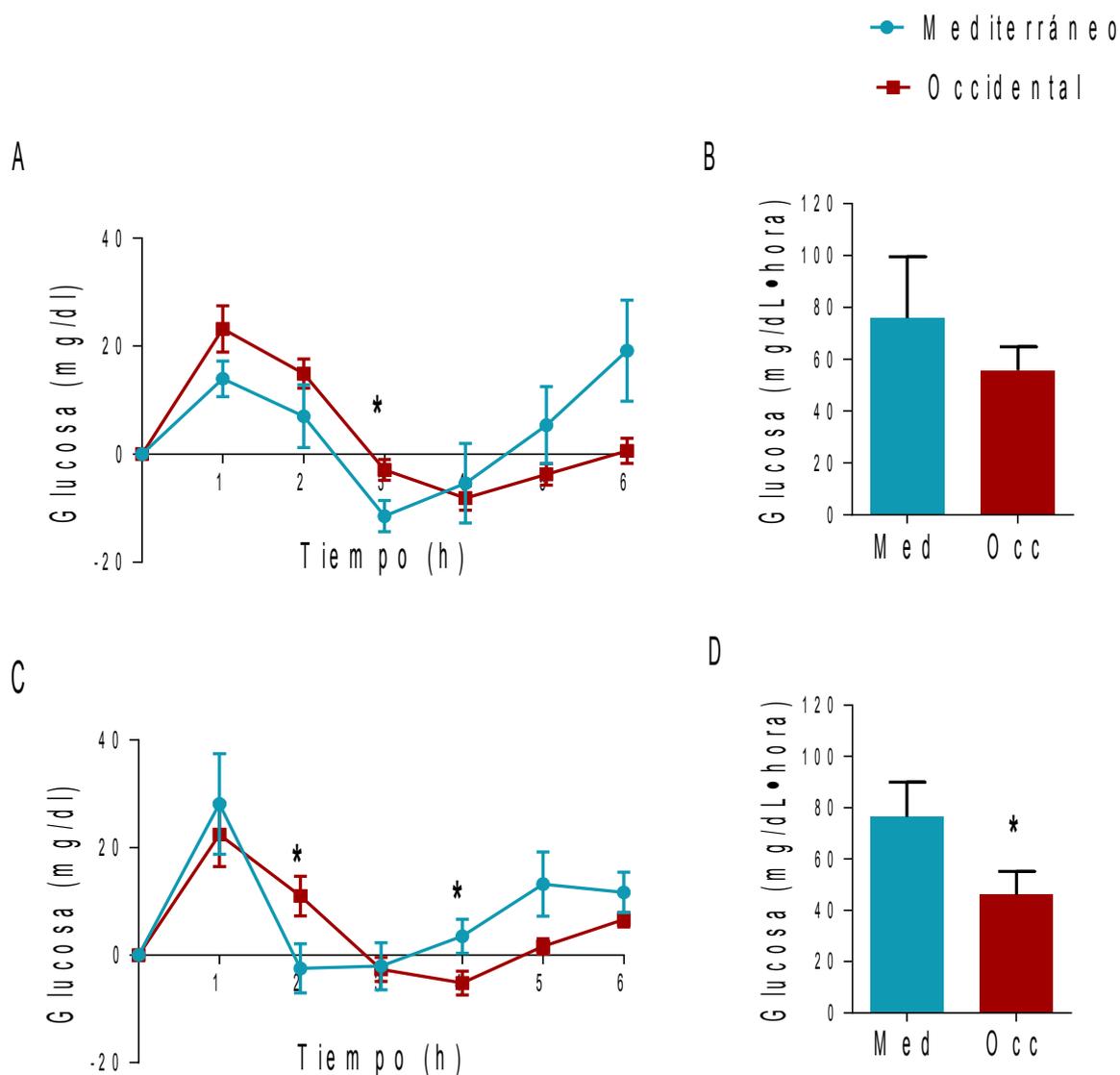
**Figura 21.** Concentración de glucosa sérica antes (0h) y después (1-6h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12. \*\*=P<0.01, \*\*\*=P<0.001 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

El cálculo incremental de cada uno de los valores postprandiales con respecto a la concentración basal permitió verificar de nuevo la variación real de los niveles de glucosa tras el consumo de los dos desayunos. Con la representación gráfica de dichos valores incrementales se observó una evolución muy similar de la glucosa durante las 6 horas después del consumo de las dietas experimentales en el grupo obeso y normopeso. Ambos experimentaron un importante incremento de glucosa a la hora 1 tras el consumo de los dos desayunos como como se indicó previamente. Y la reducción que empezó a sufrir a partir de las 2 horas en los dos grupos llegó a alcanzar valores inferiores a los basales a las 3 horas. A partir de las 4 horas, la concentración de glucosa comenzó a incrementarse de nuevo tanto en el grupo de sujetos obesos como en el de sujetos normopeso (figuras 22.A y 22.C, respectivamente).

En el grupo de obesos, se mantuvo la diferencia significativa observada a las 3 horas de consumir los dos desayunos experimentales, ya que los valores de glucosa seguían siendo mayores después del de tipo occidental (P<0.05) (figura 22.A.). En los sujetos normopesos, la elevada concentración de glucosa a las 2 horas tras el consumo del desayuno tipo occidental también siguió mostrando una diferencia significativa con respecto al mediterráneo (P<0.05). Además, el cálculo incremental reveló que el aumento de glucosa experimentado a las 4 horas después de ingerir el desayuno de tipo mediterráneo fue significativamente mayor con respecto

al valor obtenido con el desayuno de tipo occidental a esa misma hora ( $P<0.05$ ) (figura 22.C).

El iAUC mostró por tanto que la concentración de glucosa total durante el período postprandial fue superior después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo tanto en los sujetos obesos (figura 22.B) como en normopesos (figura 22.D). Esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa en el grupo de los normopesos ( $P<0.05$ ), pero no en el de los sujetos obesos.

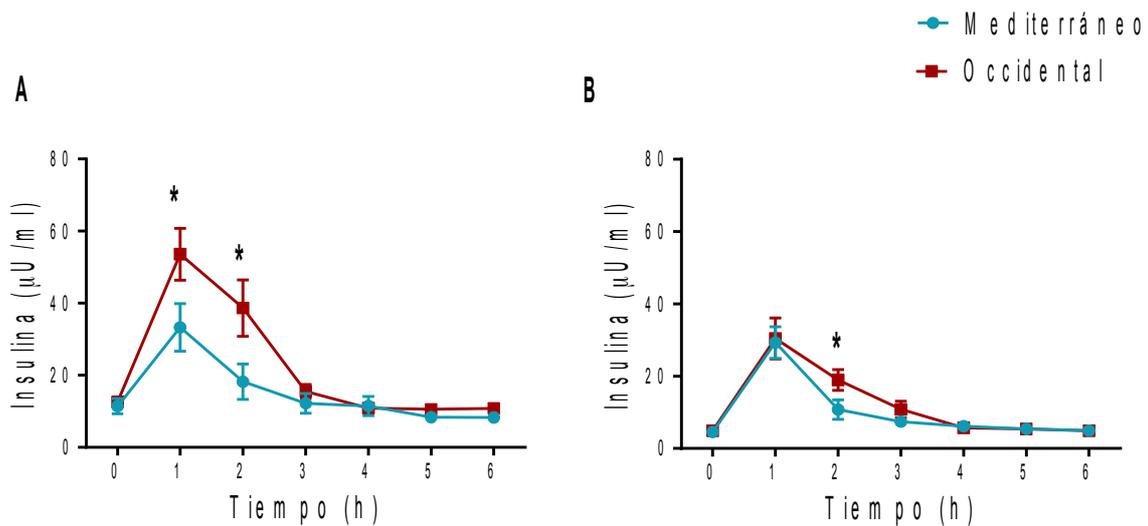


**Figura X.** Valor incremental de la concentración de glucosa sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de glucosa (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de glucosa en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ ;  $*=P<0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

### 1.2.6 Insulina

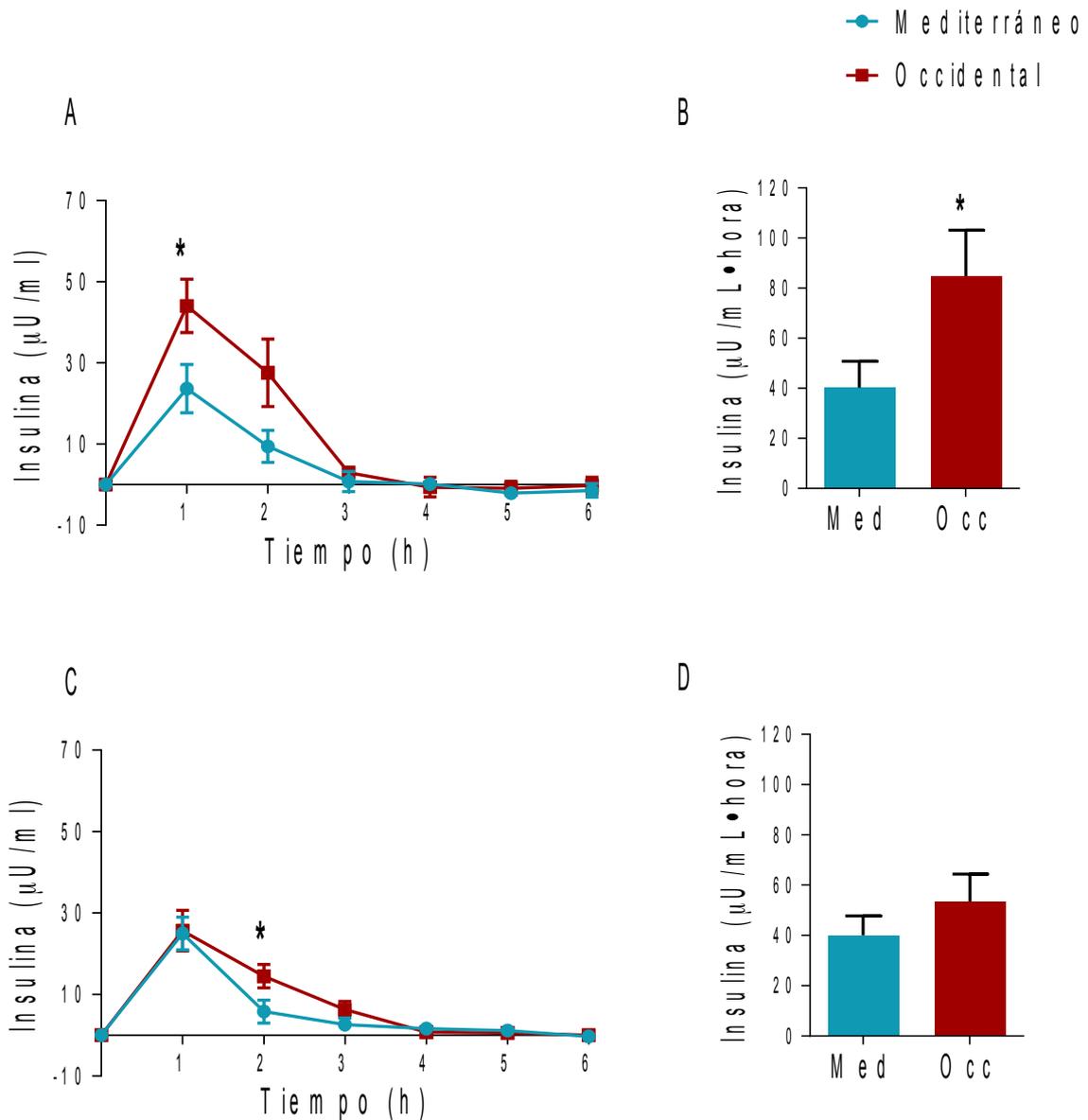
De forma similar a lo ocurrido con los niveles de glucosa tras el consumo de los dos desayunos experimentales, con la concentración de insulina en suero también se observó en el grupo de obesos y de normopesos una importante elevación en su concentración en la hora 1 del periodo postprandial. Fue destacable el incremento que experimentó el grupo de los obesos (figura 23.A) 1 hora después de consumir el desayuno de tipo occidental, ya que alcanzó un valor 4-5 veces mayor con respecto a los niveles basales ( $P<0.05$ ). El desayuno de tipo mediterráneo también causó una elevación en la concentración de insulina sérica con respecto al nivel basal a la hora 1, pero de una manera más moderada, siendo significativa la diferencia de estos valores entre las dos dietas ( $P<0.05$ ). En la hora 2 del periodo postprandial se observó un comportamiento semejante al que se vio con la concentración de glucosa, pues la concentración de insulina comenzó también a descender después del consumo de los dos desayunos experimentales. No obstante, los niveles de insulina detectados se mantuvieron significativamente superiores tras el consumo del desayuno de tipo occidental ( $P<0.05$ ). Alcanzadas las 3 horas tras las ingesta de los dos desayunos, la concentración de insulina volvió a su nivel basal, manteniéndose aparentemente constante durante el resto del periodo postprandial.

Los sujetos normopesos (figura 23.B) también experimentaron ese pico máximo de los niveles de insulina 1 hora después de consumir cualquiera de los dos desayunos, aunque no fue tan acusado como el observado en los individuos obesos. La evolución de la concentración de la insulina durante el periodo postprandial fue el mismo que el descrito en los sujetos obesos, y la diferencia entre el consumo de los dos desayunos experimentales en la concentración de insulina también fue solo significativa a las 2 horas ( $P<0.05$ ), siendo nuevamente más elevada tras la ingesta del desayuno de tipo occidental.



**Figura 23.** Concentración de insulina sérica antes (0h) y después (1-6h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12. \*= $P < 0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

El cálculo incremental de las concentraciones séricas de insulina postprandiales mostró unos resultados bastantes similares a los descritos en los párrafos anteriores, tanto en el grupo de obesos (figura 24.A) como en el de normopesos (figura 24.C). Además, permitió determinar que el incremento en los niveles de expresión de la insulina desde sus niveles basales 2 horas después de haberse consumido el desayuno de tipo occidental no mostraba una diferencia significativa con respecto al valor detectado en ese mismo momento tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo, como se indicó previamente. Sin embargo, el iAUC calculado en el grupo de los obesos (figura 24.B) mostró que la concentración total de insulina acumulada a lo largo del período postprandial sí fue significativamente superior debido al consumo del desayuno occidental, frente al valor obtenido con el desayuno de tipo mediterráneo. En el caso de individuos normopesos, esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa (figura 24.D).



**Figura 24.** Valor incremental de la concentración de insulina sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de insulina (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de insulina en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; \*=P<0.05 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

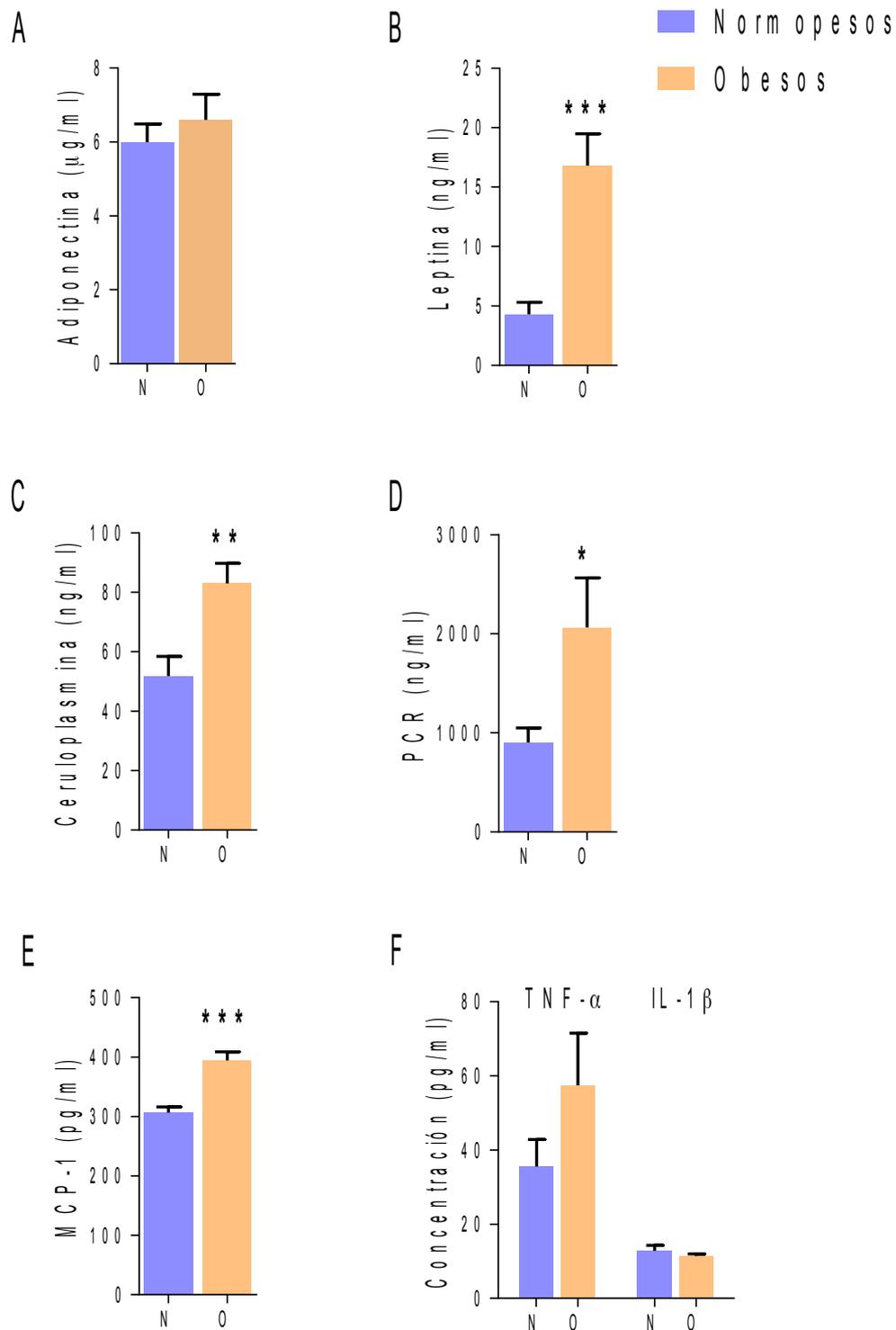
## **2. ESTUDIO DEL PERFIL DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN BASAL Y POSTPRANDIAL EN SUERO DE ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS TRAS LA INGESTA DE LOS DESAYUNOS EXPERIMENTALES**

### **2.1 Concentración basal en suero de los marcadores de inflamación**

**A**l comienzo del ensayo postprandial, se midieron los niveles basales de diversos marcadores de inflamación sistémica y adipocinas para determinar el estado inflamatorio en que se encontraban los sujetos de cada uno de los grupos experimentales. De nuevo, esos datos nos proporcionaron la información necesaria para poder evaluar la evolución de los niveles de secreción de los marcadores de inflamación desde sus valores basales en ayunas, y a lo largo del período postprandial, según la influencia del tipo de desayuno experimental consumido, el mediterráneo o el occidental.

La figura 25 muestra los valores basales de todos los marcadores de inflamación incluidos en el estudio.

Los individuos obesos y normopesos presentaron un nivel basal de adiponectina muy similar (figura 25.A), pero no de leptina (figura 25.B), ya que los valores basales detectados fueron significativamente muy superiores en el grupo de obesos frente al grupo de normopesos ( $P < 0.001$ ). La determinación de la concentración basal de ceruloplasmina (figura 25.C) y PCR (figura 25.D) también reveló una importante diferencia en los niveles de estos marcadores de inflamación entre los dos grupos del estudio. En ambos casos, los sujetos obesos presentaron una concentración mayor a la detectada en el grupo de individuos normopesos, siendo estadísticamente significativa dicha diferencia tanto en el caso de la ceruloplasmina ( $P < 0.01$ ) como en el de PCR ( $P < 0.05$ ). Los valores basales de MCP-1 (figura 25.E) mostraron una diferencia también estadísticamente muy significativa ( $P < 0.001$ ) entre los dos grupos de individuos, siendo nuevamente mucho más elevados en el caso de los sujetos obesos con respecto al de los sujetos normopesos. Asimismo, la concentración basal de TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  (figura 25.F) fue superior en el grupo de obesos, aunque en este caso la diferencia en los valores basales de estas citoquinas frente al grupo de normopesos no resultó ser significativa.



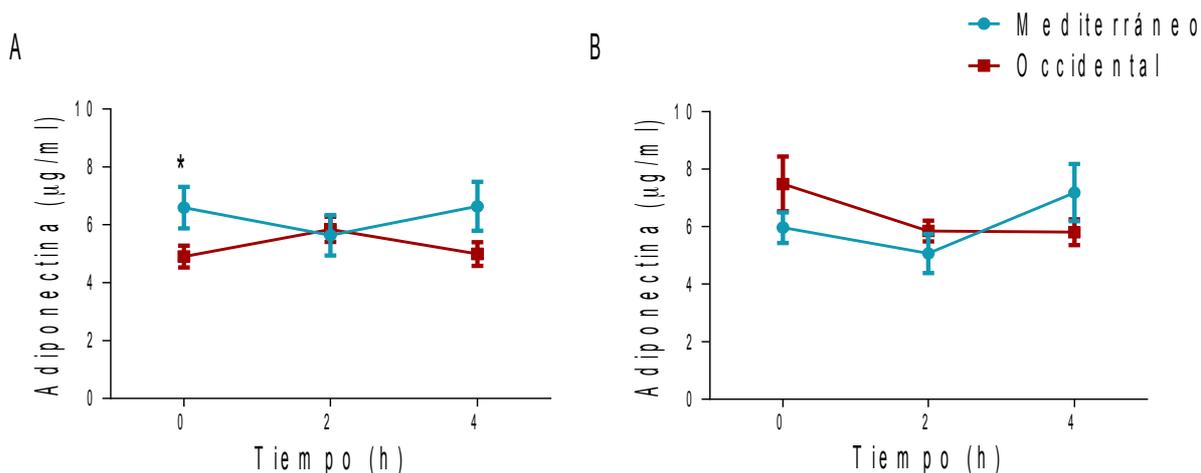
**Figura 25.** Concentración sérica basal de adiponectina (A), leptina (B), ceruloplasmina (C), PCR (D), MCP-1 (E), y TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$  (F) antes del consumo de los desayunos experimentales por los sujetos obesos (O) y normopesos (N) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; \*=P<0.05, \*\*=P<0.01, \*\*\*=P<0.001 vs sujetos normopesos (Test t de Student no pareado)

## **2.2 Concentración postprandial en suero de los marcadores de inflamación**

### **2.2.1 Adiponectina**

Como puede verse en la figura 26.A, antes de la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo por los sujetos obesos, los niveles de adiponectina fueron significativamente superiores a los detectados antes de que consumieran el desayuno de tipo occidental ( $P < 0.05$ ). No obstante, 2 horas después del consumo de los dos tipos de desayunos experimentales, el nivel de adiponectina sérica fue el mismo para los dos casos. Esto fue debido a que la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo indujo una reducción en la liberación de adiponectina respecto al nivel basal detectado, mientras que el consumo del desayuno de tipo occidental provocó su incremento. Sin embargo, a las 4 horas, la concentración de adiponectina volvió a los niveles originales (0h) en ambos casos.

Por parte de los individuos normopesos (figura 26.B), el consumo del desayuno de tipo occidental produjo una progresiva reducción de la expresión de adiponectina a lo largo del periodo postprandial. Esta reducción también se observó a las 2 horas de consumir el desayuno de tipo mediterráneo, aunque 4 horas después se elevó, detectándose unos valores mayores al nivel de expresión basal y superiores también a los alcanzados por el desayuno de tipo occidental. No obstante, no se detectaron diferencias significativas entre el consumo de los dos tipos de desayunos en este grupo de individuos.

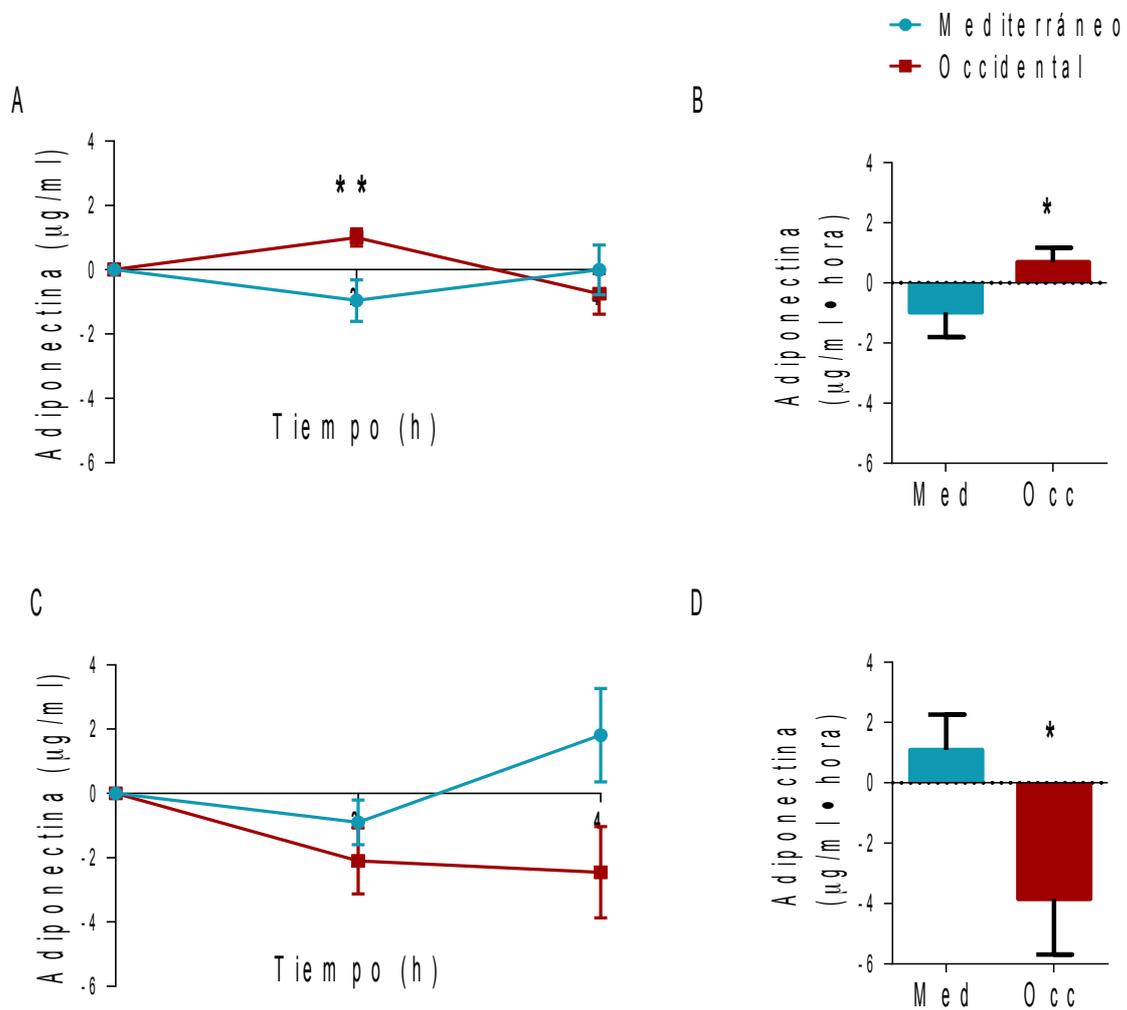


**Figura 26.** Concentración de adiponectina sérica antes (0h) y después (2 y 4 h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media ± error estándar de la media (SEM); n=12. \*=P<0.05 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student apareado).

Los valores incrementales de la concentración sérica de adiponectina respecto a la concentración basal a lo largo del periodo postprandial se representan en la figura 27. El cálculo incremental permitió apreciar una diferencia significativa en el efecto causado por la ingesta de los desayunos sobre los niveles de expresión de adiponectina, antes no detectada, en el grupo de individuos obesos (figura 27.A). La elevada liberación de adiponectina 2 horas después de consumir el desayuno de tipo occidental resultó ser estadísticamente significativa frente a la reducción de su concentración tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.01$ ). De hecho, esta influencia de los dos tipos de dietas experimentales sobre los niveles de adiponectina quedó demostrada con el cálculo de iAUC (figura 27.B), con el que se determinó que la cantidad total de adiponectina producida en el periodo postprandial fue significativamente mayor después de ingerir el desayuno de tipo occidental ( $P < 0.05$ ).

En los sujetos normopesos (figura 27.C) se observó de manera más clara la reducción que sufrió el nivel de secreción de adiponectina 2 horas después de consumir los dos desayunos experimentales respecto a los valores basales. De la misma manera, el incremento en su concentración a las 4 horas de consumir el desayuno de tipo mediterráneo se hace más apreciable. La capacidad del desayuno de tipo occidental para reducir los niveles de adiponectina postprandial por debajo del nivel basal, no observada tras la ingesta del de tipo mediterráneo, explica que la cantidad de adiponectina secretada durante todo el periodo postprandial sea

significativamente inferior respecto a la secretada tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.05$ ), tal y como se observa con el cálculo del iAUC (figura 27.D).

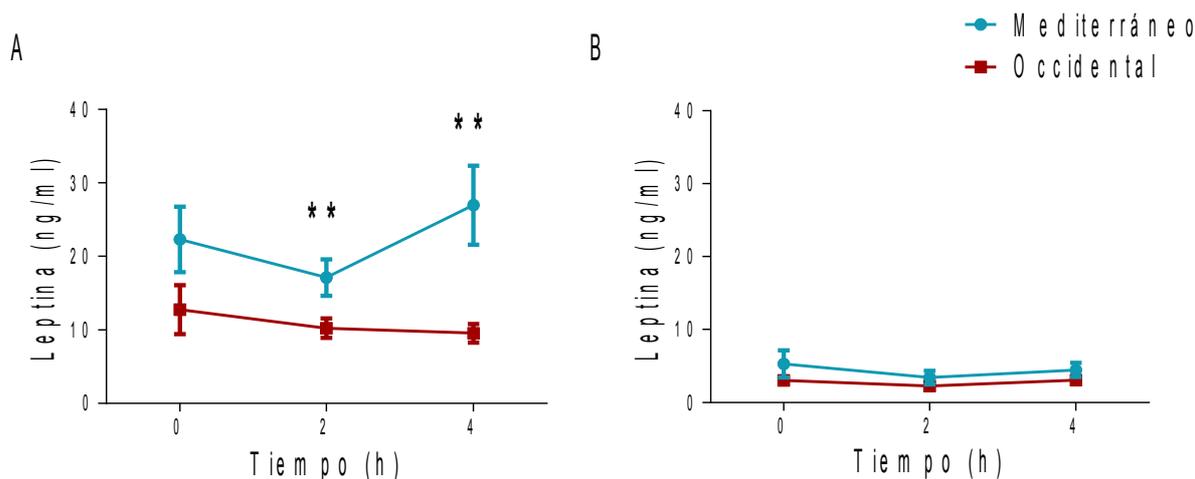


**Figura 27.** Valor incremental de la concentración de adiponectina sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de adiponectina (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de adiponectina en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ ;  $*=P < 0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

### 2.2.2 Leptina

El consumo de los dos tipos de desayunos experimentales también demostró ejercer una influencia distinta sobre la concentración sérica de leptina a lo largo del periodo postprandial en el grupo de individuos obesos (figura 28.A). De nuevo, el desayuno occidental produjo un descenso progresivo en los niveles de leptina desde el momento inicial del ensayo (0h) y hasta las 4 horas en que fue medida, aunque no se trató de una reducción muy pronunciada frente al nivel basal de leptina. En el caso del consumo del desayuno de tipo mediterráneo, 2 horas después la leptina también vio reducida su expresión sérica de forma considerable frente al valor inicial (0h). Sin embargo, los valores iniciales de leptina antes de consumir el desayuno mediterráneo ya eran superiores al valor en ayunas del ensayo realizado con el desayuno de tipo occidental. Ello contribuyó a que la diferencia a las 2 horas fuera estadísticamente significativa ( $P<0.01$ ). Al igual que lo fue a las 4 horas, ya que se detectó un significativo incremento en nivel de expresión de leptina tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.01$ ).

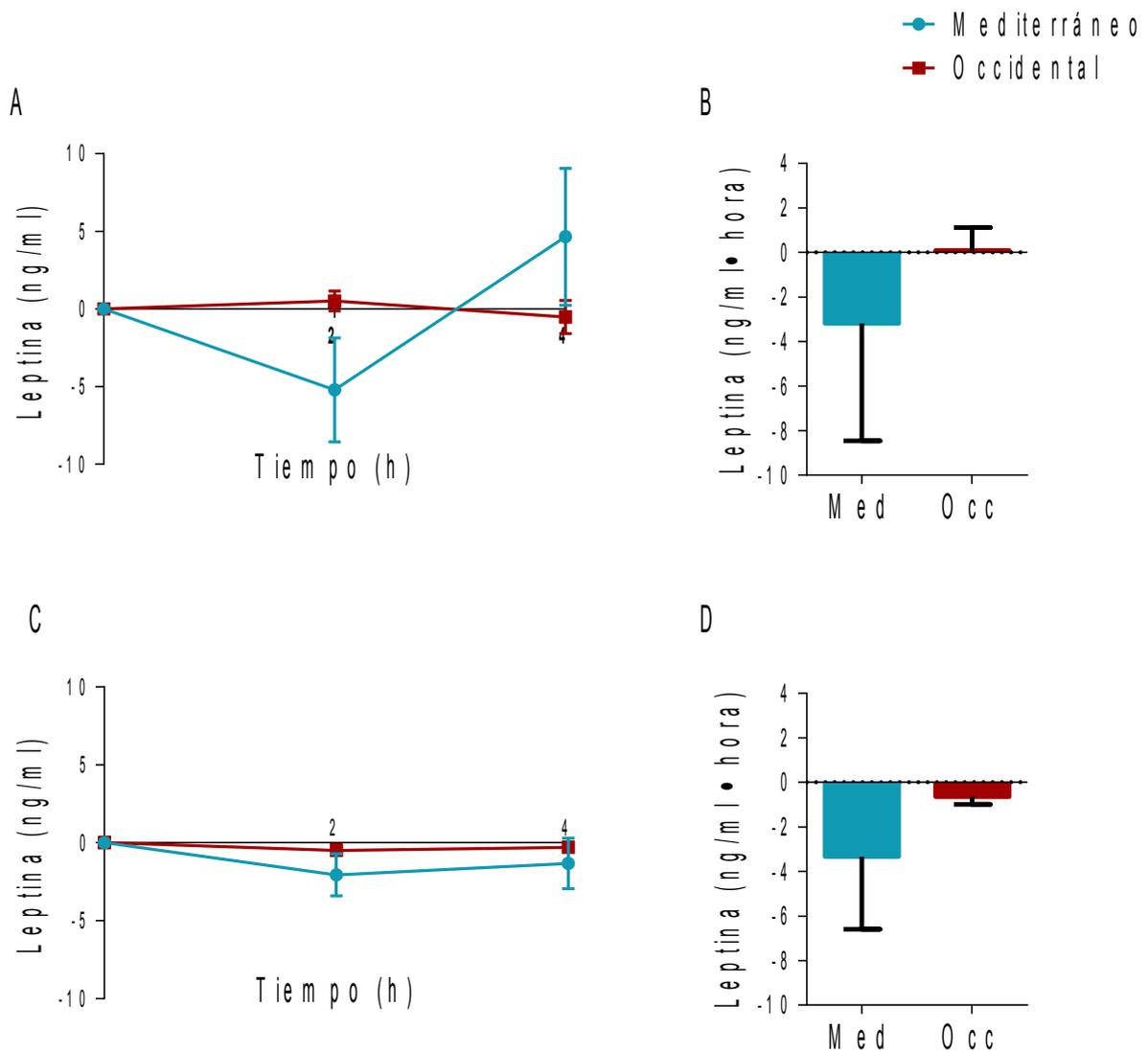
Por el contrario, el grupo de normopesos (figura 28.B) no experimentó alteración alguna en la concentración sérica de leptina durante el periodo postprandial después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo y el de tipo occidental. Se observó que los niveles postprandiales de leptina se mantuvieron constantes y similares a la concentración sérica basal durante todo el ensayo.



**Figura 28.** Concentración sérica de leptina antes (0h) y después (2 y 4 h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ .  $**=P<0.01$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

Mediante el cálculo incremental de la concentración postprandial de leptina respecto al nivel basal en el grupo de sujetos obesos pudo determinarse que las diferencias que anteriormente resultaron ser significativas entre los niveles de leptina alcanzados tras la ingesta de los dos tipos de desayuno experimentales, realmente no existían. Además, se pudo apreciar que el desayuno de tipo occidental aparentemente no manifestó tener influencia sobre la expresión de leptina en el periodo postprandial (figura 29.A). Además, el cálculo de iAUC reflejó que consumir el desayuno de tipo mediterráneo causaba una reducción en los niveles de expresión total de leptina postprandial en el grupo de los obesos (figura 29.B). No obstante, no hubo diferencias que pudieran considerarse significativas entre los dos tipos de desayunos.

En el grupo de sujetos normopesos, el cálculo incremental (figura 29.C) no reflejó grandes cambios con respecto a lo observado con anterioridad, tan solo que la concentración sérica de leptina experimentó un ligero descenso tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo, alcanzando unos valores inferiores a los obtenidos con el de tipo occidental, antes inapreciables. Y de la misma manera que sucedió con el grupo de obesos, con el cálculo del iAUC (figura 29.D) quedó reflejado de nuevo que el desayuno de tipo mediterráneo tenía mayor capacidad para reducir los niveles de leptina postprandial totales frente al de tipo occidental, aunque no de manera significativa.

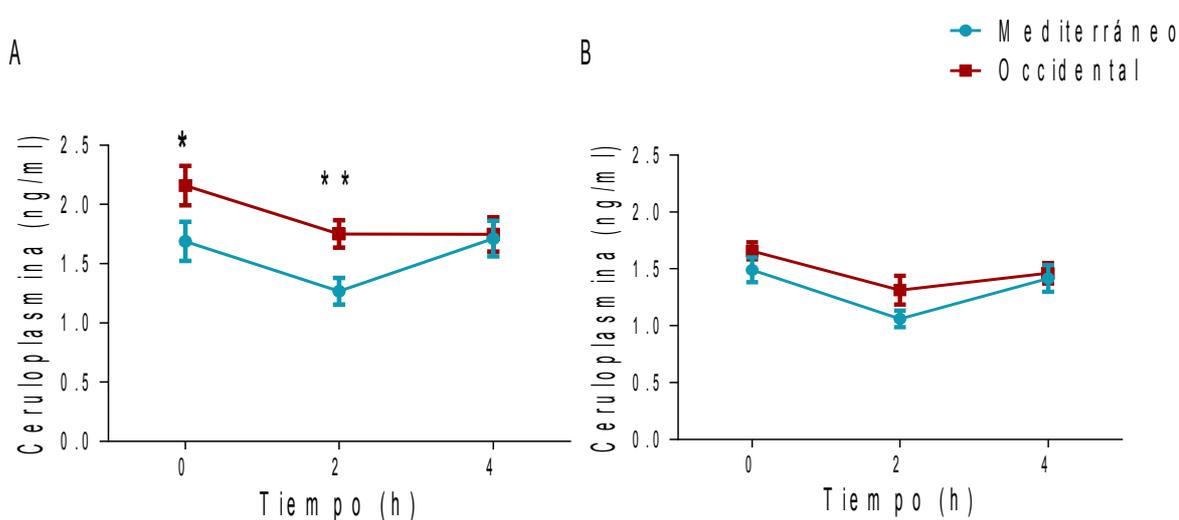


**Figura 29.** Valor incremental de la concentración de leptina sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de leptina (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de leptina en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; (Test t de Student pareado).

### 2.2.3 Ceruloplasmina

Los valores iniciales de ceruloplasmina en los individuos obesos (figura 30.A) al comienzo de los ensayos postprandiales realizados con los dos tipos de desayunos, ya mostraron una diferencia importante, ya que fueron significativamente más elevados antes de proceder con la ingesta del de tipo occidental ( $P<0.05$ ). El consumo de las dos dietas experimentales provocó una reducción en los niveles de expresión de ceruloplasmina sérica en la hora 2 del periodo postprandial respecto al valor basal. A pesar de esta reducción detectada en los dos casos, la diferencia en la expresión de ceruloplasmina alcanzada entre desayunos fue significativa, puesto que ésta era superior tras el consumo del desayuno de tipo occidental ( $P<0.05$ ). Sin embargo, a las 4 horas de ingerir el desayuno de tipo mediterráneo, el nivel de expresión de la ceruloplasmina aumentó, igualándose al detectado con el desayuno de tipo occidental a las 4 horas de su consumo, con el cual se mantuvieron constantes desde la hora 2.

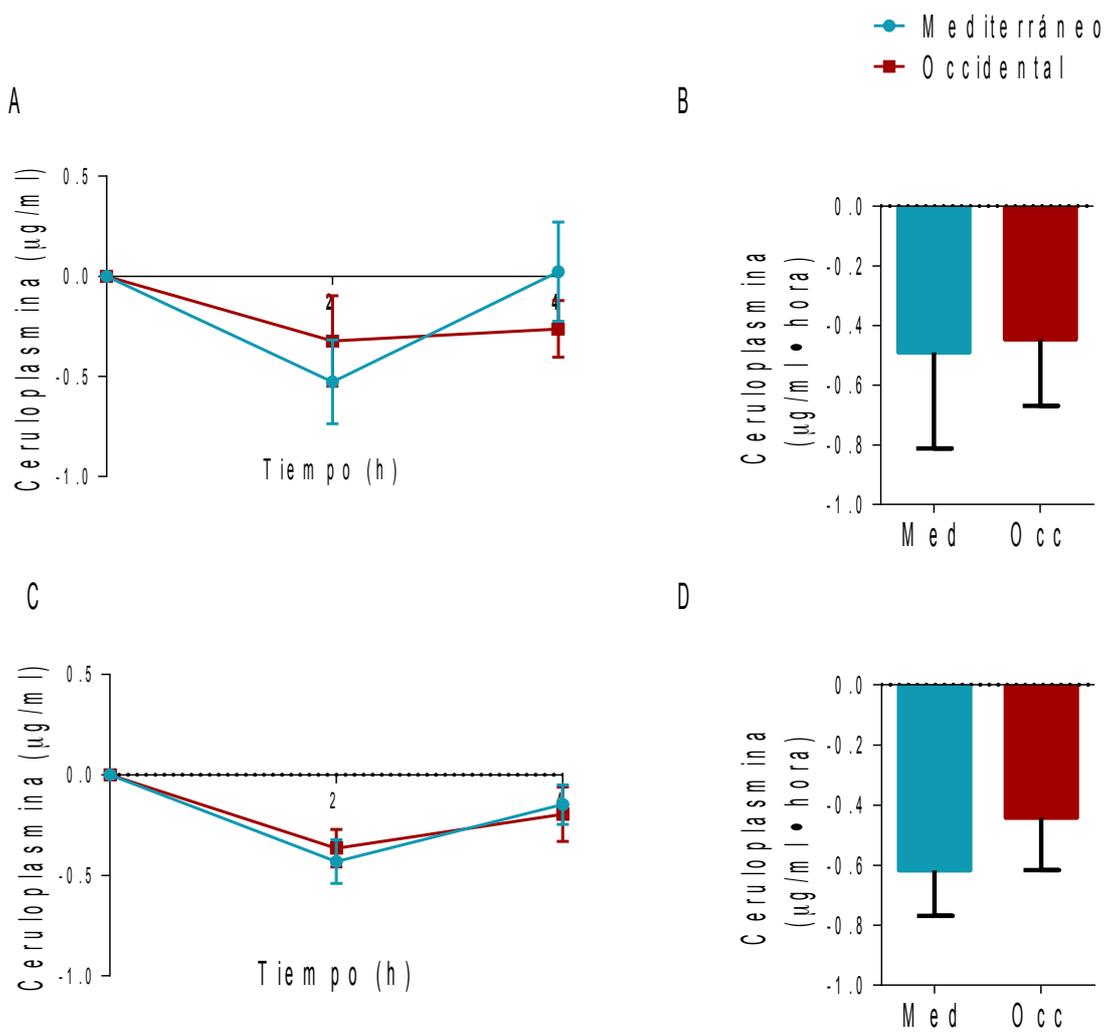
En el grupo de individuos normopesos (figura 30.B) la evolución de los niveles séricos de ceruloplasmina a lo largo del periodo postprandial tras consumir los dos tipos de dietas experimentales fue muy parecida a la que experimentaron los sujetos obesos. En este caso, la expresión de ceruloplasmina fue parecida en todos los casos después de ingerir un desayuno u otro, sin diferencias significativas entre ellos.



**Figura 30.** Concentración de ceruloplasmina sérica antes (0h) y después (2 y 4 h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ .  $*=P<0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

A pesar de las diferencias significativas obtenidas en los niveles de ceruloplasmina tras la ingesta de los dos tipos de desayunos en el grupo obeso, el cálculo incremental de los valores postprandiales en estos sujetos permitió detectar que la diferente influencia de los dos desayunos sobre su nivel de expresión no era significativa (figura 31.A). Ambos desayunos experimentales fueron responsables de reducir la concentración de ceruloplasmina a las 2 horas. Y aunque la reducción fue ligeramente superior con el consumo del desayuno de tipo mediterráneo, a las 4 horas de su ingesta, la producción de ceruloplasmina detectada fue de nuevo equivalente al nivel de producción basal. Por el contrario, el consumo del desayuno de tipo occidental lo mantuvo siempre por debajo del nivel basal. No obstante, estas ligeras diferencias entre desayunos no generaron una cantidad de ceruloplasmina postprandial total diferente entre ellos. El cálculo del iAUC demostró que la cantidad de ceruloplasmina total liberada a lo largo del periodo postprandial fue la misma tras la ingesta de los dos tipos de desayunos experimentales (figura 31.B)

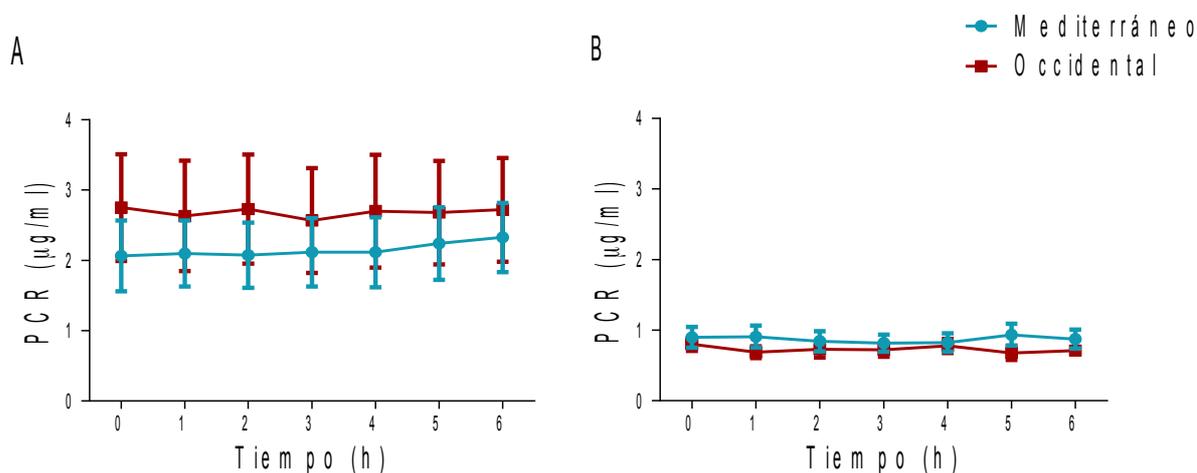
En el caso de los individuos normopesos (figura 31.C), los valores incrementales tampoco presentaron diferencias significativas entre desayunos. El consumo de los dos tipos de desayunos por parte de los sujetos normopesos ejerció la misma influencia sobre los niveles de expresión de ceruloplasmina que la que ejercieron sobre los sujetos obesos. Así mismo, el cálculo del iAUC demostró una menor producción de ceruloplasmina total en el periodo postprandial causada tanto por el consumo del desayuno de tipo mediterráneo como por el de tipo occidental con respecto a los valores basales (figura 31.D).



**Figura 31.** Valor incremental de la concentración de ceruloplasmina sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de ceruloplasmina (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de ceruloplasmina en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; (Test t de Student pareado).

## 2.2.4 PCR

La PCR fue el único marcador de inflamación cuyos niveles de expresión no se vieron alterados durante todo el periodo postprandial con respecto a la concentración basal, tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental en el grupo de sujetos obesos (figura 32.A), ni en el de normopesos (figura 32.B). A pesar de las ligeras fluctuaciones observadas, los valores de PCR no se alejaron del valor basal a ninguna de las horas en las que su expresión fue medida. Es importante señalar que en el grupo de los individuos obesos, la concentración de PCR siempre se mantuvo superior con el consumo del desayuno de tipo occidental frente al de tipo mediterráneo. Esto se debió a que los valores basales de PCR fueron más elevados al inicio del ensayo realizado con el desayuno de tipo occidental que con el de tipo mediterráneo, como ya ha ocurrido con otros marcadores de inflamación.

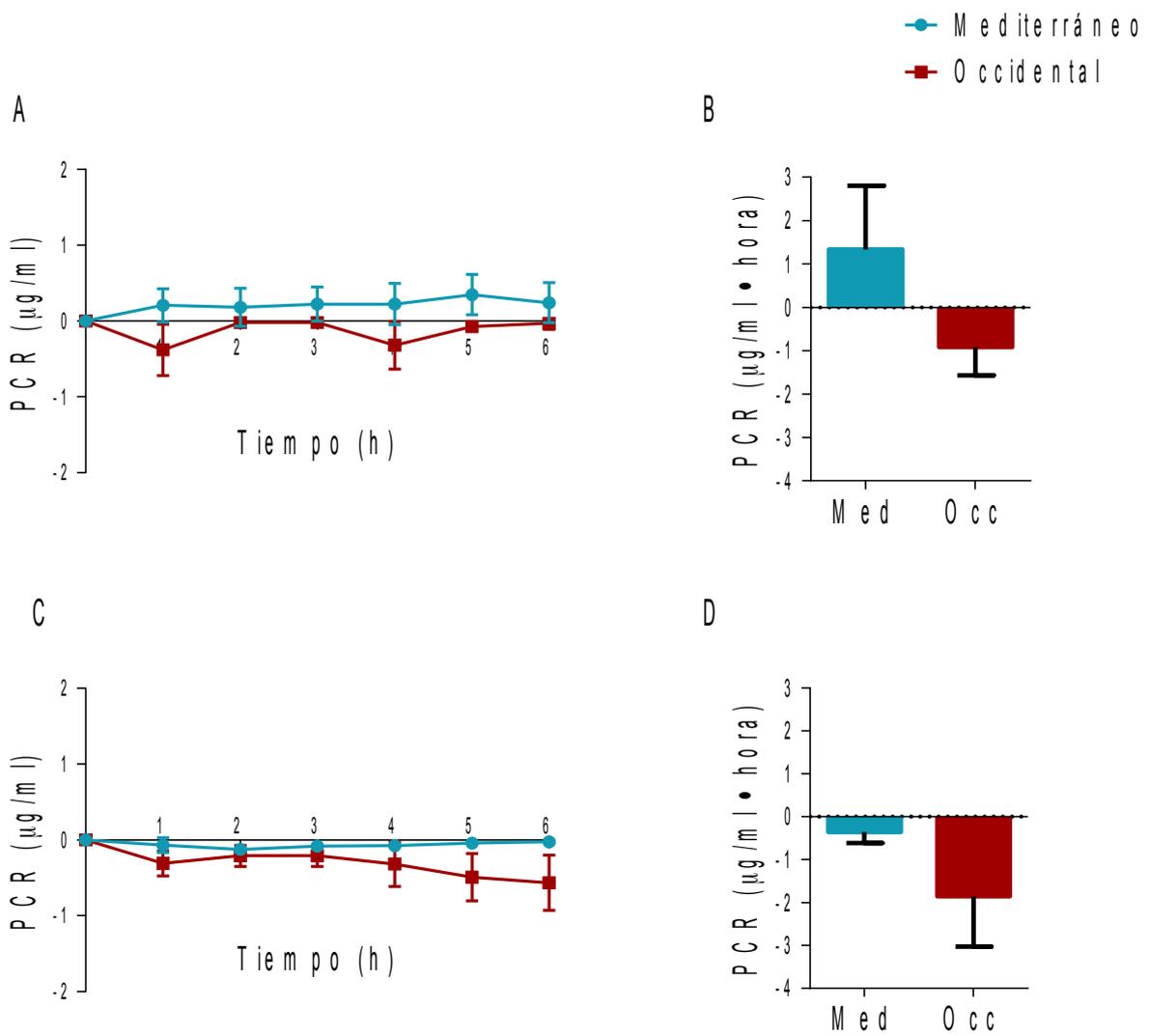


**Figura 32.** Concentración sérica de PCR antes (0h) y después (2 y 4 h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; (Test t de Student pareado).

El cálculo incremental de las concentraciones de PCR obtenidas en los sujetos obesos tras la toma de los desayunos frente al valor basal (figura 33.A) permitió apreciar de forma más objetiva la capacidad de los dos tipos desayunos experimentales para modular el nivel de expresión de PCR. La ingesta del desayuno de tipo mediterráneo por parte de estos individuos provocó un pequeño incremento en el nivel de expresión de PCR 1 hora después, quedando por encima del nivel basal, y manteniéndose constante a lo largo del periodo postprandial. En

cambio, el consumo del desayuno de tipo occidental no modificó la expresión de PCR respecto al valor inicial, salvo a las horas 1 y 4, donde fueron algo inferiores. Este comportamiento se vio representado con el cálculo del iAUC (figura 33.B), demostrándose que la concentración postprandial total de PCR se incrementó con respecto al valor basal tras la ingesta del desayuno mediterráneo, mientras que el otro desayuno produjo su reducción. Sin embargo, la diferencia encontrada entre desayunos no fue significativa.

En el caso de los sujetos normopesos (figura 33.C), el consumo del desayuno de tipo occidental produjo una progresiva y lenta reducción de la concentración sérica postprandial de PCR respecto al nivel basal, mientras que el consumo del desayuno de tipo mediterráneo no alteró su nivel en ningún caso. Tal como se vio en el grupo de sujetos obesos, la reducción de la concentración postprandial total de PCR fue superior con el consumo del desayuno de tipo occidental con respecto al de tipo mediterráneo, como fue determinado con el cálculo del iAUC (figura 33.D). Aunque la diferencia no resultó ser significativa tampoco en este caso, se observó una clara tendencia a reducirse los niveles producción de PCR por el consumo de un desayuno de tipo occidental en los dos grupos del estudio, el de obesos y el de normopesos.

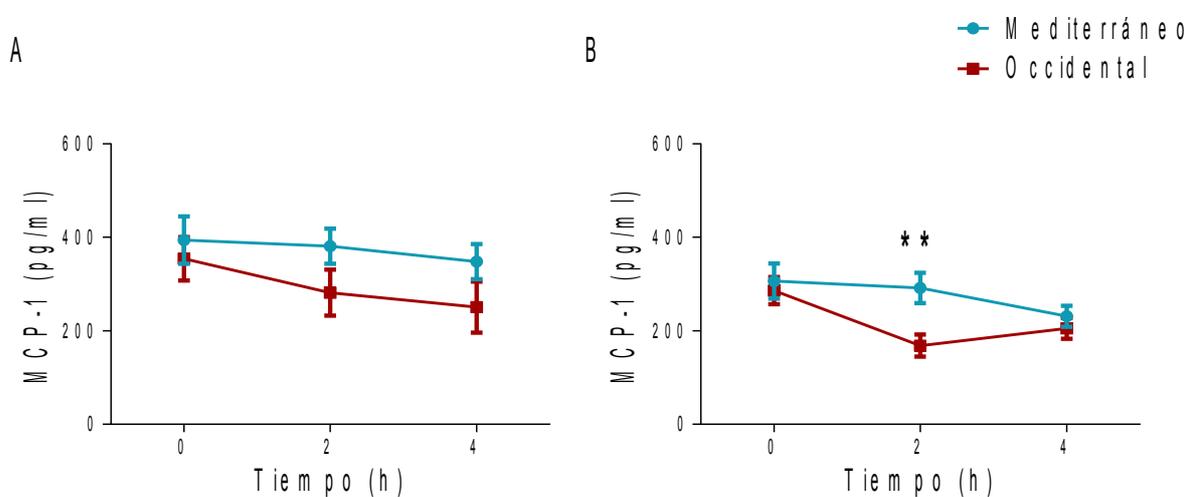


**Figura 33.** Valor incremental de la concentración de PCR sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de PCR (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de PCR en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). n=12; (Test t de Student pareado).

## 2.2.5 MCP-1

Cuando el grupo de sujetos obesos consumió las dos dietas experimentales, la de tipo mediterráneo y la de tipo occidental, experimentó una reducción en los niveles de expresión de MCP-1 (figura 34.A). En ambos casos, su concentración fue reduciéndose de manera progresiva respecto al valor basal, aunque la mayor reducción en los niveles de producción de MCP-1 sérica ocurrió después del consumo del desayuno de tipo occidental, aunque no fue significativa la diferencia.

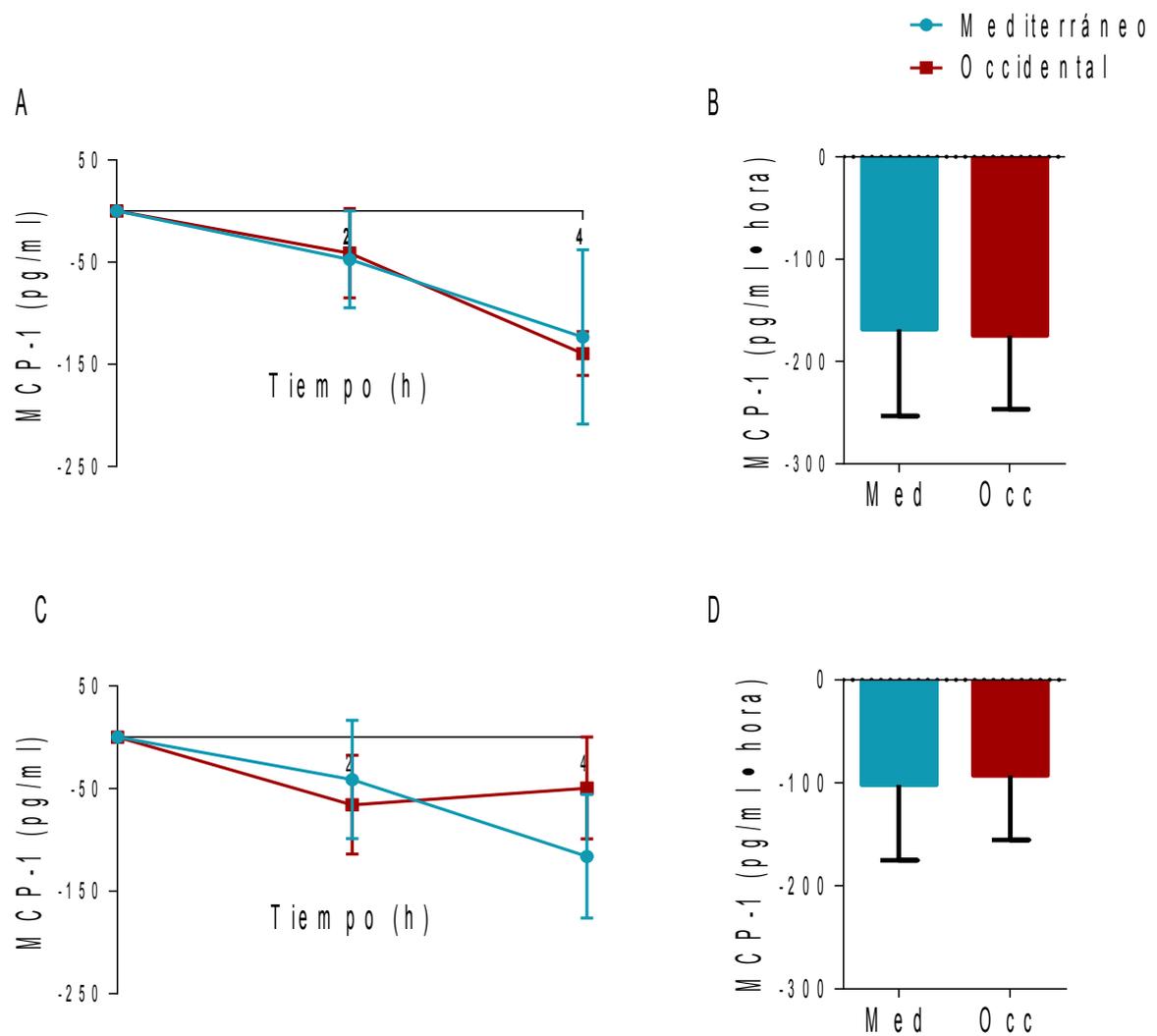
El consumo de los dos tipos de desayunos por parte de los sujetos normopesos (figura 34.B), sí hizo que a las 2 horas existiera una diferencia significativa entre ellos ya que, aunque los dos fueron responsables de que hubiera un nivel de expresión menor de MCP-1, fue con la ingesta del de tipo occidental con el que los niveles disminuyeron de manera más acusada, resultando estadísticamente significativo al compararse con el otro desayuno ( $P < 0.01$ ). Más tarde, a las 4 horas, su concentración volvió a incrementarse en ambos casos, alcanzado el mismo nivel de expresión, aunque aún por debajo del nivel de expresión de MCP-1 basal (0h).



**Figura 34.** Concentración sérica de MCP-1 antes (0h) y después (2 y 4 h) de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ .  $**=P < 0.01$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

La representación gráfica del cálculo incremental permitió confirmar que, en el grupo de sujetos obesos (figura 35.A), no hubo diferencias en la capacidad para reducir la concentración sérica postprandial de MCP-1 entre desayunos, ya que los valores obtenidos fueron prácticamente idénticos en ambos casos. Tanto el desayuno de tipo mediterráneo como el de tipo occidental influyeron de la misma manera, reduciendo los niveles de expresión de MCP-1 sérica progresivamente, produciendo además la misma concentración de MCP-1 total en el periodo postprandial, como puede verse en la figura 35.B.

La diferencia encontrada previamente entre desayunos en la concentración sérica de MCP-1 a las 2 horas de su consumo por el grupo de normopesos, no resultó ser realmente significativa estadísticamente, como se vio gracias al cálculo incremental (figura 35.C). Las dos dietas experimentales redujeron a las 2 y 4 horas los niveles de MCP-1 sérico respecto a los niveles basales, aunque a las 4 horas la concentración fue ligeramente superior con el desayuno de tipo occidental. Sin embargo, nuevamente la diferencia no fue significativa, como tampoco lo fue en la concentración de MCP-1 total del periodo postprandial, calculada con el iAUC (figura 35.D).

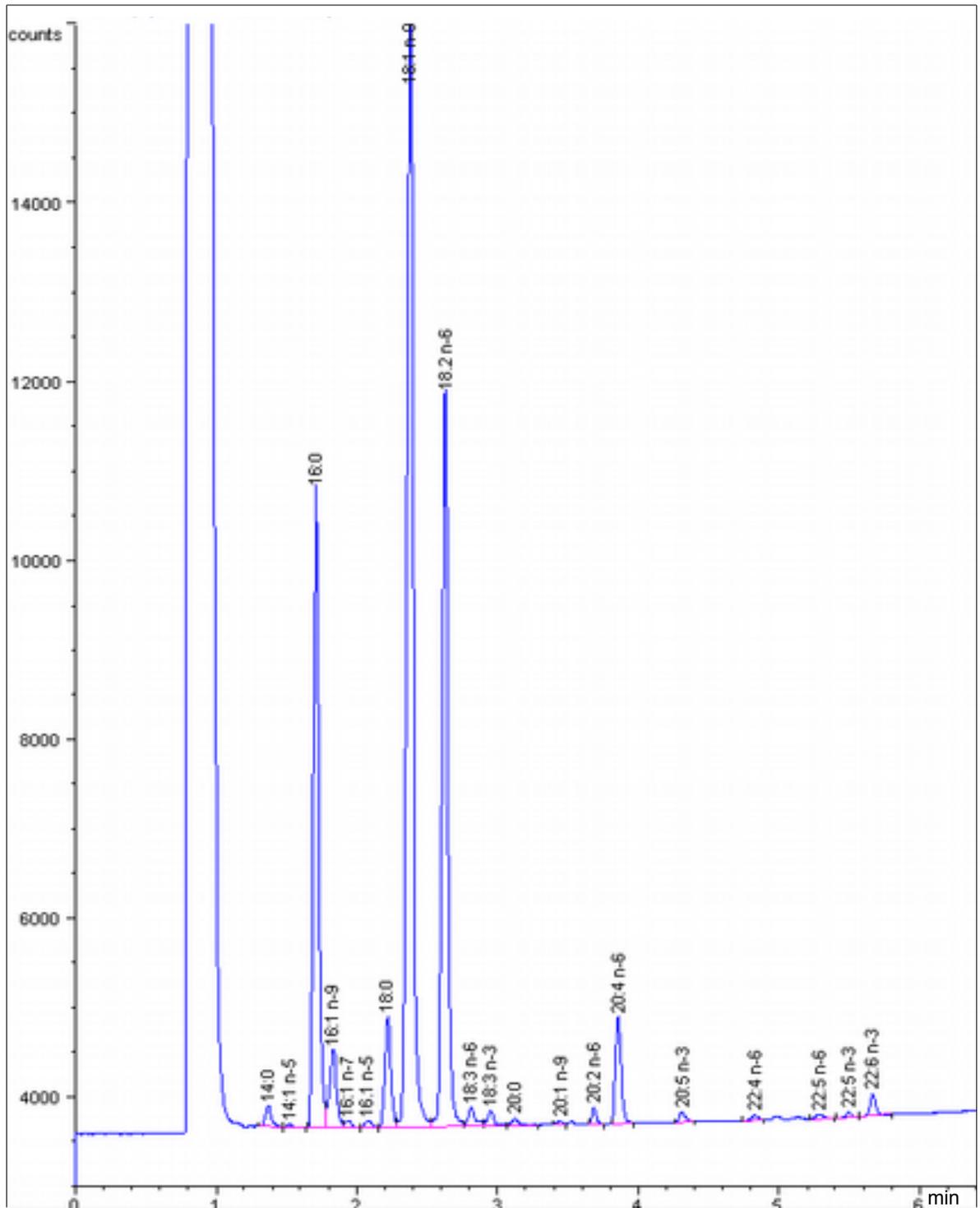


**Figura 35.** Valor incremental de la concentración de MCP-1 sérica durante el periodo postprandial con respecto al nivel basal de MCP-1 (en ayunas), tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo (Med) y occidental (Occ) por los sujetos obesos (A) y normopesos (C); y área bajo la curva incremental (iAUC) de la concentración sérica postprandial de MCP-1 en los pacientes obesos (B) y normopesos (D). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). n=12; (Test t de Student pareado).

### **3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS AISLADAS DE ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS, ANTES Y TRAS LA INGESTA DE LOS DESAYUNOS EXPERIMENTALES**

Los TG y FL presentes en las TRL fueron separados del resto de clases lipídicas mediante extracción en fase sólida (SPE). Como ha sido previamente descrito en mayor detalle en el apartado 3.2.3 de la sección de materiales y métodos, ambas fracciones lipídicas se sometieron a metilación y los FAME resultantes fueron separados y analizados por CG. La cuantificación de cada uno de los AG se expresó como porcentaje de área relativa respecto al total de AG.

La figura 36 muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos tras la separación de los ésteres metílicos de AG de las fracciones de TG y FL presentes en las TRL aisladas del suero de los participantes del estudio después de que consumieran uno de los dos tipos de desayunos experimentales.



**Figura 36.** Cromatograma representativo de la separación de los ésteres metílicos de AG de los TG presentes en las TRL. Ejemplo procedente de una muestra aislada de uno de los participantes obesos del estudio a las 2 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo. La separación fue realizada mediante CG según se describe en el apartado sección 3.2.3 de la sección de materiales y métodos.

### **3.1 Estudio de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos y fosfolípidos extraídos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TRL) aisladas de los adultos normopesos**

#### **3.1.1 Ácidos grasos extraídos de la fracción de triglicéridos**

La composición de AG de los TG extraídos de las TRL procedentes de los normopesos se indica en la tabla 7. Antes de la ingesta de los dos desayunos, el de tipo mediterráneo y el de tipo occidental, las partículas de TRL analizadas mostraron tener una composición de AG similar. Las partículas solo diferían en el contenido del ácido eicosenoico (20:1 n-9) ( $P < 0.01$ ), cuyo contenido ligeramente menor en las TRL aisladas antes de comenzar el ensayo en el que los sujetos normopesos consumirían el desayuno de tipo occidental, resultó ser estadísticamente significativo con respecto al contenido de este AG en la TRL aisladas antes del comienzo de ensayo postprandial de tipo mediterráneo.

En la hora 2 del periodo postprandial, la distinta carga lipídica procedente de los dos tipos de dietas experimentales se hizo evidente en la composición de las partículas. Estas diferencias se manifestaron principalmente en el contenido de los SFA y MUFA totales, ya que la presencia de SFA fue significativamente más elevada en las TRL procedentes del desayuno de tipo occidental, mientras que los MUFA estaban especialmente elevados en las derivadas del consumo de desayuno de tipo mediterráneo, siendo tales diferencias estadísticamente muy significativas ( $P < 0.001$ ). Esto fue debido por una parte a que el consumo del desayuno de tipo occidental elevó muy significativamente el contenido de los ácidos mirístico (14:0) ( $P < 0.001$ ) y palmítico (16:0) ( $P < 0.01$ ), lo que no sucedió tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo, que causó por el contrario una ligera reducción en estos AG. Por otro lado, la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo logró incrementar de forma significativa el contenido del ácido oleico ( $P < 0.01$ ), pero redujo el del ácido miristoleico (14:1 n-5), cuyo contenido sufrió un significativo incremento en las partículas derivadas del desayuno de tipo occidental ( $P < 0.01$ ).

Más tarde, a las 4 horas de la ingesta de los desayunos experimentales, la diferencia en el contenido total de SFA entre partículas procedentes de ambos desayunos se mantuvo estadísticamente muy significativa ( $P < 0.001$ ). El contenido de los ácidos mirístico y palmítico continuó siendo mucho más elevado en las TRL aisladas después de consumir el desayuno de

tipo occidental ( $P < 0.001$  en ambos casos), además del ácido esteárico, cuyo contenido fue significativamente superior frente al de las derivadas del desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.01$ ). Y aunque la proporción en la que el ácido araquídico (20:0) se encuentra en las TRL es muy reducida, su menor contenido en aquellas que fueron aisladas después de la ingesta del desayuno de tipo occidental respecto a las otras lipoproteínas resultó ser estadísticamente muy significativo ( $P < 0.001$ ).

El contenido total de MUFA a las 4 horas continuó siendo diferente de manera muy significativa en las TRL aisladas de los dos desayunos ( $P < 0.001$ ), ya que la ingesta del de tipo mediterráneo hizo que su contenido se mantuviera elevado en las partículas durante todo el periodo postprandial, mientras que el de tipo occidental siguió causando su reducción. El principal responsable de esta diferencia fue nuevamente el ácido oleico, que se encontró en niveles muy superiores con el primer desayuno con respecto al segundo ( $P < 0.001$ ). Y aunque el contenido del ácido palmitoleico (16:1 n-7) fue reduciéndose conforme transcurrió el periodo postprandial tras la ingesta de los dos tipos de dietas experimentales, su contenido fue significativamente superior en las partículas aisladas después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.01$ ).

El contenido total de PUFA n-3 se elevó de forma muy significativa en las TRL al consumir el desayuno occidental frente al valor obtenido con la ingesta del de tipo mediterráneo ( $P < 0.001$ ), especialmente debido al elevado contenido del ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3). También destacó la diferencia en el contenido de los ácidos  $\gamma$ -linolénico (18:3 n-6) y eicosadienoico (20:2 n-6), ya que el primero se encontró presente en cantidades significativamente más elevadas después de ingerir el desayuno occidental, mientras que el segundo se redujo con el desayuno de tipo mediterráneo, resultando en ambos casos una diferencia estadísticamente muy significativa ( $P < 0.001$ ). En cualquier caso, la presencia de estos tres AG en TG de TRL postprandiales fue meramente testimonial, encontrándose todos ellos en concentraciones inferiores al 1%.

**Tabla 7** Composición en ácidos grasos de triglicéridos de lipoproteínas ricas en triglicéridos antes (0h) y 2h y 4h después de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos normopesos.

Ácido graso (%)	0 Horas				2 Horas				4 Horas			
	Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>14:0</b>	1,50	0,98	0,97	0,50	1,17	0,58	3,16	1,11	1,59	0,17	3,01	0,77
							***				***	
<b>14:1 n-5</b>	0,47	0,31	0,28	0,23	0,22	0,21	0,61	0,25	0,48	0,13	0,56	0,15
							**					
<b>16:0</b>	21,31	3,27	20,06	2,29	20,87	2,06	24,19	2,85	19,55	1,47	25,34	3,34
							**				***	
<b>16:1 n-7</b>	4,65	2,07	3,64	1,17	3,86	1,26	4,24	1,14	3,51	0,71	2,39	0,63
											**	
<b>18:0</b>	6,27	2,55	5,43	2,00	6,77	3,22	6,20	1,11	5,79	1,30	7,97	2,48
											*	
<b>18:1 n-9</b>	38,55	1,61	39,32	4,38	43,82	4,66	37,27	4,07	44,28	3,53	36,80	3,31
							**				***	
<b>18:2 n-6</b>	20,79	3,63	24,17	5,84	18,53	3,65	19,22	4,59	18,17	1,77	15,48	4,11
<b>18:3 n-6</b>	0,46	0,16	0,66	0,28	0,50	0,30	0,45	0,15	0,54	0,15	2,30	0,59
											***	
<b>18:3 n-3</b>	0,77	0,37	0,79	0,60	0,86	0,62	0,64	0,33	0,58	0,13	1,70	0,49
											***	
<b>20:0</b>	0,64	0,59	0,38	0,38	0,71	0,68	0,27	0,21	0,35	0,08	0,21	0,06
											***	
<b>20:1 n-9</b>	1,24	0,80	0,42**	0,40	0,49	0,37	0,23	0,26	0,27	0,08	0,42	0,13
											**	
<b>20:2 n-6</b>	0,32	0,13	0,36	0,07	0,26	0,11	0,34	0,07	0,17	0,05	0,39	0,12
											***	
<b>20:4 n-6</b>	2,17	0,56	2,61	1,12	1,95	0,56	1,92	0,40	1,57	0,23	1,39	0,16
<b>20:5 n-3</b>	0,58	0,23	0,40	0,26	0,74	0,64	0,32	0,34	2,24	0,23	2,05	0,42
<b>Resto</b>	1,05	0,28	1,05	0,49	1,22	0,49	1,01	0,25	0,90	0,18	0,97	0,19
<b>SFA</b>	29,24	3,42	26,67	2,49	27,12	2,80	33,77	4,57	27,29	2,16	36,53	5,49
							***				***	
<b>MUFA</b>	45,01	1,61	43,56	4,98	48,70	3,32	42,34	3,72	48,55	3,07	40,16	3,21
							***				***	
<b>PUFA n-6</b>	23,93	3,98	28,07	6,15	22,10	3,20	22,33	4,63	20,44	1,79	19,56	4,21
<b>PUFA n-3</b>	2,00	0,53	1,70	1,03	2,08	1,32	1,56	0,75	2,83	0,22	3,75	0,61
											***	

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD); n=12. Abreviaturas: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. \*= P <0.05, \*\*= P <0.01 y \*\*\* =P <0.001, vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado)

### 3.1.2 Ácidos grasos extraídos de la fracción de fosfolípidos

La caracterización de los AG contenidos en los FL de las TRL del grupo de individuos normopesos se muestra en la tabla 8. De la misma manera que ocurrió con los AG de los TG, se observó una especial influencia de la carga lipídica de los desayunos consumidos sobre el contenido de SFA de los FL. Es importante señalar que desde el inicio del ensayo ya fue significativa la diferencia en el contenido de algunos AG minoritarios como el mirístico, miristoleico, araquídico, eicosenoico y eicosapentaenoico (20:5 n-3) entre partículas, debido a que el nivel detectado fue significativamente superior en las TRL aisladas a la hora 0 del ensayo realizado con el desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.05$ ) con respecto al occidental.

Sin embargo, en la hora 2 del periodo postprandial, tales diferencias no fueron detectables debido a una reducción en el contenido de todos ellos después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo. Este desayuno también produjo un aumento del contenido del ácido  $\alpha$ -linolénico en las partículas TRL, mientras que el de tipo occidental causó su reducción de forma importante, siendo la diferencia estadísticamente significativa entre los dos desayunos ( $P < 0.01$ ). El contenido del ácido linoleico (18:2 n-6) se elevó debido al consumo de los dos desayunos, aunque el incremento fue significativamente superior tras el de tipo occidental ( $P < 0.05$ ).

Aunque a las 4 horas de ingerir los desayunos no se observaron diferencias importantes en el contenido total de SFA, si fue significativa la diferencia entre ciertos SFA. Por ejemplo, a pesar de que la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo no alteró el contenido del ácido mirístico desde la hora 0 y que el de tipo occidental lo elevó a lo largo del periodo postprandial, los niveles fueron significativamente más elevados en las TRL derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.05$ ). Además, la reducción en el contenido de los ácidos esteárico y araquídico fue significativamente mayor con el de tipo mediterráneo ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente). Donde sí se detectó una importante influencia de la carga lipídica de las dos dietas fue en el contenido del ácido  $\alpha$ -linolénico. Aunque su contenido fue disminuyendo a lo largo del periodo postprandial, a las 4 horas de consumir los dos desayunos experimentales su contenido fue muy superior en las TRL derivadas del consumo del desayuno de tipo occidental con respecto a las que se aislaron tras la ingesta del de tipo mediterráneo ( $P < 0.001$ ).

**Tabla 8.** Composición en ácidos grasos de fosfolípidos de lipoproteínas ricas en triglicéridos antes (0h) y 2h y 4h después de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos normopesos.

Ácido graso (%)	0 Horas				2 Horas				4 Horas			
	Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>14:0</b>	2,28	1,18	0,99 **	0,63	1,44	1,27	0,74	0,50	2,14	0,30	1,69 *	0,48
<b>14:1 n-5</b>	1,75	1,07	0,91 *	0,56	0,32	0,21	0,69	0,52	0,37	0,16	0,38	0,11
<b>16:0</b>	25,01	4,89	25,06	3,98	24,26	2,85	24,31	1,59	21,92	1,31	22,55	2,53
<b>16:1 n-7</b>	4,01	1,96	3,39	2,20	4,30	2,92	2,85	2,79	1,88	0,18	2,01	0,33
<b>18:0</b>	18,61	4,82	20,35	2,64	18,86	1,76	17,30	2,11	15,59	1,50	17,02 *	1,21
<b>18:1 n-9</b>	18,21	6,23	16,19	2,82	17,37	5,83	15,71	4,26	25,60	1,46	24,23	1,92
<b>18:2 n-6</b>	12,75	2,98	15,61	3,65	14,17	5,21	19,30 *	2,44	19,25	1,36	19,00	1,63
<b>18:3 n-6</b>	0,31	0,12	0,86	0,87	0,47	0,27	0,35	0,24	1,17	0,13	1,24	0,20
<b>18:3 n-3</b>	2,90	2,07	2,42	1,83	3,67	2,56	0,87 **	0,76	0,28	0,09	0,49 ***	0,11
<b>20:0</b>	1,66	1,43	0,46 *	0,32	0,43	0,21	0,35	0,27	0,18	0,06	0,29 **	0,07
<b>20:1 n-9</b>	2,78	1,66	1,49 *	0,68	1,04	0,86	1,41	0,92	1,28	0,29	1,23	0,18
<b>20:2 n-6</b>	2,00	0,68	2,94	1,39	3,64	2,21	2,50	0,86	2,03	1,15	1,41	0,24
<b>20:4 n-6</b>	6,94	2,29	7,63	2,47	7,32	3,46	9,57	2,57	5,48	1,04	4,97	1,19
<b>20:5 n-3</b>	1,90	1,67	0,65 *	0,39	0,89	0,81	0,80	0,67	1,28	0,21	1,13	0,14
<b>Resto</b>	3,57	1,49	3,94	1,18	3,80	1,34	4,32	4,12	1,56	0,27	2,35 ***	0,53
<b>SFA</b>	45,67	8,16	46,15	5,19	44,63	2,78	42,52	2,26	39,82	1,47	41,56	2,73
<b>MUFA</b>	25,49	5,69	21,48	3,07	22,78	6,66	20,38	5,17	29,13	1,48	27,86	1,89
<b>PUFA n-6</b>	21,90	4,76	27,18 *	5,41	26,08	7,73	32,19 *	4,35	27,93	1,44	26,62	1,77
<b>PUFA n-3S</b>	6,93	4,54	5,20	2,21	6,51	3,01	4,91	1,27	1,56	0,25	1,62	0,15

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD); n=12. Abreviaturas: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. \*= $P < 0.05$ , \*\*= $P < 0.01$  y \*\*\*= $P < 0.001$ , vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

## **3.2 Estudio de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos y fosfolípidos extraídos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos aisladas de los adultos obesos**

### **3.2.1 Ácidos grasos extraídos de la fracción de triglicéridos**

La caracterización del contenido de AG extraídos de los TG presentes en las TRL aisladas de los individuos obesos antes (0h) y 2 y 4 horas después de consumir los dos tipos desayunos experimentales, el mediterráneo y el occidental, se muestra en la tabla 9. Se observó que la composición de las partículas aisladas al inicio de los dos ensayos (0h) fue similar, a pesar del mayor contenido del ácido eicosapentaenoico detectado en las TRL aisladas antes de que consumieran el desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.05$ ).

La ingesta de las dos dietas experimentales tuvo la misma influencia sobre el contenido total de SFA y MUFA de las TRL que la que se observó en el grupo de normopesos a la hora 2 del periodo postprandial. La fracción de SFA fue muy superior 2 horas después del consumo del desayuno de tipo occidental con respecto al desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.001$ ). Esto se debió a que el contenido de los ácidos mirístico, palmítico y esteárico se elevó de forma significativa, especialmente el primero de ellos ( $P<0.001$ ), a causa de la carga lipídica del desayuno de tipo occidental, aunque el del ácido araquídico se redujo ( $P<0.05$ ). Y la diferencia en la fracción de los MUFA también fue significativa ( $P<0.01$ ), especialmente por el importante incremento en el contenido del ácido oleico manifestado tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.001$ ).

A las 4 horas del periodo postprandial, la diferencia detectada en el contenido total de SFA entre partículas se mantuvo ( $P<0.001$ ), ya que mientras que con el desayuno mediterráneo su contenido no se vio alterado desde el inicio del ensayo, los niveles de los ácidos mirístico, palmítico y esteárico siguieron incrementándose de forma significativa con el de tipo occidental. De la misma manera, el contenido de los MUFA totales siguió siendo superior en las partículas derivadas del desayuno de tipo mediterráneo, con una diferencia más marcada a la observada previamente a la hora 2 del periodo postprandial ( $P<0.001$ ). Nuevamente, el responsable de ello fue el ácido oleico, cuyo contenido siguió en aumento debido a la carga lipídica aportada por el desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.001$ ). Y aunque el desayuno mediterráneo también causó el incremento de ácido miristoleico, su contenido fue muy superior tras el consumo del desayuno de tipo occidental ( $P<0.001$ ). Al contrario que ocurrió en los normopesos, no se encontraron

diferencias significativas en el contenido de PUFA n-3 totales en las TRL tras la ingesta de un tipo de desayuno u otro. Sin embargo, se observó que el consumo del de tipo mediterráneo provocó un mayor incremento en el contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico frente al de tipo occidental ( $P<0.05$ ), y que la carga de ácido araquidónico (20:4 n-3) en las partículas fue muy inferior 4 horas después de consumir el desayuno de tipo occidental ( $P<0.001$ ).

**Tabla 9** Composición en ácidos grasos de triglicéridos de lipoproteínas ricas en triglicéridos antes (0h) y 2h y 4h después de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos obesos.

Ácido graso (%)	0 Horas				2 Horas				4 Horas			
	Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>14:0</b>	1,26	0,62	1,16	0,49	1,12	0,35	2,55	0,96	1,47	0,26	2,91	0,87
							***				***	
<b>14:1 n-5</b>	0,12	0,11	0,20	0,13	0,27	0,25	0,41	0,16	0,24	0,08	0,48	0,14
											***	
<b>16:0</b>	21,78	2,88	22,00	2,74	20,84	3,04	23,55	2,33	21,20	2,83	25,23	2,62
							*				**	
<b>16:1 n-7</b>	3,61	1,01	3,46	0,99	3,88	0,42	4,03	0,57	3,87	0,62	4,54	1,09
<b>18:0</b>	4,29	1,53	5,33	2,70	4,06	0,81	5,12	0,91	4,16	0,86	5,99	1,62
							*				**	
<b>18:1 n-9</b>	38,44	3,44	35,10	2,98	41,26	4,26	34,38	3,23	40,49	3,98	34,34	2,70
							***				***	
<b>18:2 n-6</b>	23,99	5,15	25,96	4,90	22,19	3,48	23,60	4,68	20,91	2,23	21,58	3,77
<b>18:3 n-6</b>	0,80	0,28	0,68	0,25	0,64	0,27	0,67	0,20	0,77	0,22	0,82	0,24
<b>18:3 n-3</b>	0,66	0,27	0,74	0,50	0,53	0,16	0,49	0,22	0,73	0,22	0,54	0,14
											*	
<b>20:0</b>	0,39	0,19	0,39	0,25	0,43	0,21	0,24	0,11	0,38	0,13	0,35	0,13
							*					
<b>20:1 n-9</b>	0,22	0,16	0,42	0,42	0,26	0,35	0,70	0,72	0,34	0,10	0,31	0,10
<b>20:2 n-6</b>	0,49	0,17	0,46	0,11	0,45	0,12	0,47	0,12	0,30	0,09	0,32	0,10
<b>20:4 n-6</b>	2,61	0,50	2,55	0,66	2,24	0,34	2,36	0,57	1,49	0,18	0,39	0,13
											***	
<b>20:5 n-3</b>	0,48	0,21	0,29	0,15	0,37	0,23	0,27	0,15	2,41	0,28	2,18	0,60
			*									
<b>Resto</b>	1,33	0,47	1,46	0,76	1,55	0,71	1,21	0,38	1,23	0,26	1,31	0,27
<b>SFA</b>	27,59	4,26	29,45	4,29	26,41	3,47	32,03	2,73	27,21	3,22	34,72	3,63
							***				***	
<b>MUFA</b>	42,37	3,35	39,62	2,44	45,61	3,86	40,08	2,80	44,95	3,68	39,19	2,59
							**				***	
<b>PUFA n-6</b>	28,17	5,21	28,85	3,90	25,86	3,53	26,38	3,61	23,47	2,22	23,58	3,83
<b>PUFA n-3</b>	1,88	0,72	2,08	0,75	2,12	0,76	1,52	0,54	3,14	0,32	2,96	0,78

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD);n=12. Abreviaturas: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. \* = P <0.05, \*\* = P <0.01 y \*\*\* = P <0.001, vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

### 3.2.2 Ácidos grasos extraídos de la fracción de fosfolípidos

La tabla 10 muestra los AG que componen los FL que fueron extraídos de las TRL aisladas del suero de los sujetos obesos. La caracterización de los AG de las partículas permitió demostrar que al inicio de los ensayos, las TRL aisladas presentaban un contenido nuevamente similar, a excepción del contenido de ácido mirístico que fue significativamente superior antes de administrarse el desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.01$ ).

A las 2 horas de consumir los dos desayunos experimentales, se detectó un mayor contenido de los ácidos  $\alpha$ -linolénico y eicosenoico producido por el desayuno de tipo mediterráneo con respecto al desayuno occidental ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el contenido total de ninguna clase de AG entre desayunos.

Fue a las 4 horas del periodo postprandial cuando se detectó la influencia del contenido lipídico de las dietas experimentales sobre el contenido de los FL. El desayuno de tipo occidental el que provocó un mayor incremento en el contenido de ácido mirístico con respecto al nivel basal que el desayuno de tipo mediterráneo. Sin embargo, su contenido siguió siendo significativamente más elevado en las partículas derivadas del desayuno mediterráneo ( $P < 0.001$ ) debido a la diferencia detectada inicialmente. Por el contrario, el desayuno occidental fue responsable de que el contenido total de SFA en las TRL fuera significativamente superior frente a las otras partículas ( $P < 0.05$ ). Aunque el contenido de ácido esteárico fue reduciéndose durante el periodo postprandial tras la ingesta de los dos desayunos, su contenido fue superior en las TRL derivadas del desayuno de tipo occidental ( $P < 0.05$ ). Con respecto a la fracción de MUFA totales, como se ha visto previamente en los FL de los normopesos, volvió a manifestarse la influencia del desayuno de tipo mediterráneo, causando que ésta fuese significativamente superior en comparación con su contenido en las TRL aisladas después de consumir el de tipo occidental ( $P < 0.05$ ). El mayor incremento se observó en el contenido de los ácidos palmitoleico y oleico, en ambos casos significativo, aunque los niveles de ácido miristoleico fueron menores ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 10.** Composición en ácidos grasos de fosfolípidos de lipoproteínas ricas en triglicéridos antes (0h) y 2h y 4h después de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos obesos.

Ácido graso (%)	0 Horas				2 Horas				4 Horas			
	Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>14:0</b>	1,15	0,73	0,44 **	0,09	0,97	0,57	0,84	0,47	1,99	0,52	1,29 ***	0,14
<b>14:1 n-5</b>	0,81	0,76	0,38	0,25	0,51	0,36	0,41	0,36	0,35	0,08	0,44 *	0,10
<b>16:0</b>	24,43	3,86	25,09	4,54	24,67	2,16	24,99	3,68	20,54	2,03	21,82	1,36
<b>16:1 n-7</b>	3,08	1,91	2,31	1,75	2,56	1,49	2,46	2,11	1,97	0,18	1,74 *	0,24
<b>18:0</b>	19,19	2,34	18,79	2,90	18,16	3,38	18,21	1,80	15,05	1,65	16,89 *	1,38
<b>18:1 n-9</b>	15,65	3,38	16,21	4,25	17,20	6,32	14,49	2,74	26,11	1,84	23,94 *	2,13
<b>18:2 n-6</b>	16,75	2,41	18,68	4,24	16,75	3,59	19,99	4,39	18,19	1,32	18,34	1,17
<b>18:3 n-6</b>	0,53	0,26	0,57	0,46	0,36	0,16	0,19	0,28	1,08	0,10	1,16	0,12
<b>18:3 n-3</b>	1,61	1,51	1,19	1,20	1,90	1,38	0,73 *	0,91	0,35	0,10	0,41	0,10
<b>20:0</b>	0,69	0,66	0,65	0,64	0,81	0,78	0,39	0,39	0,26	0,08	0,21	0,11
<b>20:1 n-9</b>	1,17	0,73	0,98	0,91	1,45	1,08	0,43 *	0,30	1,21	0,24	1,20	0,19
<b>20:2 n-6</b>	3,10	1,12	2,82	1,41	2,77	1,11	3,04	0,82	2,13	0,63	1,78	0,60
<b>20:4 n-6</b>	8,93	2,37	8,46	2,77	7,91	2,09	9,30	1,91	7,52	0,68	7,74	1,21
<b>20:5 n-3</b>	1,11	0,93	0,80	0,89	1,32	0,99	0,60	0,48	1,51	0,39	1,29	0,19
<b>Resto</b>	4,04	1,46	4,19	2,25	4,81	1,60	4,60	1,17	1,75	0,30	1,74	0,35
<b>SFA</b>	44,64	3,88	44,95	5,28	44,02	3,22	44,25	3,78	37,85	2,08	39,84 *	1,49
<b>MUFA</b>	20,13	4,15	19,89	3,63	21,50	4,98	18,21	3,11	29,64	1,82	27,59 *	1,96
<b>PUFA n-6</b>	29,75	5,47	30,41	7,38	28,04	5,25	32,28	4,51	28,91	1,10	29,16	1,31
<b>PUFA n-3</b>	5,48	2,51	4,74	2,74	6,43	2,72	5,25	1,47	1,86	0,41	1,70	0,22

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar (SD); n=12. Abreviaturas: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. \* = P < 0.05, \*\* = P < 0.01 y \*\*\* = P < 0.001, vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado).

#### **4. INFLUENCIA DE LAS LIPOPROTEINAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS POSTPRANDIALES EN LA FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS Y CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO INTRACELULAR DE MACRÓFAGOS TRAS LA INCORPORACIÓN DE LAS PARTÍCULAS**

**M**onocitos THP-1 diferenciados a macrófagos mediante la adición de PMA, fueron incubados con las TRL aisladas del grupo de los normopesos y obesos, en ayunas (0h) y 2 horas y 4 horas después de la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y de tipo occidental. Posteriormente, se procedió con el estudio de la influencia de la composición de las TRL sobre la capacidad de los macrófagos para captarlas. Para ello, se evaluó la acumulación lipídica en los macrófagos mediante tinción con Aceite Rojo O y posteriormente se caracterizó la composición de AG incorporados por las células. Finalmente, se analizó los niveles de expresión de los genes que codifican los receptores celulares de superficie, responsables de la captación de las lipoproteínas.

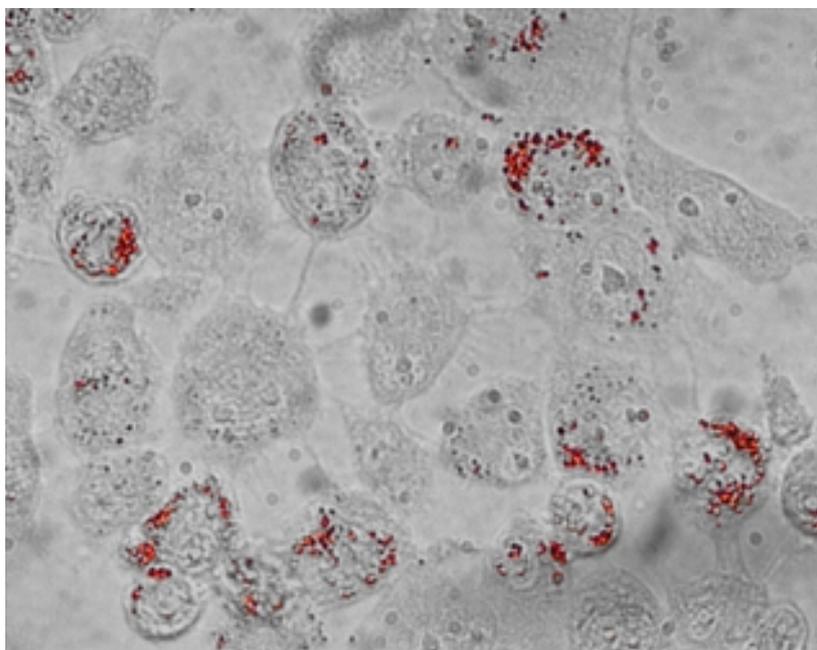
##### **4.1 Estudio de la acumulación lipídica en macrófagos mediante tinción con aceite rojo O**

La figura 37 muestra una fotografía tomada a uno de los cultivos control de macrófagos, que fueron incubados sin TRL. En ella se puede observar el contenido intracelular lipídico que de manera natural se encuentra presente en las células, sin un contenido “extra” causado por la presencia de lipoproteínas en el medio de cultivo. Esta imagen se empleó como control para estudiar la acumulación lipídica que tuvo lugar en los macrófagos cuando fueron sometidos a un periodo de incubación de 48 horas en presencia de las TRL aisladas de los participantes del estudio después de la ingesta de los dos tipos de desayunos experimentales. En las imágenes que continúan (figura 38 y 39) se observa el distinto grado de formación de las células espumosas en función del tipo de TRL que fue añadida a los cultivos celulares.

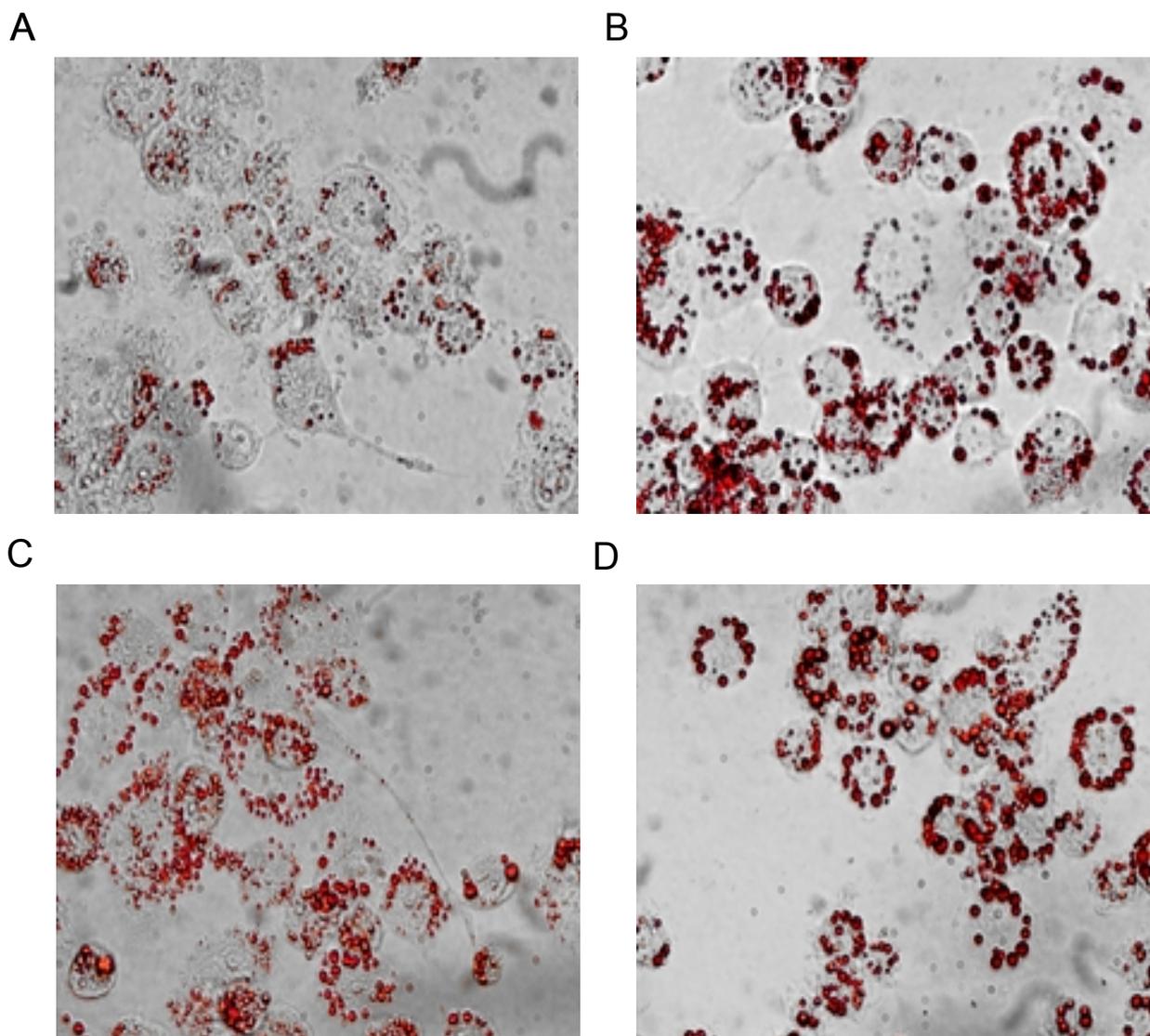
La tinción del contenido intracelular de lípidos de los macrófagos permitió observar un mayor contraste en la carga lipídica intracelular entre las células espumosas formadas tras la adición de las TRL aisladas a la hora 0 y las formadas con las TRL de la hora 4 del periodo postprandial.

La adición de TRL aisladas de los individuos obesos a los cultivos de monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos (figura 38), aisladas antes de que consumieran los dos tipos de desayunos experimentales (0h) provocó la formación de depósitos lipídicos intracelulares, aunque ésta fue ligeramente superior con las TRL aisladas en ayunas del ensayo de tipo occidental (figura 38.C) que con las aisladas antes de consumir el desayuno de tipo mediterráneo (figura 38.A). No obstante, esto indica que el contenido lipídico transportado por las TRL procedentes del grupo de obesos en ayunas, es incorporado al interior de los macrófagos, y que la carga de lípidos es suficientemente elevada para que tenga lugar la formación de células espumosas. La incubación de las células con las TRL aisladas a la hora 0 de los individuos normopesos (figuras 39.A y 39.C) dio lugar a un resultado similar al descrito. Cuando fueron las TRL aisladas 4 horas después de ingerir las dietas experimentales las que se añadieron a los cultivos de células, se visualizó que la acumulación de lípidos en las células espumosas fue algo mayor frente a la causada por las TRL aisladas en ayunas. Las gotículas de lípidos intracelulares formadas con las TRL de la hora 4 presentaban un tamaño mayor en comparación con el tamaño observado cuando los macrófagos incorporaron la carga lipídica de las TRL aisladas en ayunas.

Esta observación pudo aplicarse tanto para las TRL-4h procedentes del grupo obeso después de ingerir el desayuno de tipo mediterráneo (figura 38.B) y de tipo occidental (figura 38.D), como para las aisladas del grupo normopeso después de que consumieran el desayuno de tipo mediterráneo (figura 39.B) y de tipo occidental (figura 39.D). No se apreciaron diferencias en la acumulación de lípidos causada por el consumo de las dietas experimentales con las TRL-4h aisladas del grupo. Por el contrario, las que fueron aisladas de los sujetos normopesos 4 horas después de que consumieran el desayuno de tipo occidental (figura 39.D), causaron un mayor contenido intracelular de lípidos al que se observó con las TRL aisladas tras ingerir el desayuno de tipo mediterráneo (figura 39.B). En este caso sí se apreció una evidente diferencia en el tamaño de las gotículas de lípidos del interior de las células espumosas, pues con las derivadas del desayuno de tipo occidental éstas fueron más exuberantes.

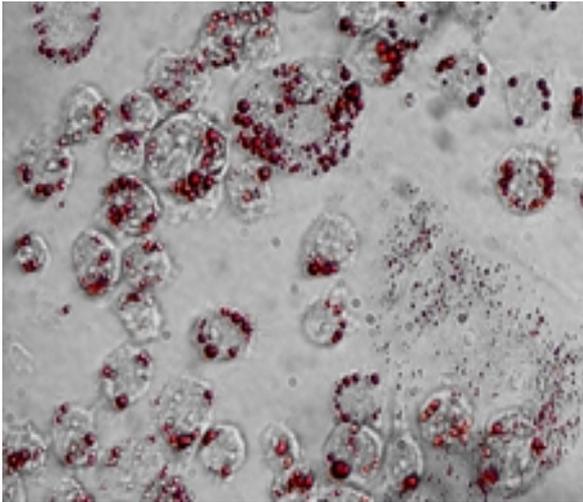


**Figura 37.** Cultivo control de monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos incubados 48 horas en ausencia de TRL (-TRL). Lípidos intracelulares teñidos con el colorante Aceite Rojo O, e imágenes capturadas (x40) con la cámara Moticam 2500 5.0M Pixel Live Resolution y editadas con el programa Adobe Photoshop CC 2017.

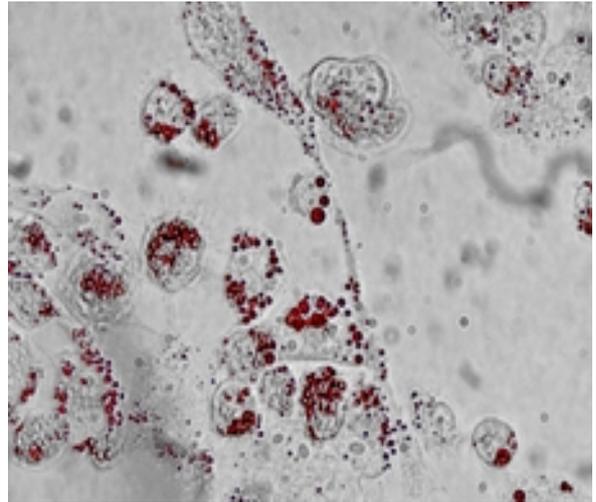


**Figura 38.** Monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos e incubados 48 horas con las TRL aisladas de los sujetos obesos a las 0 horas (A) y 4 horas (B) del consumo del desayuno de tipo mediterráneo; y a las 0 horas (C) y 4 horas (D) del consumo del desayuno de tipo occidental. Lípidos intracelulares teñidos con el colorante Aceite Rojo O, e imágenes capturadas (x40) con la cámara Moticam 2500 5.0M Pixel Live Resolution y editadas con el programa Adobe Photoshop CC 2017.

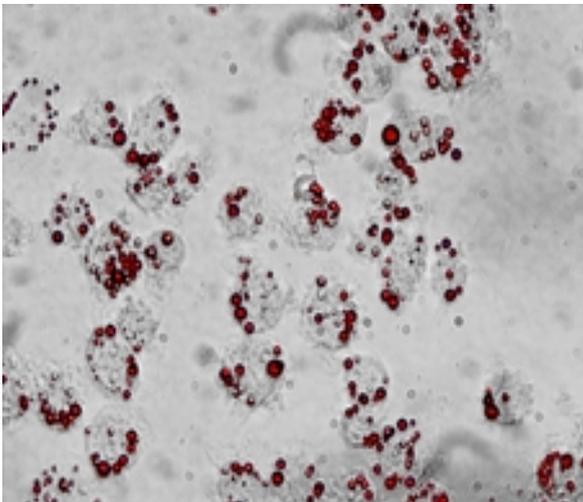
A



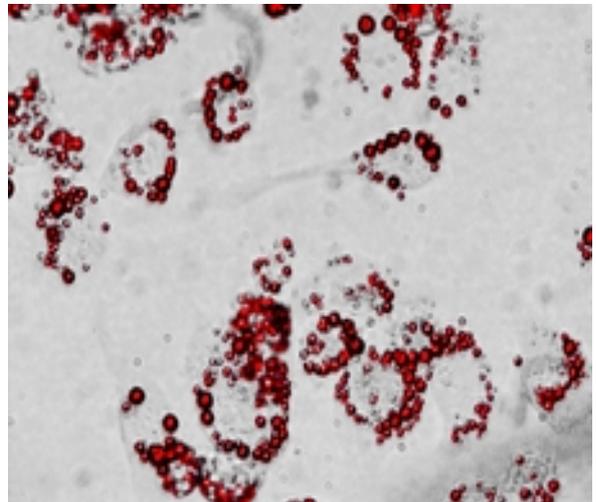
B



C



D



**Figura 39.** Monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos e incubados 48 horas con las TRL aisladas de los sujetos normopeso a las 0 horas (A) y 4 horas (B) del consumo del desayuno de tipo mediterráneo; y a las 0 horas (C) y 4 horas (D) del consumo del desayuno de tipo occidental. Lípidos intracelulares teñidos con el colorante Aceite Rojo O, e imágenes capturadas (x40) con la cámara Moticam 2500 5.0M Pixel Live Resolution y editadas con el programa Adobe Photoshop CC 2017.

## **4.2 Caracterización de los ácidos grasos componentes de los triglicéridos incorporados en el interior de los macrófagos tras su incubación con las lipoproteínas ricas en triglicéridos procedentes de los sujetos normopesos**

Al caracterizar el perfil de AG intracelulares obtenido después de que los cultivos de monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos fuesen incubados con las TRL, se observaron diferencias importantes respecto al contenido intracelular del cultivo control (-TRL) (tabla 11).

Las TRL aisladas antes (0h) y 2h después de que el grupo normopeso consumiese los dos desayunos, el de tipo mediterráneo y occidental, no provocaron cambios significativos en el contenido total de SFA, MUFA ni PUFA intracelulares con respecto a los cultivos control (-TRL). Tampoco se detectaron diferencias significativas entre el perfil intracelular de AG obtenido después del periodo de incubación de 48 horas con los dos tipos de TRL, a pesar de la distinta composición lipídica de las partículas. Sin embargo, aunque no se detectase alteración en las fracciones totales, el contenido de ciertos AG fue significativamente diferente con respecto al del cultivo control. En el caso de las TRL-0h aisladas antes del consumo del desayuno mediterráneo, se observó que éstas causaron que el contenido de ácido araquidónico fuera significativamente mayor ( $P<0.05$ ), y las que procedían del ensayo de tipo occidental provocaron una significativa reducción del contenido de ácido miristoleico ( $P<0.05$ ). Además, ambas partículas causaron un incremento similar en el contenido intracelular del resto de AG con respecto al cultivo control ( $P<0.05$ ). En cuanto a las TRL aisladas a las 2 horas del periodo postprandial, los macrófagos que se incubaron con las derivadas del desayuno de tipo occidental, presentaron un mayor contenido intracelular de los ácidos mirístico y palmitoleico ( $P<0.05$ ). El contenido del resto de AG se vio incrementado con los dos tipos de partículas de forma significativa, aunque en mayor medida con las procedentes del desayuno de tipo occidental ( $P<0.001$ ).

Fueron las TRL aisladas a las 4 horas las que modificaron de manera más destacable el contenido intracelular de AG en los macrófagos. Las partículas derivadas del desayuno de tipo mediterráneo fueron responsables de una reducción de los SFA totales muy significativa con respecto al contenido del control ( $P<0.001$ ), causada por una disminución de los ácidos palmítico ( $P<0.01$ ), esteárico ( $P<0.001$ ) y araquídico ( $P<0.01$ ). En contra, las aisladas tras el desayuno de tipo occidental provocaron un incremento en el contenido de ácido mirístico ( $P<0.01$ ) y una reducción en el de ácido araquídico ( $P<0.05$ ). Aunque en la composición de los MUFA totales no

hubo una diferencia significativa, sí la hubo en el contenido de ácido oleico ( $P < 0.05$ ), el cual fue más elevado tras el tratamiento con las TRL procedentes del desayuno de tipo mediterráneo; y en el de los ácidos palmitoleico y eicosenoico, cuyo contenido se redujo significativamente con ambos tipos de TRL frente al control. El consumo de los dos desayunos condujo a que las TRL elevasen de manera importante el contenido intracelular de PUFA n-6 en los macrófagos, siendo muy significativo en el caso del desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.001$ ), debido al incremento del contenido de ácido linoleico ( $P < 0.001$ ).

Cuando se comparó el efecto sobre la composición intracelular de AG en los macrófagos provocado entre las TRL procedentes de los dos tipos de desayunos, no hubo sin embargo grandes contrastes. Tan solo se observó que el mayor contenido de AG minoritarios como el  $\alpha$ - y  $\gamma$ -linolénico y eicosenoico, y el menor de ácido araquidónico, causado por las TRL aisladas 4 horas después del consumo del desayuno de tipo occidental fue significativo ( $P < 0.05$ ) en comparación con los niveles detectados con las TRL del ensayo del desayuno de tipo mediterráneo.

**Tabla 11.** Composición en ácidos grasos de triglicéridos intracelulares en macrófagos tras su incubación con lipoproteínas ricas en triglicéridos antes (0h) y 2h y 4h después de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos normopesos.

Ácido graso (%)	Control		0 Horas				2 Horas				4 Horas			
			Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>14:0</b>	1,55	0,47	1,78	1,00	1,67	0,56	2,08	1,21	2,14	0,75	1,93	0,34	2,21	0,49
									#				##	
<b>14:1 n-5</b>	1,06	0,91	0,48	0,56	0,38	0,39	0,86	0,74	0,65	0,47	0,62	0,17	0,65	0,20
<b>16:0</b>	26,95	6,88	24,30	1,73	25,19	4,04	25,01	3,36	24,85	4,25	18,86	3,66	21,20	2,28
											###			
<b>16:1 n-7</b>	5,14	2,94	5,20	1,18	5,71	1,95	6,64	2,62	7,92	2,42	2,09	0,40	2,08	0,44
									#		###		###	
<b>18:0</b>	21,27	4,53	20,50	4,37	19,63	5,92	20,46	3,98	19,60	6,51	13,76	2,26	14,25	1,47
											#####			
<b>18:1 n-9</b>	26,41	6,66	28,59	5,37	27,21	7,15	27,77	5,50	23,77	4,68	31,89	2,69	31,15	2,87
											#			
<b>18:2 n-6</b>	5,48	3,40	7,16	3,26	8,56	6,20	7,44	2,10	6,98	5,65	20,84	2,73	17,90	1,13
											###			
<b>18:3 n-6</b>	2,20	1,53	1,61	0,54	2,11	1,08	1,68	1,37	1,60	0,62	2,23	0,46	2,67	0,20
														*
<b>18:3 n-3</b>	1,68	1,18	1,32	0,44	1,28	0,79	1,95	1,33	1,21	0,67	1,34	0,34	1,65	0,26
														*
<b>20:0</b>	1,30	0,84	0,87	0,51	0,71	0,29	1,69	1,49	2,67	2,41	0,48	0,10	0,57	0,14
											###			#
<b>20:1 n-9</b>	1,74	1,91	1,08	0,97	1,67	1,29	1,11	0,62	2,08	0,00	0,32	0,08	0,45	0,12
											#			*#
<b>20:2 n-6</b>	0,92	1,11	0,35	0,16	0,40	0,16	0,70	0,60	0,88	1,30	0,22	0,06	0,28	0,09
<b>20:4 n-6</b>	1,43	0,70	2,31	1,09	1,81	0,88	1,46	0,84	1,32	0,75	2,00	0,40	1,55	0,32
			#											*
<b>20:5 n-3</b>	2,05	1,48	1,52	1,06	1,41	1,06	0,00	0,49	2,99	0,00	2,68	0,53	2,56	0,36
<b>Resto</b>	1,37	1,37	2,67	0,49	2,56	0,85	2,63	0,69	3,67	0,00	0,77	0,18	0,77	0,17
			#		#		#		###					
<b>SFA</b>	50,91	9,58	47,54	5,63	47,09	9,02	48,87	5,87	45,40	7,84	35,03	4,02	38,30	2,61
											###			
<b>MUFA</b>	34,09	6,46	35,00	5,32	34,53	6,13	36,07	4,93	35,30	4,36	34,92	2,54	34,32	2,86
<b>PUFA n-6</b>	9,79	3,50	11,19	2,91	13,55	6,43	11,40	2,15	12,23	5,74	25,26	3,01	22,40	1,07
											###			##
<b>PUFA n-3</b>	3,69	2,40	3,21	1,40	3,51	1,93	4,20	2,49	4,50	2,45	4,02	0,59	4,21	0,43

Valores expresados como media  $\pm$  desviación estándar. (SD); n=12. Abreviaturas: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. \* = P < 0,05, \*\* = P < 0,01, \*\*\* = P < 0,001 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test t de Student pareado); # = P < 0,05, ## = P < 0,01, ### = P < 0,001 vs control (ANOVA con Bonferroni).

### **4.3 Caracterización de los ácidos grasos componentes de los triglicéridos incorporados en el interior de los macrófagos tras su incubación con las lipoproteínas ricas en triglicéridos procedentes de los sujetos obesos**

La incubación de los macrófagos con las TRL aisladas de los sujetos obesos, generó mayores diferencias en la composición intracelular de AG frente a la del control (-TRL) a las observadas con las partículas procedentes de los individuos normopesos (tabla 12).

Las TRL de las 0 horas aisladas del grupo de los obesos, procedentes de los dos tipos de ensayos, el de tipo mediterráneo y el de tipo occidental, redujeron el contenido intracelular de SFA totales y elevaron el contenido de PUFA n-6 de forma significativa en ambos casos con respecto al contenido del control ( $P<0.05$ ). Los dos tipos de TRL redujeron el contenido de 18:0 y provocaron un incremento en el contenido de ácido linoleico y del resto de AG de manera significativa ( $P<0.05$  las de origen mediterráneo y  $P<0.01$  las de origen occidental). Por el contrario, solo se observó un mayor contenido de ácido  $\alpha$ -linolénico cuando los macrófagos fueron incubados con las TRL de origen mediterráneo, siendo además estadísticamente muy significativa esa diferencia con respecto al bajo contenido en ese mismo AG obtenido con las TRL del desayuno occidental ( $P<0.001$ ). El ácido miristoleico se encontró en una cantidad significativamente menor frente al control con las TRL de origen occidental.

Al igual que ocurrió con las TRL procedentes de la hora 2 del periodo postprandial del grupo de normopesos, las partículas que fueron aisladas de los sujetos obesos tras ingerir los dos desayunos tampoco causaron diferencias llamativas en el contenido intracelular de SFA, MUFA y PUFA totales con respecto al del cultivo control de macrófagos. No obstante, se observó que las TRL derivadas del desayuno mediterráneo causaron una disminución en el contenido de ácido  $\gamma$ -linolénico ( $P<0.05$ ), y un aumento en el de  $\alpha$ -linolénico y araquidónico frente al control ( $P<0.05$ ). El elevado contenido de  $\alpha$ -linolénico contrastó con el obtenido con las TRL derivadas del desayuno de tipo occidental, que fue significativamente menor. Las TRL de origen occidental causaron la elevación del resto de AG de manera significativa al comparar con las células control ( $P<0.05$ ) y, una reducción de ácido eicosapentaenoico que solo fue significativa con respecto al obtenido con las TRL del ensayo mediterráneo. El contenido de PUFA n-6 totales obtenido con las TRL occidentales fue significativamente más elevado con respecto al obtenido con las TRL del ensayo de tipo mediterráneo.

Las TRL aisladas a las 4 horas de consumir el desayuno mediterráneo y el occidental, causaron una marcada diferencia en el contenido intracelular de SFA total con respecto al control ( $P<0.001$ ). Ambas fueron responsables del menor contenido de los ácidos esteárico ( $P<0.001$ ) y araquídico ( $P<0.05$ ), mientras que sólo se observó que fue significativo el menor contenido intracelular de ácido palmítico ( $P<0.05$ ) causado por las de origen mediterráneo. La menor presencia intracelular de ácido mirístico fue muy significativa al comparar con su contenido en las células incubadas con las TRL de origen occidental, ya que éstas últimas causaron que el contenido fuese muy superior ( $P<0.001$ ). La consecuencia fue que los niveles de SFA intracelulares fueran significativamente superiores con las TRL occidental respecto a las TRL mediterráneas ( $P<0.05$ ). El contenido de MUFA totales no se vio afectado por la incubación de las TRL con respecto al del control, aunque existió una significativa reducción en el contenido de ácido palmitoleico ( $P<0.01$ ) causado por los dos tipos de partículas, y en el contenido de ácido eicosenoico ( $P<0.05$ ) solo tras la incubación de las células con las TRL derivadas del desayuno occidental. Además, el contenido de ácido oleico obtenido con éstas últimas partículas fue significativamente menor en comparación con el que se observó con las TRL de origen mediterráneo ( $P<0.01$ ), haciendo así que existiera una significativa diferencia en el contenido total de MUFA ( $P<0.05$ ) entre los dos tipos de TRL. El contenido de PUFA n-6 fue significativamente mayor ( $P<0.001$ ) cuando los macrófagos se incubaron con los dos tipos de TRL respecto al control, pues ambas partículas causaron una elevación muy destacada del contenido de ácido linoleico ( $P<0.001$ ). También se vieron afectados los niveles de ácido eicosadienoico, que fueron menores con las TRL mediterráneas ( $P<0.05$ ) frente a las células control, y el de ácido araquidónico, cuyo contenido fue significativamente superior con las TRL occidentales al compararse con el contenido obtenido tras la incubación con las TRL derivadas del desayuno de tipo mediterráneo ( $P<0.01$ ).

**Tabla 12.** Composición en ácidos grasos de triglicéridos intracelulares en macrófagos tras su incubación con lipoproteínas ricas en triglicéridos antes (0h) y 2h y 4h después de la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo y occidental por sujetos obesos.

Ácido graso (%)	Control		0 Horas				2 Horas				4 Horas			
			Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental		Mediterráneo		Occidental	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>14:0</b>	1,55	0,47	1,97	1,37	1,62	0,83	2,17	1,36	1,80	0,86	1,44	0,12	1,83	0,24
													***	
<b>14:1 n-5</b>	1,06	0,91	0,48	0,49	0,35	0,13	0,69	0,55	0,93	1,15	0,48	0,13	0,63	0,13
					#								*	
<b>16:0</b>	26,95	6,88	23,20	4,22	23,63	3,18	23,31	3,65	22,75	5,48	20,93	1,69	22,58	2,78
											#			
<b>16:1 n-7</b>	5,14	2,94	6,86	3,09	4,59	2,28	6,63	2,21	5,58	2,50	2,31	0,48	2,37	0,64
											###		###	
<b>18:0</b>	21,27	4,53	14,98	6,15	16,12	2,89	19,01	6,04	21,54	4,78	14,34	1,36	15,39	2,30
			#		###						####		###	
<b>18:1 n-9</b>	26,41	6,66	28,91	7,51	30,56	4,27	30,10	9,36	24,93	4,70	29,62	1,61	27,25	1,97
													**	
<b>18:2 n-6</b>	5,48	3,40	12,11	6,80	10,69	3,02	6,57	3,22	7,76	4,89	20,87	1,44	20,55	1,60
			#		###						####		###	
<b>18:3 n-6</b>	2,20	1,53	1,73	2,31	2,21	1,32	0,98	0,78	1,96	1,48	2,37	0,37	2,38	0,39
							#							
<b>18:3 n-3</b>	1,68	1,18	3,07	1,54	1,04	0,27	4,15	2,85	1,95	1,34	1,46	0,18	1,32	0,38
			#		***		#		*					
<b>20:0</b>	1,30	0,84	1,55	1,39	0,86	0,37	2,21	2,20	1,70	2,32	0,58	0,12	0,54	0,16
											#		#	
<b>20:1 n-9</b>	1,74	1,91	1,53	1,88	2,14	2,15	1,15	0,46	1,60	0,79	0,37	0,10	0,40	0,15
											#		#	
<b>20:2 n-6</b>	0,92	1,11	0,46	0,16	0,76	0,53	0,58	0,54	0,52	0,32	0,17	0,05	0,23	0,09
											#			
<b>20:4 n-6</b>	1,43	0,70	2,23	1,60	1,35	0,48	2,41	1,19	2,88	2,29	1,61	0,21	1,25	0,33
							#						**	
<b>20:5 n-3</b>	2,05	1,48	1,90	1,68	1,27	0,73	2,58	1,30	1,40	0,80	2,75	0,28	2,49	0,63
									*					
<b>Resto</b>	1,37	1,37	3,47	2,30	2,83	0,46	2,41	1,49	3,25	2,25	0,69	0,17	0,78	0,17
			#		###				#					
<b>SFA</b>	50,91	9,58	40,78	7,56	42,71	4,91	43,39	7,68	47,77	7,38	37,30	2,18	40,34	2,63
			#		#						####		***	
<b>MUFA</b>	34,09	6,46	37,51	4,96	36,82	4,47	37,74	8,39	32,45	4,82	32,79	1,68	30,65	1,86
													*	
<b>PUFA n-6</b>	9,79	3,50	15,87	8,42	14,80	4,14	9,30	2,51	12,67	3,75	25,01	1,43	24,41	1,41
			#		#				*		####		###	
<b>PUFA n-3</b>	3,69	2,40	4,34	3,28	3,87	1,72	7,25	3,61	4,45	2,90	4,21	0,34	3,81	0,76

Valores expresados como media±desviación estándar (SD); n=12. Abreviaturas: SFA, ácidos grasos saturados; MUFA, ácidos grasos monoinsaturados; PUFA, ácidos grasos poliinsaturados. \* = P < 0,05, \*\* = P < 0,01, \*\*\* = P < 0,001 vs desayuno de tipo mediterráneo (Test-t de Student pareado); # = P < 0,05, ## = P < 0,01, ### = P < 0,001 vs control (ANOVA con Bonferroni).

## **5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES CELULARES DE SUPERFICIE IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE CAPTACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS POR MACRÓFAGOS**

La incubación de las células THP-1 diferenciadas a macrófagos en presencia de las TRL aisladas de los sujetos obesos y normopesos ejerció una evidente modulación sobre los niveles de expresión de los receptores de superficie. Debido a la distinta carga lipídica de las dos dietas experimentales ingeridas por los participantes del estudio, la composición de las TRL aisladas tras su consumo tuvo un efecto modulador sobre la capacidad de los macrófagos para incorporar a las lipoproteínas. Ante este escenario, se propuso realizar un estudio de la capacidad del componente lipídico de las partículas para modular los niveles de expresión de los receptores celulares de superficie.

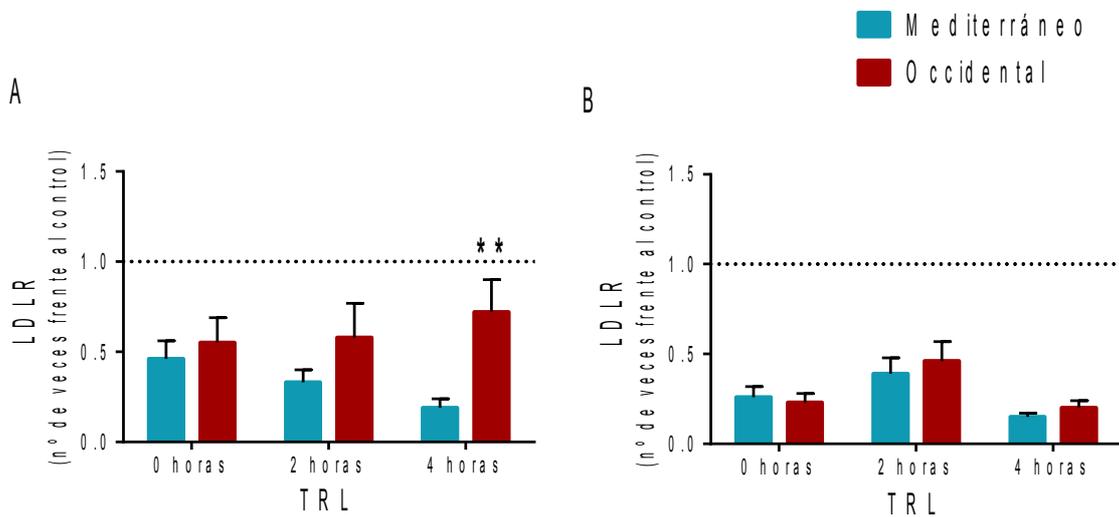
### **5.1 Modulación de los niveles de expresión de los receptores celulares dependientes de apo E: LDLR, VLDLR y LRP-1**

#### **5.1.1 Receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDLR):**

En la figura 40 se aprecia que los niveles de expresión detectados del receptor LDLR en los macrófagos incubados con TRL aisladas de los participantes obesos (figura 40.A) y de los normopesos (figura 40.B), fueron menores respecto a las células control en todos los casos. En los experimentos celulares realizados con las TRL procedentes de los sujetos obesos (figura 40.A), las partículas aisladas a las 0 horas de los dos ensayos, el realizado con el desayuno de tipo mediterráneo y con el de tipo occidental, redujeron su expresión a niveles similares. Sin embargo, cuando las células fueron tratadas con las TRL aisladas a las horas 2 y 4 del periodo postprandial, se apreciaron divergencias pues, con las derivadas del desayuno de tipo mediterráneo, la expresión fue reduciéndose cada vez más a medida que las TRL fueron aisladas en un momento más tardío del periodo postprandial. En cambio, con las partículas derivadas del desayuno de tipo occidental ocurrió lo contrario. Así, aunque la presencia de las TRL aisladas en la hora 4 después de la ingesta de los dos desayunos causara una reducción con respecto al nivel

de expresión del control, la expresión de LDLR fue significativamente mayor al incubarse con las TRL derivadas del desayuno de tipo occidental que con las del de tipo mediterráneo ( $P < 0.01$ ).

La modulación experimentada en el nivel de expresión de LDLR provocada por las TRL aisladas de los sujetos normopesos (figura 40.B) fue la misma tanto si éstas derivaban del desayuno de tipo mediterráneo como del de tipo occidental. En ambos casos, las aisladas a las 0 horas indujeron una reducción en los niveles de expresión respecto a la detectada en las células control, que fue incluso mayor que la provocada por las TRL procedentes de los individuos obesos a esa misma hora. Con las TRL aisladas a la hora 2, LDLR se expresó algo más, pero con las aisladas 4 horas después del consumo de los dos desayunos, el efecto sobre el nivel de expresión de LDLR fue el mismo al observado con las TRL de las 0 horas.



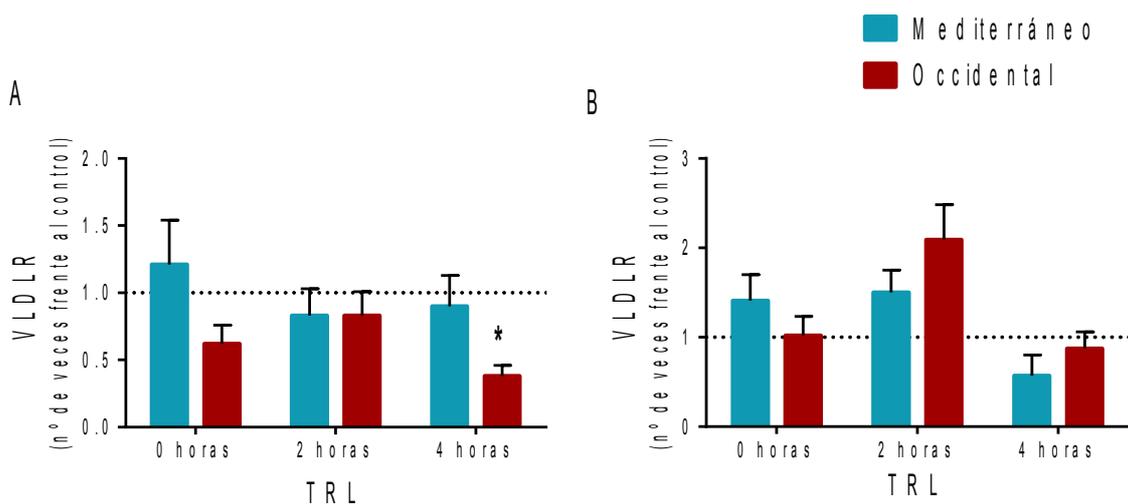
**Figura 40.** Expresión relativa del ARNm del receptor LDLR en macrófagos THP-1 incubados en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas a las 0, 2 y 4 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y occidental, por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ ;  $**=P < 0.01$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test-t student pareado).

### 5.1.2 Receptor de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR)

A diferencia del receptor LDLR, la expresión del receptor VLDLR no se vio tan alterada a causa de la presencia de las TRL aisladas de los obesos tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo en los cultivos celulares (figura 41.A). A pesar de que su nivel de expresión fue

ligeramente superior al detectado en las células control con las TRL aisladas a las 0 horas, con las aisladas a las 2 y a las 4 horas del periodo postprandial, éste se redujo un poco, pero en ninguno de los casos de manera acusada. En cambio, las TRL procedentes del desayuno de tipo occidental aisladas a las 0 y 4 horas causaron una mayor modulación en la expresión de VLDL que las derivadas del desayuno de tipo mediterráneo. Mientras que con las aisladas a las 2 horas la expresión fue la misma que con las TRL aisladas a esa misma hora después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo, con las aisladas a las 0 y 4 horas fue menor, aunque esa diferencia era estadísticamente significativa únicamente entre las partículas de las 4 horas del periodo postprandial ( $P < 0.05$ ).

La incubación de los macrófagos con las TRL de los sujetos normopesos (figura 41.B) demostró tener un efecto distinto al observado con las de los obesos. Las TRL aisladas a las 0 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo elevaron ligeramente el nivel de expresión de VLDLR respecto al control, mientras que con las del desayuno occidental no hubo cambios. Sin embargo, la expresión del receptor se vio incrementada debido a la incubación de la células con las TRL aisladas a la hora 2, especialmente con las derivadas del desayuno occidental, con las que se alcanzó el doble de expresión de VLDLR que el detectado en las células control. En relación con la incubación de las partículas procedentes de la hora 4 del periodo postprandial, aquéllas que derivaban del desayuno de tipo mediterráneo causaron una expresión algo menor respecto al nivel detectado en las células control, mientras que con las del desayuno de tipo occidental ésta no se alteró. En ningún caso la diferencia entre desayunos fue significativa.



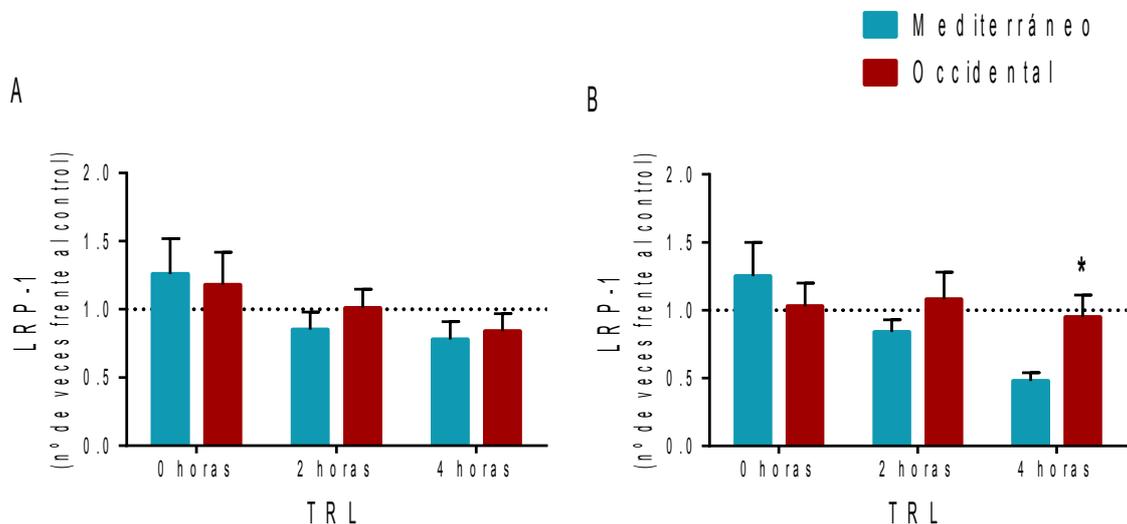
**Figura 41.** Expresión relativa del ARNm del receptor VLDLR en macrófagos THP-1 incubados en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas a las 0, 2 y 4 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y occidental, por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; \* $P < 0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test-t student pareado).

### 5.1.3 Proteína-1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP-1)

La capacidad de las TRL para modular los niveles de expresión del receptor LRP-1 no fue tan marcada como se detectó con los dos anteriores, LDLR y VLDLR. La expresión de LRP-1 se vio ligeramente incrementada por encima del nivel del control causada por la incubación de las células con las TRL aisladas de los sujetos obesos, tras el consumo de los dos desayunos (figura 42.A). En cambio, con las partículas procedentes de la hora 2, la expresión de LRP-1 solo se vio reducida con las que derivaban del desayuno de tipo mediterráneo, aunque el nivel de expresión seguía cercano al del control. Esa ligera reducción se mantuvo con las TRL aisladas a las 4 horas tras la ingesta de ese mismo tipo de desayuno, el mediterráneo, y también fue detectada con las del de tipo occidental, sin que se aprecie diferencia entre ellas.

En los experimentos realizados con las TRL procedentes de los sujetos normopesos (figura 42.B) aisladas a las 0 h y 2 y 4 horas después de consumir el desayuno de tipo occidental, LRP-1 mantuvo su nivel de expresión igual al de las células control. Por el contrario, con aquellas aisladas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo, se observó que las procedentes de la hora 0 causaron que la expresión de LRP-1 se elevase un poco, las de la hora 2

provocaron una pequeña reducción frente al nivel control, y las de la hora 4 fueron responsables de que se redujese a la mitad frente al nivel de expresión del control, siendo significativa la diferencia con respecto a los niveles obtenidos con las TR-4h derivadas del desayuno de tipo occidental ( $P < 0.05$ ).



**Figura 43.** Expresión relativa del ARNm del receptor LRP-1 en macrófagos THP-1 incubados en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas a las 0, 2 y 4 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y occidental, por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ ;  $*=P < 0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test-t student pareado).

## **5.2 Modulación de los niveles de expresión de los receptores celulares independientes de apo E (receptores Scavenger): SRA2, SRB1 y CD36.**

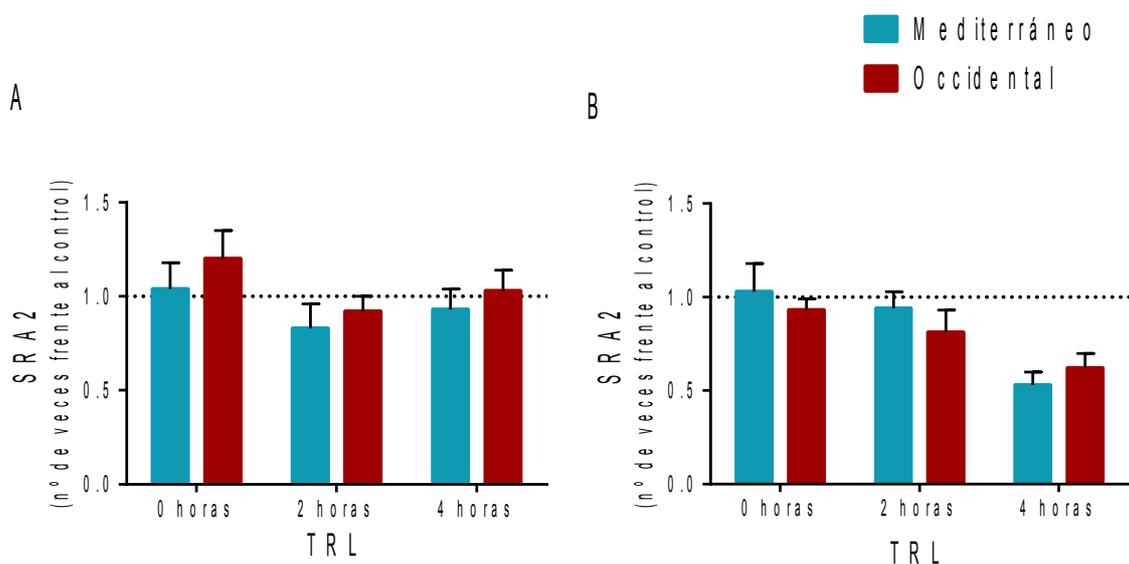
### **5.2.1 Receptor Scavenger A2 (SRA2)**

La expresión del receptor SRA2 demostró estar menos modulada por la presencia de las TRL en los cultivos de macrófagos que la de los otros receptores scavenger. Los niveles detectados de SRA2 tras la incubación de las células con las partículas que fueron aisladas de los sujetos obesos (figura 43.A) a la hora 0 antes de la administración del desayuno de tipo mediterráneo, fueron los mismos que los del control, mientras que con las partículas aisladas a la hora 0 del ensayo realizado con el desayuno de tipo occidental se observó cierto incremento. Sin

embargo, la presencia de las TRL de la hora 2 del periodo postprandial procedentes de los dos ensayos, el de tipo mediterráneo y el de tipo occidental, causó una reducción en la expresión del receptor con los dos tipos de partículas. Respecto a las TRL postprandiales de la hora 4, las derivadas del desayuno de tipo occidental no alteraron la expresión del receptor en los macrófagos, mientras que las del de tipo mediterráneo la redujeron ligeramente.

Por parte de las TRL aisladas de los sujetos normopesos (figura 43.B), las TRL aisladas en la hora 0 tampoco mostraron provocar una modulación en la expresión de SRA2, pues en los dos casos fue nuevamente similar a la de las células control. Las procedentes de la hora 2, por el contrario, fueron capaces de reducirla, y las de la hora 4 fueron causantes de una reducción aún mayor en la expresión del receptor frente al valor del control.

La procedencia de un desayuno u otro no mostró diferencias significativas sobre los niveles de expresión del receptor SRA2 en ningún caso, ni las aisladas de los sujetos obesos ni en la de los normopesos.

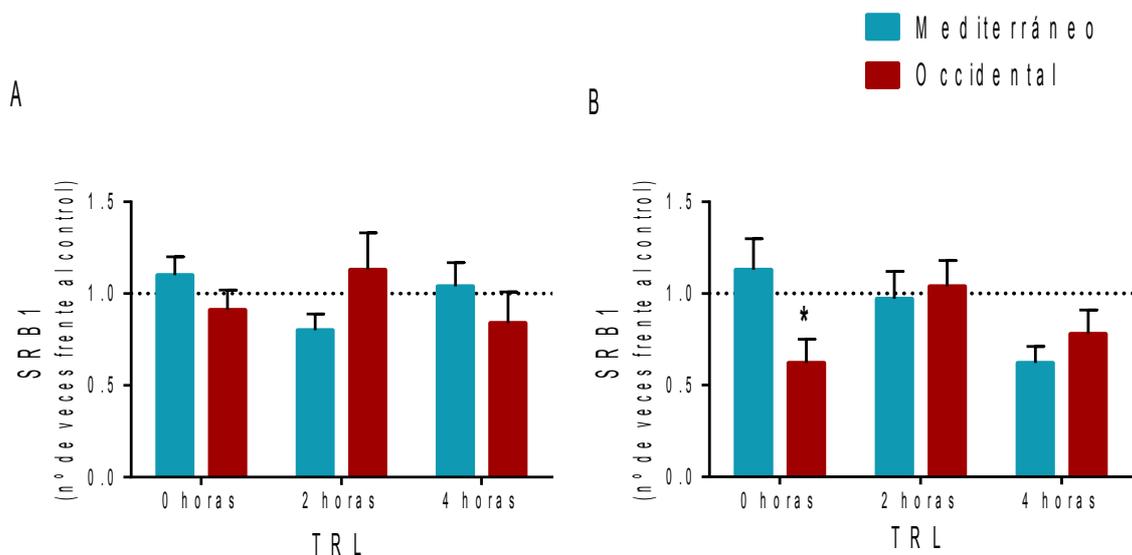


**Figura 43.** Expresión relativa del ARNm del receptor SRA2 en macrófagos THP-1 incubados en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas a las 0, 2 y 4 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y occidental, por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=12; (Test-t student pareado).

### 5.2.2 Receptor Scavenger B1 (SRB1)

Las TRL aisladas de los individuos obesos demostraron ser capaces de modular la transcripción del gen que codifica al receptor SRB1 (figura 44.A), aunque según procedieran del consumo de un desayuno experimental u otro, la modulación que se observó fue opuesta. Así pues, las TRL derivadas del desayuno occidental fueron capaces de reducir los niveles de expresión del receptor cuando se trataban de las de la hora 0 o las aisladas 4 horas después de consumir ese desayuno, mientras que las de la hora 2 la incrementaban. Por el contrario, las procedentes del ensayo realizado con el desayuno de tipo mediterráneo de la hora 0 causaban un incremento en la expresión de SRB1, con las de la hora 2 se reducía, y con las de la hora 4 no se detectó alteración frente al nivel de expresión de las células control. Estas diferencias según la procedencia de un desayuno u otro no fue en ningún caso significativas.

Por parte de las TRL aisladas de los sujetos normopesos (figura 44.B), aquéllas procedentes de la hora 0 mostraron el mismo comportamiento que las de la hora 0 del grupo de obesos. Sin embargo, en este caso la diferencia en los niveles de expresión de SRB1 observado sí fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), dado que la inhibición causada por las partículas procedentes del ensayo de tipo occidental fue mayor que el detectado con las de los obesos. La incubación de los macrófagos con las TRL aisladas a la hora 2 después de consumir los dos desayuno experimentales no alteró la expresión del receptor SRB1, pero al ser incubados con las partículas aisladas a las 4 horas de la ingesta, sí causó un efecto reductor, siendo algo mayor con las derivadas del desayuno de tipo mediterráneo, aunque sin ser significativa tal diferencia.



**Figura 44.** Expresión relativa del ARNm del receptor SRB1 en macrófagos THP-1 incubados en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas a las 0, 2 y 4 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y occidental, por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ ;  $*=P<0.05$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test-t student pareado).

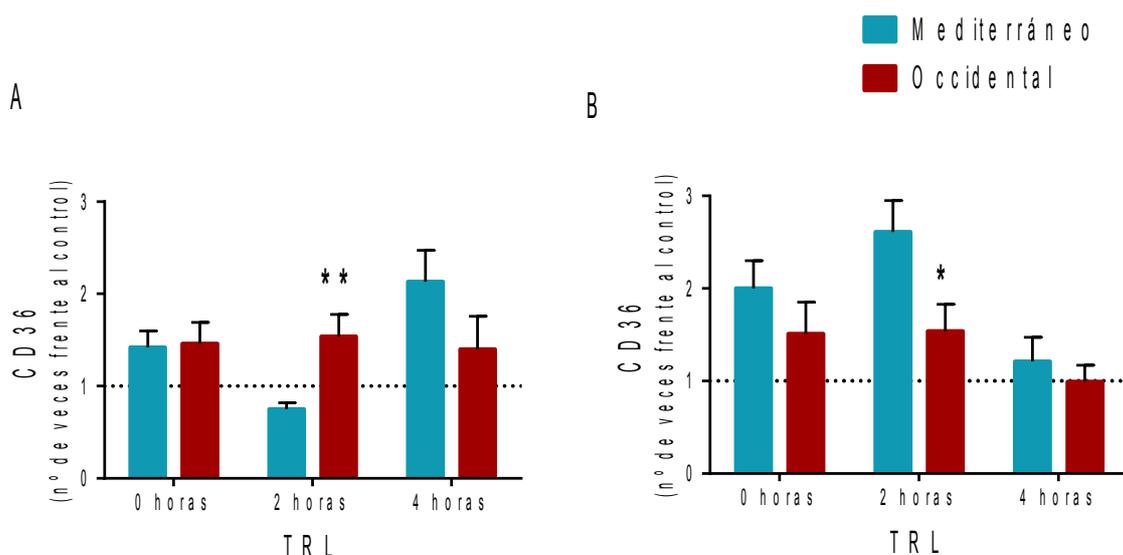
### 5.2.3 Receptor CD-36

Finalmente, el estudio realizado sobre la expresión del receptor CD36 permitió identificar diferencias más significativas en la capacidad de modulación del componente lipídico de las TRL según si las partículas fueron aisladas después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo o el de tipo occidental.

Las TRL procedentes de los sujetos obesos (figura 45.A) aisladas a la hora 0 y 2 y 4 horas después de que consumieran el desayuno de tipo occidental, elevaron en todos los casos el nivel de expresión del receptor CD36 frente al nivel detectado en los cultivos control. Ese mismo incremento se observó con las partículas aisladas a la hora 0 del ensayo de tipo mediterráneo. La incubación con las que fueron aisladas a la hora 2 tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo causó sin embargo el efecto contrario, ya que provocó que el receptor CD36 se expresase menos que en el cultivo control. La diferencia entre la modulación causada por éstas partículas y por las procedentes del desayuno de tipo occidental a la misma hora, resultó ser estadísticamente significativa ( $P<0.01$ ). Por el contrario, las TRL de la hora 4 causaron un

incremento en la expresión de CD36 en los macrófagos, incluso mayor que el observado por las TRL derivadas del desayuno de tipo occidental, aunque sin ser significativa dicha diferencia en este caso.

La expresión del receptor CD36 se vio nuevamente incrementada por las TRL aisladas a la hora 0 de los dos ensayos postprandiales del grupo de normopesos (figura 45.B), siendo este efecto superior con las derivadas del desayuno de tipo mediterráneo. La incubación con los dos tipos de TRL correspondientes a la hora 2 también elevó su expresión, siendo significativamente superior en el caso de las derivadas del desayuno de tipo mediterráneo ( $P < 0.05$ ), ya que causaron que CD36 se expresase 2.5 veces más que en el control. En cambio, cuando se añadieron a los cultivos celulares las TRL aisladas a la hora 4 del periodo postprandial, el nivel de expresión del receptor no se vio alterado por las procedentes del ensayo de tipo occidental, aunque fue ligeramente más elevado con el de tipo mediterráneo.



**Figura 45.** Expresión relativa del ARNm del receptor CD36 en macrófagos THP-1 incubados en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos obtenidas a las 0, 2 y 4 horas tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo y occidental, por los sujetos obesos (A) y normopesos (B) participantes del estudio. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM);  $n=12$ ;  $*=P < 0.05$ ,  $**=P < 0.01$  vs desayuno de tipo mediterráneo (Test-t student pareado).

## 6. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEL COMPONENTE LIPÍDICO DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA DE MACRÓFAGOS

### 6.1 Modulación de la actividad de la LPL de macrófagos por las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP) con distinta composición lipídica

**M**onocitos diferenciados a macrófagos mediante la adición de PMA fueron incubados con o sin (control, -CRLP) las CRLP enriquecidas con -trioleína (OOO), trilioleína (LLL) o 2-oleil-1,3-dipalmitina (POP) durante un periodo de 6 y 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se procedió a analizar la posible modulación de la actividad de la LPL en las tres fracciones (medio de cultivo, superficie celular e intracelular) debido a la carga lipídica de las partículas (figura 46).

La figura 46.A muestra la actividad de la LPL detectada en el medio de cultivo recogido a las 6 y 24 horas después de añadir las diferentes CRLP a los cultivos celulares. El periodo de incubación de 6 horas ya fue suficiente para identificar un claro efecto de las partículas artificiales sobre la actividad de la enzima liberada al medio, en función de su composición lipídica. Las CRLP enriquecidas en OOO y LLL provocaron que la enzima localizada en el medio de cultivo fuese significativamente menos activa en comparación con el nivel de actividad detectado de la LPL en el cultivo control (-CRLP). De hecho, la LPL fue menos activa en presencia de las CRLP compuestas por LLL que con las que contenían OOO, siendo significativa esta diferencia estadísticamente. No fue el caso de las CRLP enriquecidas en POP, pues la presencia de estas partículas no fue capaz de modular la actividad de la LPL de macrófagos liberada al medio de cultivo, ya que la enzima mantuvo un nivel de actividad similar al del cultivo control después de 6 horas de incubación.

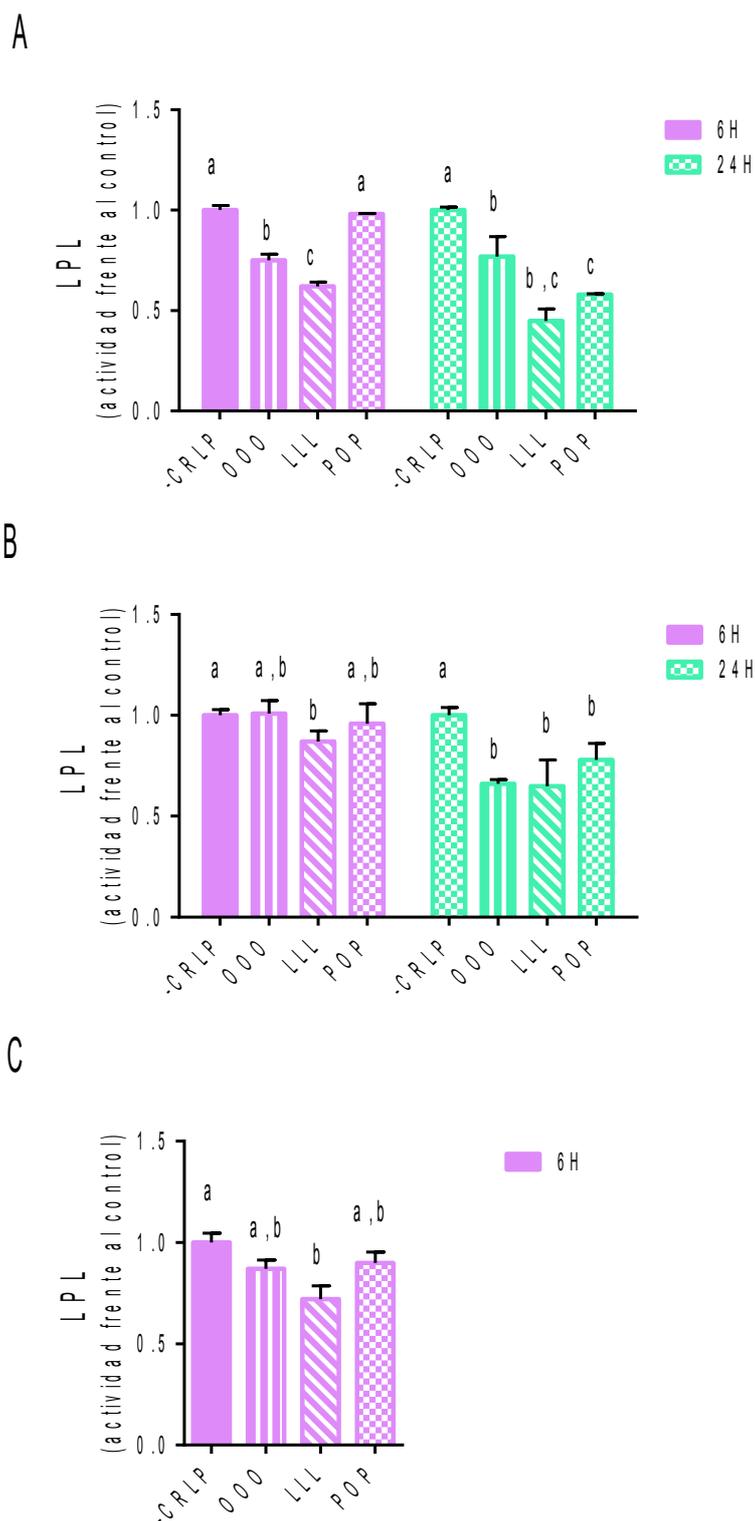
Cuando la incubación de los macrófagos con las partículas artificiales se extendió a 24 horas, el escenario encontrado fue bastante similar al descrito a las 6 horas de incubación. De nuevo, las CRLP enriquecidas en OOO y LLL indujeron un significativo descenso en los niveles de actividad de la LPL con respecto al control, pero a pesar de que la actividad fue otra vez menor en presencia de las CRLP que contenían LLL, la diferencia frente a la actividad detectada

con las CRLP compuestas con OOO no resultó ser esta vez significativa. En cuanto a las CRLP enriquecidas en POP, a las 24 horas de incubación con las células sí demostraron ser capaces de modular la actividad de la LPL, obteniéndose unos valores significativamente menores que los del cultivo control (-CRLP). Y de hecho, la LPL fue significativamente menos activa en presencia de estas partículas que en presencia de las CRLP compuestas por OOO.

Sin embargo, aunque se haya encontrado una evidente capacidad del componente lipídico de las TRL artificiales para modular el nivel de actividad de la LPL presente en el medio de cultivo, es la fracción que contiene la LPL anclada a la superficie celular la más relevante a la hora de realizar un estudio de la modulación de su actividad. Esto es debido a que ANGPTL4 es el mayor regulador de la actividad de LPL mediante su inhibición, y este fenómeno tiene lugar en la superficie celular, donde ambas proteínas interaccionan.

Al liberar la LPL anclada a la superficie de los macrófagos mediante la adición de heparina al medio de cultivo en presencia de las CRLP durante 6 horas (figura 46.B), pudo detectarse que solo las que estaban compuestas por LLL provocaron una menor actividad frente a la del control de forma significativa. No obstante, esta reducción provocada por las CRLP-LLL no resultó ser significativa al compararse con los niveles de actividad de la LPL obtenidos con los otros dos tipos de CRLP, las compuestas por OOO y las compuestas por POP. En cambio, la actividad de la LPL liberada de la superficie de los cultivos que permanecieron bajo la influencia de las partículas durante 24 horas, se observó que los tres tipos de CRLP fueron capaces de reducir su nivel de actividad significativamente frente a los del control (-CRLP). Sin embargo, al igual que sucedió a las 6 horas de incubación, la diferencia en la capacidad para modular su actividad entre partículas con distinto componente lipídico no resultó significativa.

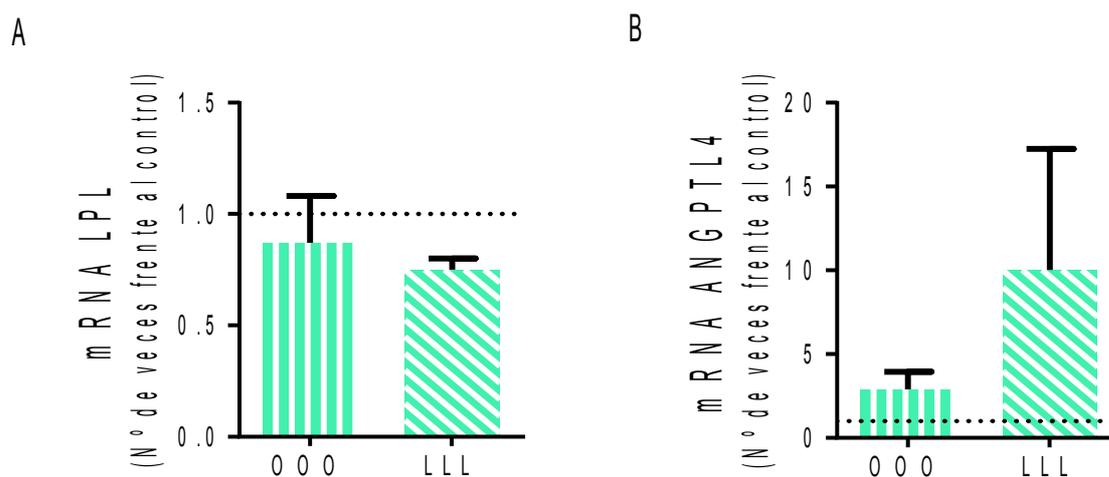
Finalmente, se realizó un estudio de la influencia de la composición de TG con distinto grado de saturación sobre la actividad de la LPL del espacio intracelular de los macrófagos, aunque esta vez se realizó únicamente en cultivos celulares expuestos a las CRLP durante 6 horas (figura 46.C). De la misma forma que sucedió con la LPL de la superficie celular tras ese tiempo de incubación, las CRLP que contenían LLL en su composición fueron las únicas que causaron una actividad de la LPL significativamente menor con respecto a la LPL del control (-CRLP).



**Figura 46.** Niveles de actividad de la LPL de los cultivos de macrófagos incubados 6 y 24 horas en presencia de lipoproteínas ricas en triglicéridos artificiales, compuestas con trioleína (OOO), trioleína (LLL) y 2-oleil-1,3-dipalmitina (POP), de las tres fracciones recolectadas: medio de cultivo (A), superficie celular (B), y medio intracelular (C). Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=4; Valor de la actividad de LPL en control (-C.R.L.P) utilizado como referencia= 1; a, b, c indican la existencia de diferencia estadísticamente significativa  $P < 0.05$  (ANOVA con Bonferroni).

## **6.2 Modulación de los niveles de expresión de los genes LPL y ANGPTL4 por parte del componente lipídico de las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP)**

Los niveles de expresión del ARNm de LPL y ANGPTL4 detectados después de que los cultivos celulares de macrófagos fueran incubados por un periodo de 24 horas en presencia de los QM remanentes artificiales compuestos con OOO o LLL se representan en la figura 47. La adición de las CRLP que contenían OOO provocaron una ligera reducción en la transcripción del gen que codifica la LPL con respecto a la expresión en los cultivos control (línea de puntos, valor=1) (figura 47.A). Estas mismas partículas también mostraron ser capaces de modular los niveles del ARNm de ANGPTLA, pues se vio que causaron la sobreexpresión de ANGPTL4 en comparación al nivel detectado en el control (figura 47.B). Sin embargo, fueron las partículas enriquecidas en LLL las que mostraron una mayor capacidad para alterar los niveles de expresión de ambos genes cuando se añadieron a los cultivos de macrófagos. Por un lado, fue con las CRLP-LLL con las que la expresión de LPL más se redujo (figura 47.A), aunque sin diferencias significativas con respecto al nivel de expresión de LPL obtenido con la influencia de las partículas CRLP-OOO. Y por otro lado, la adición de estas partículas a los cultivos celulares incrementó la transcripción del gen ANGPTL4 hasta 10 veces con respecto a la detectada en los cultivos control (figura 47.B). No obstant, a pesar de esta aparente sobreexpresión del gen ANGPTL4 inducida por las CRLP-LLL, no solo frente a la del control, sino también con respecto a la de los cultivos incubados con CRLP-OOO, la diferencia no resultó ser estadísticamente significativa.

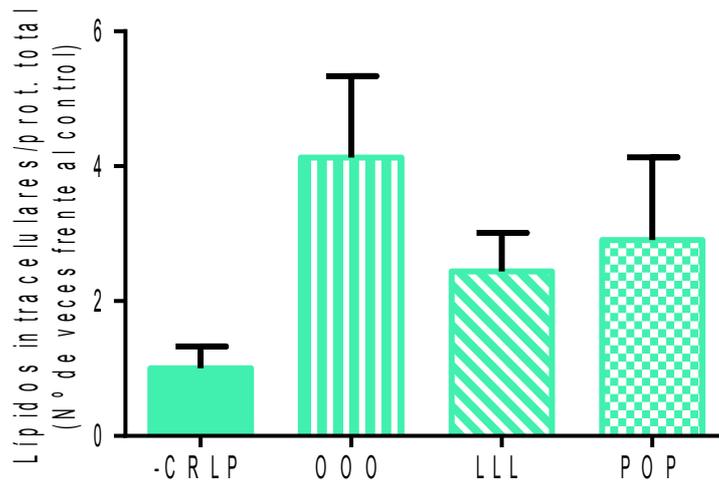


**Figura 47.** Expresión relativa del ARNm del gen LPL (A) y ANGPTL4 (B), en macrófagos THP-1 incubados en presencia de partículas artificiales de quilomicrones (CRLP), compuestas con trioleína (OOO) o trioleína (LLL), durante 24 horas. Valores expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=3; \* $P < 0.05$  vs control (Test-t student no pareado).

### **6.3 Estudio de la acumulación lipídica en macrófagos incubados con las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP) con diferente composición lipídica**

Los cultivos de macrófagos THP-1 incubados durante 24 horas con o sin (control, -CRLP) las CRLP preparadas con diferente composición lipídica, fueron teñidos con Aceite Rojo O para visualizar y cuantificar los lípidos incorporados en el citoplasma celular. Las fotografías tomadas de los cultivos celulares una vez fueron teñidos (Imágenes no disponibles), confirmaron la incorporación de lípidos al interior de las células, obteniéndose la mayor intensidad de coloración cuando las células fueron incubadas con las CRLP que contenían OOO. Con las partículas compuestas por LLL o POP, la intensidad de la coloración no presentó aparentemente diferencias entre ellas, aunque sí fue ligeramente inferior a la obtenida con las CRLP-OOO. Sin embargo, al tratarse de fotografías, la interpretación puede considerarse algo subjetiva. Por ello, se procedió a cuantificar la incorporación de lípidos al interior de las células mediante la medición de la densidad óptica (D.O.) de los cultivos celulares.

La figura 48 reveló una mayor carga lipídica en los cultivos celulares incubados con los tres tipos de partículas CRLP al compararse con el cultivo control (-CRLP). De la misma forma que se apreció en las fotografías (imágenes no disponibles), las CRLP sintetizadas con OOO provocaron una carga lipídica en el interior de los macrófagos tres veces superior que la presente en los cultivos control. Y la medición de la D.O de los cultivos incubados con CRLP-LLL o CRLP-POP confirmó que la acumulación intracelular lipídica fue bastante similar, aunque fueron las partículas compuestas con LLL las que causaron la menor incorporación de lípidos al interior de los macrófagos. Sin embargo, en ningún caso las diferencias encontradas fueron significativas.



**Figura 48.** Acumulación intracelular de lípidos en macrófagos THP-1 incubados durante 24 horas en ausencia (control, -CRLP) o presencia de las partículas artificiales de quilomicrones (CRLP), compuestas con trioleína (OOO), triloleína (LLL) o 2-oleil-1,3-dipalmitina (POP). Valores calculados como lípidos intracelulares/proteína total, y expresados como media  $\pm$  error estándar de la media (SEM); n=4; Valor de la acumulación lipídica en control (-CRLP) utilizado como referencia= 1; \*=P<0.05 (ANOVA con Bonferroni).

# DISCUSIÓN

Las principales causas de muerte en el siglo XXI continúan siendo las ECVs, y muchas de las organizaciones de la salud pública a nivel mundial consideran su prevención una prioridad de primer orden. Entre las principales estrategias establecidas se encuentra la promoción de un estilo de vida más saludable, y las intervenciones dietéticas son consideradas como las de mayor impacto sobre los desórdenes metabólicos que degeneran en el desarrollo de ECV.

Cambios en la composición grasa de la dieta están claramente asociados con significativas modificaciones en la concentración de lipoproteínas plasmáticas, uno de los principales factores de riesgo. Reducir el elevado contenido graso de la dieta, particularmente los SFA, se ha convertido en una importante necesidad ya que son responsables de un aumento de peso, del establecimiento de resistencia a la insulina e hiperlipemia en humanos [424]. Son varias las dietas propuestas para reducir los factores de riesgo CV mediante el reemplazo del contenido de los SFA, sin embargo, la pregunta clave es si deben ser reducidos mediante una dieta baja en grasa y elevado contenido de carbohidratos complejos, o mediante dietas con moderado contenido graso, pero ricas en MUFA o PUFA. A pesar de los numerosos beneficios cardiovasculares atribuidos a los PUFA, paradójicamente su ingesta ha sido limitada debido al efecto adverso que puede tener su elevado consumo, incluyendo reducción en HDL-c y una mayor susceptibilidad de las LDL-c a la oxidación [326, 327]. Y por otro lado, las dietas con concentraciones altas de hidratos de carbono han demostrado incrementar los niveles plasmáticos de TG y reducir la concentración de HDL-c, en comparación con aquellas con mayor contenido de grasas insaturadas [426]. En cambio, en la literatura científica es posible encontrar abundantes referencias a las propiedades cardioprotectoras asociadas al consumo de dietas con elevado contenido en MUFA [427, 428], especialmente en individuos con concentraciones séricas de TG elevadas [6, 429], además de en personas sanas [347]. Por ello, cada vez son más las organizaciones profesionales que recomiendan la adherencia a patrones alimentarios con elevado contenido en MUFA para prevenir las ECV, siendo la dieta mediterránea una de las herramientas más efectivas [430, 431].

Las personas que sufren obesidad se caracterizan por presentar un desorden del metabolismo lipídico, especialmente debido a elevados niveles postprandiales de TG en circulación. Esta dislipidemia provoca el daño en la función de órganos y, a la larga, contribuye a

una situación de lipotoxicidad que puede inducir resistencia de los tejidos a la insulina [183]. Se ha sugerido que la dieta mediterránea, caracterizada por ser rica en MUFA, es capaz de ayudar a reducir el peso corporal en personas con sobrepeso [304, 432, 433], y de contrarrestar el elevado riesgo cardiovascular asociado con un incremento de la adiposidad [287, 308]. Sin embargo, muy pocos estudios han evaluado el efecto del contenido lipídico de la dieta en el metabolismo postprandial en individuos obesos como población de estudio.

Por ello, el presente proyecto ha sido desarrollado para demostrar la contribución de un desayuno de tipo mediterráneo con aceite de oliva como principal fuente de grasa, a mejorar el perfil lipídico postprandial, reducir la respuesta inflamatoria crónica, así como a modular la composición de lípidos de las TRL y reducir su perfil aterogénico en un grupo de voluntarios adultos obesos.

## 1. ESTUDIO DE LA RESPUESTA LIPÍDICA POSTPRANDIAL EN SUERO TRAS LA INGESTA DE UN DESAYUNO DE TIPO MEDITERRÁNEO Y UN DESAYUNO DE TIPO OCCIDENTAL EN ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS

**C**uando se habla de ECV, es imprescindible considerar los factores de riesgo tradicionales asociados con la dieta, como dislipidemia, diabetes mellitus e hipertensión, entre otros. Por ello, al inicio del estudio realizamos un análisis de los marcadores de riesgo habituales para el diagnóstico de estos eventos: colesterol total y sus fracciones: LDL-c y HDL-c, TG, glucosa, insulina y presión arterial. La medición de los parámetros bioquímicos basales en los participantes del estudio confirmó la presencia de niveles de colesterol total y LDL-c en suero significativamente más elevados en el grupo de obesos con respecto al grupo control normopeso, especialmente los de LDL-c. En el caso del LDL-c, su concentración estaba muy por encima del valor límite recomendado (100 mg/dL) según el NECP ATP III/CDC AHA [434] y en el caso del colesterol total, su concentración sérica basal en el grupo obeso también superó los 200 mg/dl recomendados [137] aunque de forma más moderada. A pesar de que los niveles de colesterol total y LDL-c son importantes a la hora de determinar el riesgo cardiovascular, la concentración de TG y HDL-c en circulación son factores de riesgo críticos en el síndrome metabólico, por lo que su concentración plasmática son considerados marcadores de riesgo más valiosos [435]. Los niveles de HDL-c en circulación fueron significativamente inferiores en los obesos, aunque su concentración se encontraba dentro del rango deseable (HDL-c, 40-60 mg/dl) [434]. La medición de los TG séricos en ayunas reveló que los sujetos obesos también presentaron una concentración basal muy elevada, y aunque no sobrepasaron los 150 mg/dl, valor indicativo de hipertrigliceridemia [434] sí fueron significativamente superiores a los del grupo normopeso. En conjunto, estos resultados parecían indicar que el grupo de participantes obesos seleccionados para nuestro estudio presentaban un ligero cuadro de dislipidemia.

Se midieron también los niveles de glucosa e insulina en ayunas en ambos grupos experimentales para determinar si los sujetos pertenecientes al grupo obeso eran insulinoresistentes. Como era de esperar, la glucosa sérica en ayunas se encontraba a una concentración significativamente superior en el grupo de los obesos, pero la mayor diferencia entre los dos grupos experimentales, obeso y normopeso, se encontró en la concentración de

insulina, la cual fue 2.5 veces superior en los sujetos obesos frente a la que presentaron los individuos normopeso. En cualquier caso, la concentración detectada en ayunas no indicó que sufrieran hiperglicemia (glucosa >100 mg/dl en ayunas) o sensibilidad a la insulina (insulina >25 $\mu$ U/l). Con esos valores, se empleó el modelo de determinación del HOMA-IR. La cifra calculada en el grupo obeso fue 2.4, la cual, aunque cercana al punto de corte 2.6 que establece RI [421], no indicaba que los sujetos fueran insulinoresistentes. Existe una variabilidad muy alta en la literatura científica en cuanto a la definición del punto de corte que indica padecer RI. Esto se explica por la amplia variedad de criterios empleados para la definición de los puntos de corte de RI, así como la coexistencia o no de desórdenes metabólicos como obesidad, hipertensión o hipertrigliceridemia [434, 436, 437]. Por ejemplo, Lichnovska et al. encontraron valores promedio de HOMA-IR en adultos de edad avanzada normales de 1.7 $\pm$ 0.8 en hombres y de 1.7 $\pm$ 0.9 en mujeres, pero que ascendían a 3.1 $\pm$ 1.4 y 2.7 $\pm$ 1.0 respectivamente, en aquellos que presentaron hipertrigliceridemia [436]. Nosotros usamos el punto de corte para la RI de 2.6 establecido en la población española por Ascaso JF et al.[421].

Finalmente, puesto que la obesidad incrementa las probabilidades de sufrir hipertensión arterial, se realizó la medida de los valores de PAS y PAD. Mientras que la cifra de PAD fue similar en ambos grupos, se detectó un valor de PAS significativamente elevado en el grupo de obeso con respecto al grupo de sujetos normopesos. No obstante, las cifras PAS/PAD obtenidas en el grupo obeso eran inferiores al límite normal de hipertensión (PAS/PAD <135mmHg/85mmHg según FID [192]).

Aunque generalmente se asocia la obesidad con otra serie de patologías, estudios recientes han sugerido que no todos los sujetos obesos padecen por necesidad un conjunto de factores de riesgo cardiovascular [438], por lo que cada vez se le presta mayor atención a los diferentes fenotipos metabólicos de la obesidad. La “obesidad metabólicamente sana”, describe la ausencia de cualquier enfermedad cardiometabólica (DMT2, hipertensión y dislipidemia) en sujetos con un IMC >30 kg/m<sup>2</sup>. De la misma manera, también puede haber individuos con peso normal que presenten un “estado metabólicamente obeso”, o anormal, caracterizado por hiperinsulinemia y RI, susceptibles de desarrollar DMT2 y ECV [438, 439]. Este hecho apoya la hipótesis de considerar la obesidad como una enfermedad con pérdida de flexibilidad en uno o más de los procesos metabólicos que implica. En nuestro estudio, el análisis de los parámetros basales en los dos grupos experimentales permitió determinar que tanto el grupo obeso como el normopeso, se encuadraba dentro de un estado metabólicamente sano, a pesar de la ligera

dislipidemia detectada en los participantes obesos.

Un metabolismo postprandial alterado contribuye a la aterosclerosis, y dado que en las sociedades modernas nos encontramos la mayor parte del día en estado de no ayunas/postprandial, la lipemia postprandial ha emergido como un indicador de riesgo cardiovascular más preciso que las mediciones de los marcadores de riesgo realizados en ayunas, como tradicionalmente se ha estado haciendo [440, 441]. En el presente estudio, se propuso estudiar si la respuesta postprandial típicamente alterada en los sujetos obesos podría recuperar unos valores normales, similares a los de un individuo normopeso con un adecuado metabolismo lipídico, tras la ingesta de un desayuno de tipo mediterráneo. Asimismo, se optó por administrarles un desayuno de tipo occidental semejante al patrón dietético al que habitualmente se adhieren las personas que sufren de exceso de peso. Ello permitiría destacar los cambios metabólicos de los que se beneficiaría este grupo de población en caso de que optaran por modificar su dieta a una que siga el patrón de dieta mediterránea como terapia primaria.

La duración del ciclo de lipemia postprandial de un adulto sano es de 6 a 8 horas [442]. En el presente ensayo, durante un periodo de 6 horas tras el consumo de los dos tipos de desayunos experimentales, se midieron los niveles plasmáticos de colesterol total en circulación en obesos y en normopesos sin encontrar cambios con respecto a los valores basales en ninguno de los dos grupos en respuesta a la ingesta de los desayunos experimentales. Este resultado es consistente con la literatura sobre metabolismo lipídico postprandial [443, 444, 445]. De igual manera, los valores postprandiales de HDL-c no se vieron en ningún caso alterados, coincidiendo de nuevo con otros estudios [342].

En cambio, la concentración plasmática de TG ha demostrado ser modificada tras el consumo de las comidas y parece proporcionar una evidencia más plausible como predictor del riesgo de ECV [444, 445], que la concentración sérica de colesterol y sus diferentes fracciones. En el grupo de personas obesas, se pudo observar que la concentración plasmática de TG sufrió un incremento casi inmediatamente después del consumo de los desayunos, aunque sin diferencias significativas en el efecto causado por la distinta composición grasa de las dos comidas experimentales. Independientemente de si el desayuno era rico en MUFA o SFA, la respuesta postprandial que experimentó el grupo obeso fue rápida, alcanzándose el pico máximo a las 2 horas de su consumo, con una elevada concentración total de TG postprandial (iAUC) en ambos casos. Únicamente se encontraron diferencias significativas en los niveles de TG entre las

dos comidas en el grupo normopesos, en el que el consumo del desayuno occidental provocó una concentración postprandial total de TG significativamente superior. Otros estudios en los que han comparado el efecto de comidas ricas en SFA y MUFA sobre la concentración postprandial de TG tampoco han encontrado diferencias significativas entre dietas en personas con un metabolismo lipídico alterado, aunque en su caso fueron personas con síndrome metabólico [446], o insulinoresistentes [342] quienes participaron en los ensayos. Pero de nuevo existe gran variabilidad en lo que concierne a la respuesta lipídica postprandial. Se ha demostrado que la sustitución del contenido de SFA de la dieta de individuos con elevados niveles de TG por MUFA sí ejerce un efecto beneficioso, pues los niveles postprandiales de TG se reducen [429]. En cambio, otro estudio llevado a cabo con personas obesas y normopesas demostró lo contrario, pues detectaron en los dos grupos de participantes una menor concentración de TG postprandial tras la ingesta de una dieta rica en SFA [447].

Al comparar la respuesta lipídica postprandial entre sujetos obesos y normopesos, apreciamos la reducida capacidad del sistema biológico de los individuos con obesidad para responder adecuadamente a la ingesta de nutrientes, manteniendo un ciclo postprandial más extenso, con unos elevados niveles de TG en circulación durante más horas. En el grupo obeso, la concentración postprandial de TG se mantuvo elevada durante las 6 horas analizadas después de ingerir los dos tipos de desayunos. En contra, los sujetos normopesos, después de que a las 2 horas sufrieran el drástico aumento de los niveles de TG al ingerir el desayuno de tipo occidental, rápidamente comenzaron a verse reducidos, fruto de un correcto funcionamiento de su metabolismo lipídico. La respuesta postprandial experimentada por el grupo normopeso, aunque fue más lenta que la de los sujetos obesos, alcanzando el pico máximo de TG 1 hora después que ellos, mostró una mayor velocidad de aclaramiento de TG en circulación. Se observó que después de que ingirieran el desayuno occidental, la elevada concentración de TG detectada 3 horas después del consumo de la dieta, comenzó a experimentar un acelerado descenso durante las horas siguientes.

Sin embargo, el consumo del desayuno de tipo mediterráneo por el grupo normopeso dio lugar a una respuesta lipídica distinta, también apreciable en los individuos obesos. Después de que la concentración de TG se elevase tras la ingesta del desayuno rico en MUFA a las 2 horas, posteriormente comenzaron a reducirse en los dos grupos de participantes. Este descenso se vio paralizado a las 4 horas, momento en el que los niveles de TG en circulación volvieron a ir en aumento alcanzando la misma concentración a la obtenida tras el desayuno occidental. En un

estudio en el que participaron individuos con síndrome metabólico [446], experimentaron en cambio un incremento de TG plasmático más temprano tras consumir la dieta con elevado contenido en MUFA en comparación con el grupo que consumió la dieta rica en SFA, pero al igual que en el presente estudio, mostraron un aclaramiento más rápido, resultando en una respuesta postprandial menor con el consumo de MUFA. Existen varios motivos que podrían explicar este fenómeno observado tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo tanto en los sujetos obesos como normopesos. Uno de ellos podría ser que las partículas TRL formadas tras la ingesta de una comida rica en MUFA presenten mayor afinidad por los receptores hepáticos involucrados en su metabolismo, induciendo un aclaramiento más rápido y efectivo de estas TRL, que aquellas formadas con otras clases de AG [445]. Y por otro lado, podría ser debido a que la LPL responsable de la hidrólisis de los TG que componen las TRL presente mayor afinidad por los MUFA que los constituyen que por los SFA. ANGPTL4 es la principal proteína reguladora de la actividad de la LPL. Robal et al. demostraron que el ácido oleico, con una afinidad mayor por ANGPTL4 que el ácido palmítico, reduce el efecto inhibitorio que ejerce ANGPTL4 sobre LPL, permitiendo así unos niveles más elevados de actividad de LPL [448]. De ahí que la concentración de TG comience a reducirse más pronto después de ingerir el desayuno de tipo mediterráneo que el de tipo occidental.

La composición de las TRL y su ratio de aclaramiento cambia dinámicamente en respuesta a la dieta y metabolismo lipídico de las personas [152]. Además, varios estudios apoyan el concepto de que los niveles en circulación de TRL después de las comidas están asociados de manera significativa con el desarrollo de aterosclerosis [449, 450], por lo que habría que considerarlo como un marcador de riesgo importante para predecir ECV. Como se acaba de comentar, los TG contenidos en las partículas TRL en circulación son hidrolizados por acción de la LPL, pero la actividad del enzima no reduce su contenido de apo B, manteniéndose siempre presente en la partícula. Por ese motivo, en este estudio se cuantificó la concentración de apo B postprandial en los dos grupos experimentales como medio para cuantificar las partículas de TRL en circulación. Cuando hay un exceso de AG libres en el plasma debido a la incapacidad del tejido adiposo de manejar el exceso de absorción de nutrientes, el hígado aumenta la producción de partículas que contienen apo B, responsables del transporte de los TG al tejido adiposo [451]. Se ha observado que pacientes metabólicamente sanos tienen una respuesta postprandial menor de partículas TRL grandes, comparado con aquellos metabólicamente anormales, independientemente de si son obesos o no [452]. En el grupo de los individuos obesos de este estudio, como ya se ha visto con la concentración postprandial de TG, el consumo del desayuno

de tipo occidental indujo una rápida formación de partículas TRL. Eso se determinó con la concentración de apo B, que fue significativamente mayor a las 2 horas frente a la concentración de apo B detectada tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo a esa misma hora, coincidiendo además con el pico máximo de TG en circulación. En cambio, en el grupo de normopesos no se apreció diferencias significativas entre las dos dietas. Nuestros resultados parecen indicar que el consumo de una comida con elevado contenido en MUFA favorece una respuesta lipídica postprandial más reducida en individuos obesos. Esto fue previamente observado en un estudio de intervención nutricional, en el que personas con sobrepeso ingirieron 1g de aceite de oliva por kg de su peso corporal y tuvieron menor concentración de TRL que aquellas que consumieron una dieta rica en SFA, mientras que en un grupo de personas con peso saludable no detectaron diferencia entre las diferentes fuentes de lípidos [445]. Además se pudo ver que en el grupo de obesos, la concentración de apo B se mantuvo en aumento, siendo siempre más elevada tras el consumo del desayuno occidental, mientras que en el grupo de normopesos comenzaba a reducirse a las 2 horas. Ello sugiere que en los sujetos obesos hay un retraso en el aclaramiento de las partículas TRL, de ahí que los niveles de TG postprandiales también sigan siendo elevados durante el periodo postprandial analizado. Este retraso en el aclaramiento de partículas TRL podría estar inducido por una menor actividad de la LPL. Aunque los sujetos obesos no presentan RI, si muestran elevados niveles de insulina en circulación, y ello podría alterar la actividad del receptor LDLR, lo que contribuye a su vez a un retraso en el aclaramiento de VLDL. Las partículas VLDL contienen apo C-III, y ha sido demostrado que una elevada concentración plasmática de apo C-III funciona como un inhibidor de la LPL, contribuyendo a defectos cinéticos en el metabolismo de apo B [189]. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de apoB total en circulación durante el periodo postprandial después de consumir los dos tipos de dietas experimentales en ninguno de los dos grupos, el obeso y normopeso. Ese resultado no demuestra por tanto que la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo reduzca la producción de lipoproteínas que contienen apo B, pero sí que contribuye a que personas con obesidad no experimenten una respuesta postprandial tan elevada y extensa en comparación con las dietas ricas en SFA.

Los picos de insulina y glucosa suelen alcanzarse a las 0-2 horas después del consumo de las comidas [453]. En nuestro estudio, el pico máximo fue alcanzado 1 hora después del consumo de los dos tipos de desayunos en los dos grupos de estudio, el obeso y normopesos. Sin embargo, hubo diferencias en el efecto de los desayunos sobre los niveles de glucosa e

insulina en ambos grupos experimentales. En el caso del grupo de obesos, la respuesta glicémica postprandial fue la misma, independientemente del tipo de desayuno consumido, el mediterráneo o el occidental. Pero para el mantenimiento de esos niveles glicémicos en el periodo postprandial, el consumo del desayuno de tipo occidental, rico en SFA, requirió una síntesis significativamente mayor de insulina. Eso parece sugerir que el consumo diario de un desayuno con elevado contenido en SFA de manera continuada podría contribuir a la RI en individuos obesos. Por el contrario, lo que observamos en el grupo normopeso fue un escenario muy diferente. Los niveles de glucosa total en el periodo postprandial de este grupo fueron significativamente más elevados después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo frente al de tipo occidental y, sin embargo, la síntesis de insulina fue la misma después de consumir ambos tipos de desayunos. En este caso, una dieta rica en MUFA pareció estar beneficiando a los individuos de peso normal a que fueran más sensibles a la insulina.

Normalmente se relaciona obesidad como la causa de RI. No obstante, siempre y cuando las células adiposas estén sanas y sean capaces de almacenar correctamente unos niveles elevados de TG, no habrá efectos metabólicos adversos para el individuo, salvo un exceso de peso. De ahí que la tercera parte de la población obesa en la sociedad sea caracterizada como “obesos metabólicamente sanos”, con un exceso de de grasa corporal pero sin distorsiones metabólicas que se manifiesten en RI. No obstante, la RI suele ser provocada por un incremento de la inflamación y en particular, los SFA pueden verse como moléculas proinflamatorias. La RI parece comenzar en el hipotálamo y, una dieta con exceso de SFA (especialmente el ácido palmítico) puede causar inflamación en este órgano, conduciendo a una resistencia de la señal de saciedad, a la insulina y leptina [454]. Esto podría explicar el motivo por el que las personas con obesidad, ante dietas ricas en SFA, liberen mayor cantidad de insulina. Los resultados presentados sugieren que, mediante la reducción del contenido de SFA a través de la adherencia a los patrones alimentarios de la dieta mediterránea, las personas obesas podrían reducir la RI antes incluso de apreciar una pérdida significativa de exceso de grasa del tejido adiposo.

## 2. ESTUDIO DEL PERFIL DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN BASAL Y POSTPRANDIAL EN SUERO DE ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS TRAS LA INGESTA DE LOS DESAYUNOS EXPERIMENTALES

**E**l tejido adiposo, considerado hoy en día como la glándula endocrina más grande del cuerpo humano, expresa y secreta al sistema circulatorio hormonas, mediadores inflamatorios y efectores del sistema inmune, una lista que va en aumento. Algunas de estas moléculas son producidas en el tejido adiposo exclusivamente por los adipocitos, como la leptina y adiponectina (adipoquinas), mientras que otras son producidas además por otros tipos de células de la fracción no-adipocitaria que forman también parte del tejido adiposo, como es el caso de los macrófagos (citoquinas). Se ha reconocido que los macrófagos se acumulan en el tejido adiposo en situación de obesidad [455, 456] y que representan una buena parte de los contribuidores en la producción de citoquinas [457, 458]. En la actualidad, gracias a la evidencia científica, es posible sugerir que el tejido adiposo juega un importante papel en la respuesta inmune y que podría ser la mayor fuente de mediadores proinflamatorios del cuerpo humano [459].

La acumulación de tejido adiposo en el tórax y abdomen (obesidad abdominal o visceral) incrementa el riesgo de desarrollar diabetes y aterosclerosis, lo que está asociado con la elevación crónica de la concentración de mediadores inflamatorios en circulación. Por este motivo, los individuos con obesidad abdominal pueden experimentar elevada morbilidad y mortalidad cardiovascular [460]. En personas con obesidad, donde se ha establecido una respuesta de inflamación crónica de bajo grado, el tejido adiposo libera de manera constante citoquinas y mediadores bioactivos, llegando a haber una concentración hasta 10 veces superior de la mayoría de los mediadores de inflamación en circulación en los individuos obesos con respecto a los no obesos [461]. Estas moléculas son sustancias que participan en la regulación del consumo de energía, en el metabolismo de los lípidos y proteínas, el equilibrio glucosa/insulina, el estrés oxidativo, la aterosclerosis, la inflamación y la integridad cardiovascular [177, 219]. Por consiguiente, estos marcadores se han establecido como buenos candidatos para la asociación desde el punto de vista molecular entre el tejido adiposo y las complicaciones metabólicas y cardiovasculares que suceden a consecuencia de la obesidad humana.

Con el objeto de evaluar el estado de la respuesta inflamatoria en los dos grupos

experimentales al inicio del ensayo postprandial, se midió la concentración de varios marcadores de inflamación importantes en los individuos obesos y normopesos que participaron en nuestro estudio. El perfil inflamatorio del grupo de sujetos obesos reveló un claro estado inflamatorio crónico al compararse con el de los individuos normopesos, encontrándose importantes diferencias en la concentración de algunos de los marcadores de inflamación en circulación que fueron analizados. Los niveles basales de leptina, ceruloplasmina, PCR y MCP-1 detectados en ayunas en el grupo obeso fueron significativamente superiores con respecto a sus valores en los individuos normopesos. En cambio, no hubo diferencias significativas en la concentración plasmática de adiponectina, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Estudios *in vitro* han demostrado que adipocitos aislados de sujetos obesos sobreexpresan y secretan en abundancia leptina. La producción de leptina por el tejido adiposo depende del tamaño del adipocito [462], así como también lo es la de MCP-1 y de otros mediadores de la respuesta inflamatoria como IL-6, IL-8 y el factor estimulador de colonias de granulocitos [463]. Precisamente, fue en la concentración de leptina y MCP-1 donde se detectó la diferencia más significativa estadísticamente al comparar entre los dos grupos experimentales. Estas dos moléculas se encontraban a unos niveles muy superiores en el grupo de sujetos obesos, alcanzando en el caso de la leptina una concentración casi 3 veces mayor con respecto a los valores normales. Probablemente la causa de ello sea la hipertrofia establecida en los adipocitos de los individuos obesos como se ha mencionado. Estudios de expresión génica con tejido adiposo humano también han demostrado que los niveles de expresión de MCP-1 aumentan significativamente en el tejido adiposo de sujetos con obesidad mórbida [464]. MCP-1 es un fuerte quimioatrayente que actúa vía receptor CCR2 y es sintetizado principalmente por macrófagos. En un estudio realizado con ratones knock-out para el gen CCR2, los ratones mostraron una reducción de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y una mejora de la sensibilidad a la insulina [465], lo que sugirió que MCP-1 es uno de los principales responsables de la acumulación de macrófagos en circulación en el tejido adiposo, hecho también demostrado en sujetos obesos [466]. La acumulación de macrófagos es más abundante en el tejido adiposo abdominal que en el subcutáneo, lo que representa una de las razones por las que la obesidad abdominal es más perjudicial. Sin embargo, los marcadores de inflamación expresados por los macrófagos pueden ser pro- o antiinflamatorios, dependiendo del grado de obesidad [467]. Consecuentemente, el perfil de secreción del tejido adiposo puede cambiar en función del fenotipo de la población celular que lo compone durante las diferentes fases de la obesidad (inicio, agravación, mantenimiento y pérdida de peso) [468].

Los macrófagos alojados en el tejido adiposo también son activos productores de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y el incremento en su concentración por la activación de los propios macrófagos a un fenotipo proinflamatorio podría contribuir al deterioro de la sensibilidad a la insulina [469]. De hecho, estas moléculas inflamatorias se encuentran especialmente elevadas en pacientes diabéticos o intolerantes a la glucosa. Se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* que los hepatocitos así como las células musculares, adipocitos y células endoteliales responden a la exposición de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  con un mal funcionamiento de la señalización de la insulina [470, 471]. El grupo de obesos participantes de nuestro estudio, aun cuando presentaron elevados niveles de insulina en circulación en comparación con el grupo normopeso, no eran, sin embargo, diabéticos ni insulinoresistentes, al presentar un valor HOMA-IR no superior al valor de corte [421], aunque es cierto que su valor medio se encontraban en el límite. Probablemente fuera gracias a que la concentración basal de estas dos citoquinas pro-inflamatorias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , en este grupo de personas con obesidad, no estaba significativamente incrementada, no siendo muy diferente a los niveles que presentaron los individuos normopesos.

La adiponectina es una adipoquina con propiedades antiaterogénicas, antidiabéticas y antiinflamatorias, cuya producción, al contrario que otras adipoquinas, se ve suprimida en obesidad [252, 472]. El mecanismo por el que sus niveles plasmáticos se reducen en individuos con acumulación de grasa abdominal no ha sido del todo aclarado, aunque la correlación negativa existente entre la adiposidad abdominal y los niveles de adiponectina podrían explicarse mediante el incremento en la secreción de TNF- $\alpha$  por parte del tejido adiposo abdominal [212]. En contra de este hecho, en el grupo de individuos obesos de nuestro estudio, la concentración de adiponectina plasmática en ayunas no fue menor con respecto a los individuos normopesos. Además, como ya se ha comentado, los niveles de TNF- $\alpha$  que se detectaron en la población obesa al inicio del ensayo, tampoco difirieron significativamente de los de la población normopeso. Es posible que al no estar TNF- $\alpha$  lo suficientemente sobreexpresado, ello haya impedido que la concentración de adiponectina cayera como suele ocurrir en personas con obesidad. Por otro lado, se ha visto que en individuos con edades comprendidas entre 20-75 años que presentan el fenotipo de “obesidad metabólicamente sana”, hay una elevada concentración de adiponectina plasmática [472], y en vista de que el grupo de obesos de nuestro estudio presenta aparentemente una obesidad “benigna”, eso también podría explicar sus elevados niveles de adiponectina, similares a los expresados en los sujetos normopesos.

Los componentes del síndrome metabólico, entre ellos la obesidad abdominal, correlacionan con concentraciones plasmáticas de PCR elevadas [258], lo que apoya la relación existente entre tejido adiposo e inflamación. Múltiples estudios prospectivos han establecido que un incremento en los niveles de PCR están asociados con un aumento del riesgo de las ECV [473] debido a sus acciones proaterogénicas como son la reducción de la síntesis de óxido nítrico (NO) y la prostaciclina sintasa, su capacidad de unión a LDL-c y estimulación de su captación por macrófagos, y la inducción de la sobreexpresión de moléculas de adhesión en células endoteliales [474]. Además, es posible que la PCR contribuya directamente en el proceso de la aterosclerosis ya que es una de las sustancias presentes en las propias lesiones ateroscleróticas, más específicamente en la íntima vascular, donde co-localiza con monocitos, macrófagos derivados de monocitos y las lipoproteínas [256]. En un adulto sano, la concentración media de PCR en circulación es de 800 ng/ml, pero después de un estímulo grave, los valores de PCR pueden llegar a incrementarse hasta 10.000 veces más [475]. Sin embargo, en un individuo que sufre obesidad, lo normal es que la concentración de PCR se encuentre sobre los 10 nmol/l [476]. Los sujetos obesos de nuestro estudio tan solo presentan algo más del doble del nivel detectado en el grupo de participantes normopesos, lo que a su vez coincide con los valores identificados en los sujetos clasificados con obesidad metabólicamente sana [452], pero esa diferencia entre los dos grupos es suficiente para resultar estadísticamente significativa. También se ha observado que la PCR puede estar involucrada en el desarrollo de resistencia a la leptina, lo que es importante porque la hiperleptinemia endógena no reduce el apetito o incrementa el gasto energético [477]. Por eso suelen ir asociados los valores elevados de PCR y leptina, lo que coincide con los niveles basales de los sujetos obesos de nuestro estudio. Varios trabajos de investigación previos han demostrado que el incremento en la concentración de ambas citoquinas, PCR y leptina, estaba asociado con un elevado riesgo de eventos CV mayores. Sin embargo, la leptina parece ser un predictor más robusto [478], pues en un modelo multivariable se mostró como un predictor de eventos CV independiente, mientras que la PCR no [479]. En vista de que los individuos obesos participantes de nuestro estudio mostraron una diferencia muy significativa en los valores de leptina frente a los de los normopesos, podría afirmarse que, en efecto, su riesgo de desarrollar ECV es mayor que la población normopesa.

Junto con la PCR, la ceruloplasmina es una proteína sintetizada en el hígado durante el proceso inflamatorio agudo y participa en la fase aguda de la reacción inflamatoria [264]. Elevados niveles de ceruloplasmina en circulación han sido asociados con un alto IMC y han sido identificados como un factor independiente que contribuye al incremento de la obesidad

[263]. La concentración basal de ceruloplasmina detectada en los participantes obesos al inicio del estudio realizado fue significativamente superior a la que presentaron los individuos de peso normal, lo que parece confirmar la estrecha relación existente entre esta proteína y la obesidad. El mecanismo por el que la ceruloplasmina se relaciona con la obesidad no ha sido aún identificado; sin embargo, es posible que esté involucrada en la vía inflamatoria ligada a esta patología. Cuando otros tejidos son dañados liberan citoquinas, y éstas a su vez estimulan la producción de proteínas de fase aguda por parte del hígado, potentes contribuidores de la aterogénesis así como marcadores del riesgo CV, entre ellos la ceruloplasmina y la PCR [265, 266]. Existe cierta evidencia que indica que unos valores de ceruloplasmina plasmáticos elevados en sujetos con síndrome metabólico se asocian con varios de sus componentes, como glucosa en ayunas, TG y HDL-c [480]. Aún no ha sido demostrada su asociación independiente con otros de los componentes del síndrome metabólico como presión arterial [480] y obesidad abdominal [481]. Como ya ha sido mencionado anteriormente, la obesidad es una de las principales responsables de que una persona presente síndrome metabólico debido a la existencia del estado crónico de inflamación [482], y esto no es solo aplicable en adultos, sino que también lo es en adolescentes. Aguilar et al. [483] y Giodarno et al. [484] encontraron una correlación entre unos niveles de ceruloplasmina incrementados y el temprano desarrollo de desórdenes CV en adolescentes. Adicionalmente, en otro estudio realizado previamente por nosotros, a pesar de no encontrar tampoco una correlación entre ceruloplasmina y síndrome metabólico, demostramos que esta proteína mostraba entre todos los marcadores de inflamación analizados, el valor más elevado para predecir el síndrome metabólico en el grupo de adolescentes que participó en el estudio. De hecho, el valor de ceruloplasmina fue tan bueno para predecirlo como la medida de la circunferencia de la cintura, considerada un requisito para el diagnóstico del síndrome metabólico, e incluso mejor que cualquiera de sus componentes. Es más, demostramos a su vez que las concentraciones de glucosa, TG y HDL-c muestran un valor de predicción del síndrome metabólico bajo en adolescentes cuando son considerados individualmente [267]. Así como en el presente estudio el grupo de participantes con obesidad presentaron niveles basales significativamente más elevados de PCR frente al grupo control, también se observaron concentraciones más elevadas de ceruloplasmina. Puesto que las proteínas de fase aguda pueden interactuar sinérgicamente, es posible que su respuesta inflamatoria esté acelerada y, en consecuencia, también lo esté el desarrollo de la aterosclerosis.

A pesar de la evidente asociación entre la ceruloplasmina y la obesidad, varios estudios han intentado descifrar si esta proteína juega un papel importante en la obesidad como

mediador/inductor, o si es simplemente un marcador cuyos niveles aumentan o responden al estado de obesidad [263]. La ceruloplasmina posee actividad antioxidante debido a su actividad ferroxidasa, gracias a la cual es capaz de oxidar el hierro ferroso a hierro férrico, lo que no permite que el hierro esté disponible para la reacción Fent, habiendo así una generación limitada de radicales hidroxilo [485]. Esta reacción, junto a otras, es una de las responsables del estrés oxidativo en las placas ateroscleróticas [486]. Por esta razón, a la ceruloplasmina se le atribuye un importante rol en el control de la oxidación de lípidos de membrana, probablemente por la oxidación directa de cationes, previniendo así su catálisis por peroxidación lipídica [262]. Sin embargo, por otro lado, la peroxidación lipídica inducida por la ceruloplasmina contribuye a la progresión de la aterosclerosis y enfermedad coronaria vascular, y varios estudios han mostrado que está a su vez acelerada por la glucosa [487, 488]. Puesto que una de las principales características de las personas obesas es la hiperglicemia, lo cual ha sido corroborado en el grupo obeso de este estudio, este es otro factor que apoya que los elevados niveles de ceruloplasmina en circulación agravaría aún más el desarrollo de la placa de ateroma. Además, tanto la hiperglicemia como la hipertrigliceridemia establecida en la obesidad incluso en estado de ayunas, incrementan el estrés oxidativo celular, y se ha sugerido que la elevación de la concentración plasmática de ceruloplasmina en los sujetos obesos podría deberse como un mecanismo antioxidativo compensatorio a ese incremento en el estrés oxidativo celular [480]. Sin embargo, esta relación causal y temporal permanece poco clara todavía.

Después del consumo de una comida con un elevado contenido graso, se ha observado un inmediato incremento postprandial en el nivel de marcadores de inflamación plasmáticos en hombres con obesidad abdominal [489]. La grasa total de la dieta y los SFA están asociados con RI y una elevación de la presión sanguínea así como con la respuesta inflamatoria crónica establecida en la obesidad [490]. De hecho, el consumo de dietas ricas en SFA resulta en un perfil de expresión génica proinflamatorio “ligado a la obesidad”, mientras que el consumo de dietas ricas en MUFA causa un perfil más antiinflamatorio [491].

Varias células en el cuerpo humano responden a la elevación postprandial aguda de los componentes de la dieta mediante la activación transitoria de la respuesta inflamatoria, entre ellas los adipocitos y monocitos/macrófagos del tejido adiposo, lo que da lugar a un incremento de la concentración de los mediadores inflamatorios. Ha quedado demostrado que los AG de la dieta afectan al proceso inflamatorio mediante la modulación del metabolismo de eicosanoides, y también a través de mecanismos independientes de eicosanoides tales como la regulación del

proceso de señalización de la membrana y citosólico, que influyen sobre la actividad de factores de transcripción involucrados en la inflamación [492, 493]. Entre estos factores de transcripción se incluyen NF- $\kappa$ B y PPAR- $\delta$ , ambos sensibles a los AG. Entre los AG con capacidad para activar la respuesta inflamatoria destacan precisamente los SFA. Estudios *in vitro* han sugerido que los SFA pueden promover el proceso inflamatorio, pero tan solo unos pocos estudios observacionales con humanos han investigado la posible relación existente entre la exposición celular a SFA y los marcadores de inflamación en circulación [494, 495, 496, 497]. Fernández-Real et al. [496] no encontraron relación alguna entre los SFA en suero y PCR o IL-6 en individuos con un peso corporal normal, mientras que en individuos con sobrepeso sí detectaron una asociación positiva entre SFA y la concentración de IL-6, y vieron que el ratio de SFA:PUFA n-6 o SFA:PUFA n-3 estaba también positivamente asociado con la concentración de IL-6 y PCR, respectivamente. Esto fue confirmado en un estudio de intervención nutricional en el que los participantes, varones de 25-60 años, que se alimentaron durante 5 semanas con dietas ricas en ácido esteárico o laurístico, mirístico y palmítico, mostraron concentraciones más elevadas de PCR, fibrinógeno, IL-6 y E-selectina en comparación con los que se adhirieron a una dieta enriquecida en ácido oleico durante ese periodo de tiempo [498].

También se han establecido interconexiones entre la dieta mediterránea y los marcadores de inflamación así como con la función endotelial. Los estudios “Nurses' Health” y ATTICA informaron de la evidente correlación existente entre una alta adherencia a la dieta mediterránea y la reducción en IL-6, PCR, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina, fibrinógeno, niveles de homocisteína y de leucocitos [499, 500]. Uno de los sub-estudios realizados en el ensayo PREDIMED mostró posteriormente resultados similares [291], así como la capacidad de la dieta mediterránea suplementada con AOV para reducir la expresión de genes proinflamatorios [226]. Una de las explicaciones a estos mecanismos cardioprotectores y la capacidad de la dieta mediterránea para reducir los niveles de los mediadores de inflamación en circulación sería debido a su principal fuente de grasa, el aceite de oliva, constituido en su mayoría por MUFA. De hecho, observaciones *ex vivo* en voluntarios sanos han mostrado que, en contra de las comidas ricas en mantequilla o en frutos secos, el consumo de una comida rica en aceite de oliva no induce la activación postprandial de la vía NF- $\kappa$ B en monocitos [313], implicada en la regulación de varios genes inflamatorios, entre ellos IL-1 $\beta$  [501], lo que sugiere un efecto antiinflamatorio asociado al AOV.

En este contexto, demostrada la capacidad de los AG para activar/reducir la respuesta

inflamatoria y para modular la liberación de los mediadores de inflamación en circulación, nuestra intención fue evaluar la capacidad de un desayuno de tipo mediterráneo, rico en MUFA, para reducir el estado inflamatorio crónico establecido en los pacientes obesos de nuestro estudio. Igualmente, nos propusimos confirmar la elevación de los niveles en circulación de los marcadores de inflamación a causa del consumo de un desayuno de tipo occidental, rico en SFA.

La relación entre los diferentes tipos de AG de la dieta y la expresión de los niveles de adiponectina ha sido bien documentada en ayunas, estando la ingesta de SFA correlacionada negativamente con la concentración de adiponectina circulante, mientras que el consumo de PUFA n-3 se asocia positivamente en personas sanas. Un ejemplo de ello fue un estudio en el cual, después de que los participantes consumieran 6.5 ml de aceite de oliva diarios durante un año, los niveles en circulación de adiponectina se vieron incrementados, aunque hay que añadir que el aceite de oliva que ingirieron se encontraba enriquecido con PUFA n-3 [503]. Y otro estudio de intervención nutricional determinó que la concentración plasmática de adiponectina podría verse mejorada mediante el hábito de consumir nueces a diario, fuente natural de PUFA n-3 [504]. Sin embargo, en el estado postprandial aún no ha quedado del todo establecida dicha relación debido a la gran variabilidad existente en los resultados mostrados por la comunidad científica. En un trabajo previo llevado a cabo por Paniagua et al.[505], en el que fue evaluada la diferencia en la respuesta de los niveles postprandiales de varias adipoquinas tras el consumo por personas sanas de tres desayunos con la misma cantidad de grasa pero con distinta composición de AG, no detectaron entre ellos diferencias en la concentración de adiponectina postprandial durante las tres horas siguientes a su consumo. Este resultado fue también confirmado por Lozano et al. [506]. Después de que los participantes normopeso de nuestro estudio consumieran las dos comidas experimentales, se detectó que la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo elevó la concentración postprandial de adiponectina mientras que el de tipo occidental provocó una significativa reducción de sus niveles totales en circulación durante el periodo postprandial, lo que está de acuerdo con la literatura científica. En contra, la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo no logró incrementar los niveles de adiponectina en las personas con obesidad, sino que éstos se vieron ligeramente reducidos, incrementándose por el contrario con el consumo del desayuno de tipo occidental rico en SFA.

Varios estudios han demostrado que es a través de una previa pérdida peso corporal el modo por el cual las personas con obesidad pueden beneficiarse de las propiedades antiinflamatorias proporcionadas por el consumo de un desayuno de tipo mediterráneo, entre

ellas la elevación de los niveles de adiponectina. Shai et al. [337] observaron que los sujetos con un IMC  $>27 \text{ Kg/m}^2$  que se adhirieron a varias dietas, entre ellas la dieta mediterránea, mostraron un significativo incremento de los niveles de adiponectina cuando éstos se encontraban en las fases de pérdida de peso y mantenimiento. Esta asociación entre la pérdida de peso y una mejora en los niveles de adiponectina a largo plazo también fue demostrada en sujetos obesos sometidos a un bypass gástrico con técnica de Y-de-Roux, en los que se observó que los niveles de adiponectina plasmática fueron incrementándose lentamente, asociándose a su vez con una mejoría en la sensibilidad a la insulina [507]. De hecho, la existencia de una correlación negativa entre la concentración plasmática de adiponectina y las concentraciones de insulina en pacientes con obesidad abdominal con o sin síndrome metabólico, fue demostrada por Rubin et al.[508]. Sin embargo, Hotta et al. [509] demostraron que los niveles de adiponectina no se ven afectados debido al incremento experimentado en los niveles plasmáticos de insulina inmediatamente después de la ingesta de las comidas, sino que para que la insulina tenga un efecto agudo sobre la adiponectina postprandial en circulación sería necesario un periodo largo de hiperinsulinemia. En nuestro caso, esta última afirmación pareció confirmarse tan solo cuando el grupo obeso ingirió el desayuno de tipo occidental, pues estos individuos experimentaron un incremento significativo de la concentración total de insulina en el periodo postprandial pero no vieron reducida la concentración de adiponectina, sino que por el contrario a lo esperado, se elevó ligeramente. En cambio, la relación negativa entre insulina y adiponectina descrita sí se apreció cuando los sujetos obesos consumieron la comida de tipo mediterránea. Pero fue en las personas normopeso donde la ingesta del desayuno de tipo occidental provocó que la inmediata elevación de los niveles de insulina en circulación después de su ingesta redujera de forma muy significativa los niveles postprandiales de adiponectina. Estos resultados parecen confirmar que los efectos perjudiciales provocados por el consumo del desayuno de tipo occidental son más acusados en las personas de peso normal.

Dado que la concentración circulante de leptina es un reflejo de la masa grasa corporal o del tamaño de los adipocitos, ello explicaría que los niveles de producción de leptina en el grupo de personas normopesas se mantuviera bajo durante las 4 horas del periodo postprandial, sin que se detectase diferencia alguna entre el consumo de los dos tipos de comidas experimentales. Por parte de los sujetos obesos, cuyos niveles eran significativamente elevados, la respuesta observada fue muy similar a la del grupo de peso corporal normal, y el consumo de una comida rica en MUFA no resultó en una mejora de este parámetro. Es cierto que se observó una ligera reducción en la liberación de leptina después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo, no

obstante, la diferencia con el otro desayuno rico en SFA no resultó ser significativa estadísticamente. Estos resultados parecen coincidir con los obtenidos por Paniagua et al. [510]. Tras realizar el análisis del perfil de expresión génica de los participantes de su estudio, éstos presentaron un nivel de transcritos de leptina postprandial similar, independientemente de la fuente de grasa contenida en las dietas experimentales que consumieron, aunque en su caso, se trató de una intervención nutricional de 4 semanas de duración [510]. Otros estudios llevados a cabo con un tiempo de intervención más largo de semanas o incluso años, sí han demostrado el beneficio de ingerir una dieta rica en MUFA en la reducción de los niveles de leptina cuando se compara con dietas con alto contenido en SFA [498, 511]. Esto parece sugerir que sería necesario realizar una intervención de mayor duración sobre los participantes del presente estudio para poder detectar el impacto de consumir una comida con altos niveles de MUFA sobre los niveles de leptina. Sin embargo, la importancia de la temporalidad de la intervención dietética para ver cambios sobre la leptina podría deberse al efecto que ofrece a largo plazo una dieta u otra de nuevo sobre la pérdida de peso. Shai et al. [337] probaron el efecto del consumo de tres dietas indicadas para lograr la pérdida de peso corporal en un grupo de participantes moderadamente obesos, siendo una de ellas la dieta mediterránea y otra una dieta baja en grasa que contenía un 10% de SFA del 30% total. Después de consumir ambas dietas, observaron que la concentración de leptina en circulación se reducía significativamente, siempre y cuando hubiera una pérdida de peso corporal, de la misma forma que sucedía con la adiponectina. Ese hecho parece indicar que es el efecto de la dieta en la pérdida de peso corporal lo que demuestra tener la capacidad para modular los niveles de producción postprandial de leptina, además de otras citoquinas.

Con respecto a los niveles de ceruloplasmina detectados en los participantes de nuestro estudio tras la ingesta de las comidas experimentales, se observó una reducción en la concentración total de ceruloplasmina durante el periodo postprandial en todos los casos, pero no logramos detectar ninguna diferencia en el efecto causado por las dos diferentes fuentes de grasa contenidas en ellas. Además, la respuesta postprandial en el grupo obeso y el normopeso fue también semejante. Pocos estudios pueden encontrarse en la literatura científica realizados sobre la respuesta postprandial en los niveles de ceruloplasmina en circulación en personas que sufren obesidad, por lo que contrastar nuestros resultados con otros es algo complicado. Sin embargo, mencionando de nuevo el trabajo realizado Shai et al., la producción postprandial de ceruloplasmina, al igual que sucedía con los niveles de leptina y otros marcadores de inflamación, se ve reducida con la pérdida de peso, sin diferencias entre el consumo de dietas con distinto contenido lipídico [337].

Se ha demostrado una correlación negativa significativa entre la glucosa plasmática y la ceruloplasmina en personas con DMT2, probablemente por el daño causado por el glucagón a las enzimas antioxidantes debido a la hiperglicemia [512]. En nuestro estudio, como ya ha sido comentado, los niveles de glucosa plasmática sufrieron un incremento en ambos grupos, el obeso y normopeso tras la ingesta de las dos comidas experimentales, y al contrario que la glucosa, la ceruloplasmina se redujo, por lo que ésta podría ser una de las posibles razones de la menor concentración de ceruloplasmina tras la ingesta de una comida por individuos con hiperglicemia. Además, en otros estudios se ha observado que en personas con síndrome metabólico y DMT2, también existe una reducción en los niveles de ceruloplasmina, posiblemente por el incremento del empleo de antioxidantes para neutralizar las especies reactivas de oxígeno que se producen en exceso en estas condiciones, especialmente en DMT2 [513].

La PCR en circulación apenas se vio afectada postprandialmente tras la ingesta de las comidas experimentales en el grupo de sujetos con un peso saludable, tan solo fluctuaron en torno al valor basal, aunque paradójicamente éstos valores fueron ligeramente inferiores tras el consumo del desayuno de tipo occidental durante las 6 horas del periodo estudiado. En el grupo de sujetos obesos también se detectó cierta reducción de la PCR en circulación después de que se ingiriese el desayuno de tipo occidental. Aunque por el contrario, fue el desayuno de tipo mediterráneo el que provocó que su concentración se incrementase ligeramente por encima de los valores iniciales. No obstante, no hubo diferencias significativas en ningún caso, ni si quiera con respecto a los valores basales. Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios realizados sobre la modulación de los niveles de expresión de PCR en el periodo postprandial tras la exposición a dietas con un elevado contenido en SFA o MUFA en sujetos obesos [514], con diabetes [515] y sanos [516]. Se ha visto que lo óptimo es evaluar los cambios sufridos por los niveles de PCR en circulación a las 24 horas del periodo postprandial [517], lo que podría explicar la ausencia de alteración en la concentración plasmática de esta citoquina durante las 6 horas del periodo postprandial que ha sido analizado en este estudio. Por otro lado, recientes investigaciones han mostrado que mediante la pérdida de peso o la dieta, una vez más, es posible reducir los niveles de PCR en circulación [518]. Entre los resultados obtenidos por Shai et al. [337], la concentración de hs-PCR se redujo significativamente en el grupo obeso únicamente con la pérdida de peso lograda tras el consumo de la dieta mediterránea. Es importante mencionar que esos resultados fueron obtenidos tras un periodo de intervención dietética de 2 años, mientras que por ejemplo en el caso de los niveles de síntesis de leptina, la mayor reducción tuvo lugar a los 6 meses, coincidiendo con el momento de mayor pérdida de peso

corporal de los participantes de su estudio.

La respuesta de la concentración postprandial de MCP-1 tras la ingesta de las dos comidas experimentales también fue muy similar entre los dos grupos del estudio. En el trabajo realizado previamente por Van Dijk et al. en 2012 [447], analizaron el efecto de consumir unos batidos con alto contenido graso, cuya composición difería en SFA, MUFA o PUFA, por sujetos obesos y delgados, en los niveles de expresión de varios genes inflamatorios en células monocucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas de los participantes. En su caso, tampoco hubo diferencias entre los dos grupos respecto a los niveles de expresión de MCP-1 [447], aunque éstos sí fueron significativamente mayores en caso de que los obesos fueran a su vez diabéticos. Estos resultados, en concordancia con los nuestros, indican que un incremento en los niveles de expresión de MCP-1 podría considerarse como un indicador de un fenotipo metabólico más severo. En cuanto a la diferencia en la concentración postprandial de MCP-1 en los dos grupos de participantes de nuestro estudio, tras la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo o el de tipo occidental, tampoco se detectaron diferencias significativas, pues ambos indujeron una progresiva reducción de esta quimioquina durante las 4 horas del periodo postprandial de manera muy similar. Por el contrario, en el estudio previamente mencionado, los niveles de expresión de MCP-1 detectados en respuesta a la ingesta de los batidos con un alto contenido de grasas insaturadas (PUFA n-3 y MUFA), sí se vieron incrementados en las células PBMC aisladas de sujetos obesos diabéticos 4 horas después de su consumo, lo que no se observó cuando fue el batido rico en SFA el que se ingirió [447]. Esto podría deberse a que los AG insaturados son más propensos a la oxidación que SFA y pueden inducir un mayor estrés oxidativo y, en consecuencia, afectar el estado inflamatorio. Esta explicación también podría del mismo modo atribuirse a la mayor concentración postprandial de PCR obtenida en nuestro estudio, tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo por el grupo obeso.

En términos generales, parece que el consumo del desayuno de tipo mediterráneo tuvo el efecto cardioprotector esperado en las personas con peso normal, al inducir una menor liberación de los mediadores de inflamación analizados. Y en el caso de los sujetos obesos, aunque la respuesta inflamatoria desencadenada fue similar a la de los individuos normopeso, salvo ciertas excepciones como se vio con la PCR y adiponectina, los datos parecen apoyar que sería necesaria una previa pérdida de peso para poder verse beneficiados de las propiedades antiinflamatorias de una dieta rica en MUFA.

### 3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS COMPONENTES DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS AISLADAS DE ADULTOS OBESOS Y NORMOPESOS, ANTES Y TRAS LA INGESTA DE LOS DESAYUNOS EXPERIMENTALES

**E**n las sociedades occidentales las personas pasan la mayor parte del tiempo en un estado de no-ayuno durante el cual los niveles de TRL se elevan con continuas fluctuaciones en el grado de lipemia. La exposición a una alta concentración de TRL en circulación durante el periodo postprandial ha demostrado estar significativamente asociada con el desarrollo de aterosclerosis, y el carácter aterogénico de estas partículas ha sido ampliamente documentado por la comunidad científica [65, 150, 151, 153]. El gran tamaño de los QM (hasta 1  $\mu\text{m}$ ) hizo pensar que no eran capaces de atravesar la pared arterial y, por tanto, no eran tan aterogénicos como las LDL. Sin embargo, ha quedado más que demostrado que algunos de ellos no solo son capaces de atravesar la pared arterial, sino que también son retenidos en el espacio subendotelial [97] y acumulados en las células del músculo liso, donde atraen monocitos y son internalizados por ellos, sin siquiera la necesidad de sufrir modificaciones químicas [145]. Ese conjunto de sucesos desencadena la activación de la respuesta inflamatoria y la formación de células espumosas [142, 143]. Por estas razones, finalmente se ha admitido que las TRL tienen un perfil especialmente aterogénico [138].

La composición de AG de las TRL representa un factor importante para su metabolismo y para el aclaramiento de los TG plasmáticos, ya que tiene la capacidad de modular tanto la afinidad de receptores celulares hepáticos por las partículas, como la actividad de enzimas lipolíticas como la LPL, lo que a su vez es decisivo para la formación de TRL remanentes. Por ejemplo, estudios previos como el realizado por Botham et al. [519], demostraron que los QM derivados de aceite de pescado rico en PUFA n-3, o de aceite de maíz con elevado contenido de PUFA n-6, fueron retirados más rápidamente de la sangre que aquellos derivados de aceite de oliva, rico en MUFA, o los derivados de aceite de palma, rico en SFA de cadena larga. Gracias a estudios *in vivo* e *in vitro*, hay suficiente evidencia que sugiere que la LPL ejerce una hidrólisis más rápida de los TG presentes en los QM cuando éstos contienen ácido linoleico, frente a los QM que están compuestos por ácido araquidónico [520, 521]. Incluso la presencia del ácido eicosapentaenoico ha mostrado ser relativamente resistente a la hidrólisis por la enzima *in vitro*

[522]. Estos resultados demuestran por tanto que la composición de las partículas afecta inevitablemente a su procesamiento por la LPL.

Pero además, el contenido de AG es un determinante para la acumulación intracelular de TG en los macrófagos y formación de células espumosas. Uno de los principales distintivos de las lesiones ateroscleróticas es la presencia de macrófagos con una elevada carga lipídica en su interior debido a la internalización de TRL. Varios estudios han sacado a relucir la influencia de la composición lipídica de las TRL sobre la capacidad de estas células para acumular lípidos intracelularmente mediante la captación de esas partículas. De Pascale et al. [358] estudiaron el efecto de QM sintetizados artificialmente enriquecidos en SFA, MUFA, PUFA n-6, y PUFA n-3 por la incorporación de TG aislados de aceite de palma, oliva, maíz, y de pescado, respectivamente, sobre la transformación de macrófagos THP-1 a células espumosas. Según sus resultados, cuando las partículas se encuentran enriquecidas en SFA o MUFA, son captadas a una velocidad mayor que en caso de contener elevadas concentraciones de PUFA n-6 o PUFA n-3 en su composición, siendo además las partículas ricas en SFA las que provocaron la mayor acumulación lipídica en los macrófagos [360, 523]. Estudios como el realizado por Jinno et al. [524] demostraron igualmente que el contenido de AG presente en las TRL es capaz de modular los niveles de actividad de la LPL expresada en macrófagos. La actividad de la LPL sintetizada en la superficie de monocitos y macrófagos tiene un potente impacto en el desarrollo de células espumosas y en la aterogénesis, y la hidrólisis de los TG transportados por las TRL por la LPL es uno de los mecanismos predominantes para la internalización de TG por los macrófagos [83, 84]. Es más, la LPL es capaz de diferenciar entre substratos y exhibir una especificidad determinada según la longitud de cadena de los AG y su grado de saturación [525]. Jinno et al. también demostraron que en VLDL aisladas de ratones que consumieron durante una semana una dieta con alto contenido de ácido eicosapentaenoico (EPA), la presencia de este AG se elevó con respecto al resto de AG componentes de las partículas. Este cambio en la composición de las partículas modificó sus propiedades proinflamatorias mediante la reducción en la susceptibilidad a la LPL en cultivos de macrófagos THP-1, resultando ser más resistentes a la hidrólisis de sus TG y provocando una menor acumulación de lípidos intracelularmente [524].

En este escenario, es necesario considerar el contenido de AG de las TRL como uno de los mayores determinantes del perfil aterogénico de estas partículas. La composición lipídica de las TRL depende del tipo de grasa ingerida con la dieta, pues de ella derivan las nuevas partículas sintetizadas [526]. La mayoría de los lípidos ingeridos con la dieta tienen la forma de TG, que

constituyen más del 90% de la ingesta diaria de grasas. Los TG son absorbidos por el organismo con una eficiencia muy elevada y transportados por el torrente sanguíneo, principalmente por los QM.

Uno de los objetivos propuestos en el presente estudio fue evaluar el efecto que ejerce el grado de saturación de los AG incorporados en las TRL tras el consumo de los dos tipos de desayunos experimentales sobre la capacidad de los macrófagos de incorporar su contenido lipídico. Pero previo a ello, fue necesario caracterizar la composición de AG de los lípidos presentes en las TRL aisladas de los participantes del ensayo. De esta manera se estudiaría la capacidad de incorporación de los AG de la dieta en las nuevas partículas TRL sintetizadas durante el periodo postprandial, analizando el porcentaje total de SFA o MUFA en ellas, y verificando si su perfil lipídico es un reflejo de la composición lipídica de la grasa de la que derivan. Para tal fin, se extrajo el contenido lipídico de las TRL aisladas en ayunas (0 horas) y a las 2 y 4 horas del periodo postprandial, se separó la fracción de TG de la de FL, y se caracterizó por CG el contenido de AG en las dos fracciones lipídicas. Antes de proceder con el análisis de los resultados, era importante considerar que en ayunas, debido a los bajos niveles de QM en circulación y con el fin de satisfacer las necesidades energéticas de los tejidos, la síntesis de VLDL se ve incrementada, predominando por tanto este tipo de lipoproteínas. Las VLDL transportan TG cuyo contenido de AG es de origen endógeno, sintetizados en el hígado, por lo que no son un reflejo de la dieta inmediatamente consumida, como lo son los QM. En contra, las TRL correspondientes a las 2 y 4 horas del periodo postprandial contienen las nuevas partículas de QM sintetizadas y sus remanentes que, a pesar de que no exceden el 10% del número de partículas de VLDL en circulación [527], el 90% de su peso corresponde a AG procedentes de los TG de la dieta, y el 80% en los QM remanentes [528]. Por este motivo, deberían ser las TRL aisladas a las 2 y 4 horas del consumo de los desayunos la que muestren entre sí las mayores diferencias en los niveles de SFA y MUFA.

Las determinaciones realizadas para el estudio de la composición de las TRL se llevaron a cabo en las muestras de sangre extraídas en ayunas (0 horas), y 2 y 4 horas después la ingesta de la comida experimental. Estos tiempos fueron elegidos en base a estudios previos, en los que se observaron los niveles más representativos de concentración de TG en suero a estas horas [529]. El perfil de AG de los TG fue similar en las TRL aisladas en ayunas (0 horas) antes de comenzar con los ensayos postprandiales de tipo mediterráneo y de tipo occidental tanto en el grupo de sujetos normopeso como en el de obesos. Además, la composición observada fue muy parecida

entre los dos grupos que participaron, indicando que en ayunas, los individuos obesos muestran partículas con aparentemente el mismo grado de aterogenicidad que los sujetos de peso normal. De modo que cualquier diferencia en el contenido de AG posterior a la ingesta de alimentos (2 y 4 horas) sería a causa de la incorporación de los lípidos de la dieta u otros factores que tengan lugar durante el proceso de síntesis y catabolismo de nuevas partículas de TRL. Efectivamente, se observó que las TRL derivadas de la ingesta del aceite de oliva presente en el desayuno de tipo mediterráneo, aisladas a las 2 y 4 horas del periodo postprandial en el grupo de individuos normopeso, presentaban un contenido de MUFA totales significativamente elevado en los TG, en comparación con aquellas derivadas de la mantequilla que fue consumida con el desayuno de tipo occidental. El responsable de ello fue la alta incorporación de ácido oleico en los TG después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo, especialmente a las 4 horas del periodo postprandial. Por otro lado, la ingesta del desayuno de tipo occidental causó el incremento de la concentración de SFA en los TG. Entre ellos, los AG que sufrieron una especial elevación del porcentaje que constituyen en los TG con respecto al resto de AG fueron los ácidos mirístico y palmítico, así como el ácido esteárico, aunque éste de forma más discreta. El perfil de AG en los TG de las TRL procedentes de los sujetos normopeso parece por tanto reflejar el contenido de AG de la fuente lipídica de la que derivan. Cabe destacar la progresiva incorporación de PUFA n-3 observada en las partículas tras la ingesta de los dos tipos de desayunos, aun cuando estos AG apenas superan el 1% del total de AG que componen el aceite de oliva, e incluso menos en la mantequilla, siendo además tal incremento significativo en los TG de las TRL aisladas 4 horas después de consumir el desayuno occidental, alcanzando casi el 4% del total en las partículas. En el estudio realizado por Botham et al.[519], donde caracterizaron QM derivados de la ingesta de mantequilla, aceite de palma y aceite de oliva en los que tampoco había presencia alguna de PUFA n-3, observaron que AG como EPA y docosahexanoico (DHA), constituían al menos el 2% de los AG totales en todos los QM derivados de esas fuentes de grasa [526]. En nuestro caso, fueron los ácidos  $\alpha$ - y  $\gamma$ -linolénico los que se vieron elevados de forma muy significativa y sólo en las partículas derivadas del consumo de la mantequilla.

Recientes estudios han mostrado que la elevación inicial de lípidos plasmáticos secretados en los primeros 10-30 minutos tras la ingesta de una comida con contenido graso, y antes de que tenga lugar el primer gran pico de TG plasmáticos entre las 2-4 horas del periodo postprandial, corresponde a lípidos consumidos en una comida anterior [530]. Cada vez está más documentado que no todos los productos de la digestión, una vez absorbidos por los enterocitos y re-esterificados a TG son directamente empaquetados en QM para ser secretados y transportados

a través del torrente sanguíneo. Los AG de la dieta también pueden asociarse formando vesículas lipídicas citoplasmáticas (CLDs) para su almacenamiento temporal en el citoplasma de los enterocitos [75], principalmente en respuesta al consumo de alimentos con un alto contenido graso, protegiendo así a los enterocitos de la toxicidad generada por un exceso de AG, y controlando a su vez el ratio de síntesis y secreción de QM. Esos lípidos almacenados en último término serán movilizados de las CLDs en los enterocitos pudiendo servir como sustrato para la síntesis de nuevos TG y otros lípidos complejos (FL y EC) y ser destinados a formar parte de las lipoproteínas o síntesis de membranas [531]. Aunque aún no ha quedado del todo claro el porcentaje que constituyen en las nuevas partículas, un experimento *in vivo* realizado en ratas logró demostrar que una elevada proporción de los TG constituyentes de los QM procedían de las CLDs [532]. Este fenómeno podría explicar el origen de los PUFA n-3 incorporados en las TRL aisladas tras el consumo de las dietas experimentales. Además, se observó que el grupo normopeso de nuestro estudio incorporó una cantidad de PUFA n-3 de origen endógeno significativamente superior después de la ingesta del desayuno rico en SFA. Esta observación podría indicar que, en personas con un peso normal, el grado de saturación de las grasas que se ingieren influyen en el ratio de lipólisis de los TG almacenados en los enterocitos para la posterior incorporación de PUFA en las nuevas partículas de TRL sintetizadas. Sin embargo, no se han encontrado estudios que lo confirmen. Esta respuesta detectada en los individuos normopesos al consumo de alimentos con alto contenido de SFA podría ser un mecanismo de defensa, para reducir los efectos proaterogénicos que resultan de la formación de nuevos QM con un elevado contenido de SFA, compensándolo con las propiedades cardioprotectoras atribuidas a los PUFA n-3 [533, 534]. O bien, y en sintonía con lo obtenido por Botham et al. [519], que existe un requerimiento mínimo y específico de PUFA n-3 en la formación de QM, y que los enterocitos son capaces de proporcionar tales necesidades gracias al almacenaje de lípidos en su citoplasma. Esto indicaría otro rol esencial para este grupo particular de AG.

En respuesta al consumo de las dos dietas experimentales por parte de los individuos obesos, el perfil de AG caracterizado de los TG contenidos en las TRL aisladas de este grupo fue el mismo al observado en el grupo normopeso a las 2 y 4 horas del periodo postprandial. Además, también se observó el progresivo incremento en el contenido de PUFA n-3 totales en las partículas tras la ingesta de las dos dietas experimentales, aunque sin que hubiese en este caso diferencias significativas entre desayunos. Existen estudios *in vivo* realizados con ratones en los que se ha observado que el metabolismo intestinal de las CLDs se encuentra alterado debido a la obesidad. De hecho, tras el consumo de una comida con alto contenido graso, a pesar de que los

ratones obesos almacenaron mayor cantidad de TG en las CLDs que los ratones delgados, después de 6 horas de ayunas ambos grupos experimentales presentaron el mismo contenido en sus almacenes de TG. El ratio y cantidad de TG almacenados era similar en ratones obesos y delgados, incluso tras el consumo de dietas con bajo contenido graso [531], lo que es consistente con otros estudios realizados en humanos [535]. Ello parece sugerir que en sujetos con obesidad podría haber una mayor transferencia de lípidos a los nuevos QM, de ahí que independientemente del consumo de un desayuno u otro, la cantidad de PUFA n-3 incorporada fuera similar. Además, si existe una mayor transferencia de lípidos a las partículas de nueva formación, eso significaría que las partículas liberadas al torrente sanguíneo serían por tanto de mayor tamaño. Entonces, la incorporación de PUFA n-3 endógenos podría ir más encaminada a funciones mecánicas, colaborando con el mantenimiento estructural de las partículas que transportan una carga lipídica más elevada.

Al igual que se observó la incorporación de AG endógenos en los TG transportados por las nuevas partículas de QM, también pudo apreciarse el catabolismo que sufrieron las TRL aisladas de los dos grupos experimentales durante el periodo postprandial. Las partículas aisladas después de consumir las dos comidas, mostraron una progresiva reducción en la concentración de los PUFA n-6 totales que componen los TG, siendo su contenido menor en aquellas aisladas a las 4 horas del periodo postprandial y sin que hubiese diferencias significativas entre desayunos. La utilización de los TG plasmáticos transportados por las TRL a lo largo de su recorrido por el torrente sanguíneo es dependiente de la LPL localizada en el endotelio capilar, liberando así AG que podrán ser incorporados por los tejidos [78, 79]. Los AG han demostrado ejercer efectos regulatorios en la LPL mediante cambios en su expresión, además de competir entre ellos por los sitios de unión de la enzima [537]. De hecho, las moléculas de TG enriquecidas en ácido oleico (MUFA) han resultado ser más eficientemente hidrolizadas que aquellas que contienen ácido palmítico (SFA) [538]. Además, algunos estudios han sugerido que son los PUFA de cadena larga los que parecen potenciar más que ningún otro la actividad de la LPL y la afinidad de unión de las TRL a la enzima en el periodo postprandial [539], siendo así la LPL más reactiva [540], aunque Jinno et al. han mostrado precisamente lo contrario [524]. Nuestros resultados coinciden con lo expuesto por Park et al. [539], pues fue el contenido total de PUFA, aunque en concreto solo los de PUFA n-6, el que se vio reducido a lo largo del periodo postprandial en las TRL aisladas. En cambio, los resultados obtenidos por Jinno et al. [524] indicaron que los PUFA de los TG transportados por las TRL son más resistentes a la hidrólisis ejercida por la LPL [524]. Sin embargo, su estudio hacía referencia a la LPL expresada en macrófagos. La regulación de la

LPL es específica de tejidos, y su acción puede ser modulada tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional mediante diferentes mecanismos que suprimen su actividad o bien la incrementan en función de su localización [541]. Por ello, es posible que los PUFA de los TG sean más afines a la hidrólisis por la LPL en unos lugares, mientras que ejerzan el efecto contrario en otros. Se ha establecido que la LPL se expresa ampliamente en tejidos como el adiposo y muscular que requieren grandes cantidades de AG para su almacenamiento o como suministro energético [536]. En este caso, los PUFA n-6 cuyo contenido se vio particularmente reducido en los TG de las partículas aisladas de los dos grupos experimentales fueron los ácidos linoleico y araquidónico, AG de cadena larga que proporcionan elevados niveles de energía, además de ser importantes para la síntesis de membranas. Eso parece sugerir que la mayor afinidad de la LPL por estos AG durante la circulación de las TRL por los vasos sanguíneos sea para satisfacer los requerimientos de este tipo de células.

El consumo de las dos comidas experimentales por parte del grupo normopeso, no generó cambios importantes en la composición de AG de los FL extraídos de las TRL aisladas en el periodo postprandial con respecto a las aisladas en ayunas. Análisis cuantitativos han mostrado que los FL transportados por los QM constituyen tan solo el 5-12% del total de lípidos [531]. Aunque algunos son de nueva síntesis, con AG procedentes de la dieta que han sido sometidos a varias reacciones enzimáticas en el RE del enterocito, en su mayoría proceden de FL endógenos almacenados en los CLDs. Debido a ello, los cambios en la composición de AG de la fuente de grasa de las comidas no se ven reflejados en esta clase de lípidos. No obstante, una vez más, el porcentaje de PUFA que contienen se vio elevado después de que los individuos normopesos consumieran el desayuno occidental. A diferencia de lo presenciado en los TG, en este caso fueron PUFA n-6, y ese incremento tuvo lugar en la hora 2 del periodo postprandial. Esto podría corresponder de nuevo a FL que han sido liberados de las CLDs e incorporados en las nuevas partículas, como sucedió con los TG, por la influencia de la carga elevada de SFA de la dieta. Finalmente, con respecto a la composición de AG de los FL procedentes de las TRL aisladas de los sujetos obesos, los mayores cambios fueron observados en respuesta a la ingesta de las dos comidas experimentales a las 4 horas en el grupo obeso. Tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo, hubo un incremento significativo de los MUFA totales en los FL, así como una elevada incorporación de SFA después de que ingiriesen el de tipo occidental. Por lo que parece, la carga grasa de la dieta también se ve en cierta medida reflejada en los FL de las TRL procedentes del grupo obeso.

Ante los resultados observados en las personas normopeso podría sugerirse por un lado que, la nueva carga de grasa procedente de los alimentos ingeridos es incorporada en las nuevas TRL sintetizadas únicamente en forma de TG; y por otro, que también existen cambios en la composición de las partículas fruto de la incorporación de lípidos almacenados en los enterocitos de comidas anteriores. Y por parte de las TRL procedentes de los individuos obesos, además de transportar los lípidos absorbidos de la dieta en forma de TG, podría sugerirse que en este grupo de personas, los AG procedentes de la comida también son incorporados en los FL de las nuevas partículas formadas tras sufrir varios procesos de re-esterificación. Esto podría indicar que si se padece de obesidad, el contenido graso de la dieta adquiere aún más importancia sobre la composición de AG de las TRL y, en consecuencia, sobre su perfil aterogénico, que si se tiene un peso corporal normal.

#### 4. INFLUENCIA DE LAS LIPOPROTEINAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS POSTPRANDIALES EN LA FORMACIÓN DE CÉLULAS ESPUMOSAS Y CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO INTRACELULAR DE MACRÓFAGOS TRAS LA INCORPORACIÓN DE LAS PARTÍCULAS

**C**omo ya ha sido demostrado por la comunidad científica, no todas las TRL son captadas por los macrófagos de la misma manera, y otro de los factores determinantes de este proceso, además de la composición lipídica de las partículas, es su tamaño [359]. En un trabajo previamente realizado por nuestro grupo de investigación, se identificó la hora 2 del periodo postprandial como el momento en el cual las TRL presentan la mayor concentración de TG en las partículas [542]. Las TRL poseen una molécula de apo B por partícula, por lo que el ratio TG/apo B ha sido empleado como un método conveniente para estimar el tamaño de las partículas. Una estimación del tamaño de partícula mediante los ratios TG/apo B-100 y TG/apo B-48 indicó que el tamaño de las TRL sufría una reducción progresiva en el tiempo después del consumo de las comidas, siendo el ratio más elevado, y por tanto el mayor tamaño de partícula, a las 2 horas, y el menor a las 6 horas. Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio previo mostraron que la mayor incorporación de TG por parte de los macrófagos tuvo lugar cuando las células fueron incubadas con las TRL obtenidas a las 4 horas de la ingesta de la comida, lo que correspondía con las partículas cuyo tamaño era intermedio (30-100 nm).

La composición de los AG de la dieta ha demostrado también ser importante en la determinación del tamaño de las TRL postprandiales. Mekki et al. [543] mostraron que el consumo de mantequilla daba lugar a QM en circulación de menor tamaño, en comparación con las derivadas del AOV o aceite de girasol, lo que fue posteriormente corroborado por Pérez-Martínez et al. [443]. Como ya ha sido explicado en la introducción del presente estudio, en el proceso de formación de las TRL, las gotículas de lípidos ricas en TG que se forman durante el estado postprandial, se fusionan con lipoproteínas inmaduras que contienen apo B-48 mediante la actividad de la MTP. En este contexto, los resultados de Van Greevenbroek et al. revelaron que los AG insaturados, especialmente el ácido oleico, son incorporados en las lipoproteínas más eficientemente por la MTP [544]. Eso explicaría el mayor tamaño que presentan las nuevas partículas de QM sintetizadas tras la ingesta de una dieta rica en AOV. El número de partículas en circulación también se ha visto alterado en función del tipo de grasa consumida. La ingesta de

AOV ayuda a reducir el número de nuevas partículas sintetizadas, aunque de un tamaño mayor, en comparación con las comidas que contienen mantequilla como principal fuente de grasa, en cuyo caso la respuesta de QM es exacerbada [443]. No obstante, existe cierta controversia al respecto, pues los datos de Mekki et al.[543] muestran que es la ingesta de una comida que contiene mantequilla la que reduce la lipemia postprandial y la acumulación de QM en circulación, en hombres jóvenes y sanos.

De acuerdo con lo establecido, dado que las TRL aisladas de la hora 4 del periodo postprandial son las que presentan el tamaño óptimo para ser internalizadas por los macrófagos, estas partículas reflejarían mejor que ninguna el impacto de la grasa de la dieta sobre la capacidad de las TRL para transformar los macrófagos en células espumosas. Además, las TRL aisladas en ayunas (0 horas) no transportan los lípidos de la dieta, por lo que son útiles como control. Esta razón nos llevó a seleccionar los cultivos celulares incubados con estas partículas (las aisladas a las 0 y 4h) para estudiar la formación de células espumosas mediante la tinción de los lípidos intracelulares incorporados con aceite rojo O. Las imágenes obtenidas con el microscopio lograron mostrar que las TRL-4h procedentes de los sujetos normopeso derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo no provocaron una excesiva acumulación intracelular, generando células espumosas con una carga lipídica muy similar a las TRL-0h. Por el contrario, las que derivaban del consumo del desayuno de tipo occidental, fueron responsables de una mayor incorporación de lípidos por parte de los macrófagos. Estos resultados coinciden con los de Pascale et al., quienes apreciaron una mayor acumulación lipídica en macrófagos cuando las partículas artificiales que produjeron estaban enriquecidas en SFA frente a las que contenían un mayor contenido de MUFA [358]. Una posible explicación podría ser el mayor tamaño que presentan las partículas derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo gracias a la mayor afinidad de MTP por los MUFA, dificultando la internalización de los lípidos por las células. También podría sugerirse que el elevado contenido de SFA de las partículas que se han formado con el consumo del desayuno occidental es responsable de una mayor afinidad de las TRL por los receptores celulares, la principal vía de incorporación, o bien de incrementar sus niveles de expresión, aunque este aspecto será discutido más adelante.

Los estudios que han investigado el efecto del contenido de PUFA de las TRL sobre la formación de células espumosas han proporcionado resultados algo contradictorios. Por un lado, previamente se ha observado que partículas artificiales sintetizadas con un elevado contenido de PUFA causan menor acumulación de lípidos que aquellas enriquecidas en MUFA o SFA [358];

mientras que otros trabajos de investigación como el realizado por Quintero-Florez et al. [298] han mostrado que son las CRLP con alto contenido de PUFA las que causan mayor acumulación lipídica que las CRLP ricas en MUFA. Como se ha comentado, las TRL derivadas del consumo del desayuno occidental y aisladas del grupo normopeso, incorporaron PUFA n-3 endógeno de manera significativa, y se sugirieron dos posibles razones: la primera, que podría ser para contrarrestar el carácter aterogénico del elevado contenido de SFA procedente del desayuno de tipo occidental, y la segunda, por motivos estructurales. En las imágenes tomadas de los lípidos intracelulares no parece apreciarse una reducida formación de células espumosas cuando los macrófagos fueron incubados con estas partículas, esto podría deberse a que la concentración de PUFA n-3 totales que contienen no es suficiente para reducir su captación por las células, o bien que tan solo tengan una función meramente estructural. De acuerdo con los resultados obtenidos por Quintero-Florez et al. [298], la presencia de PUFA parece de hecho estar colaborando en la captación de las partículas por los macrófagos, potenciando aún más el efecto aterogénico del consumo del desayuno de tipo occidental por la población normopesa, por lo que habría que descartar el posible papel cardioprotector.

En los cultivos celulares incubados con las TRL-4h aisladas del grupo obeso, el panorama fue diferente ya que, independientemente de cual fuese la fuente de grasa de la que derivasen las partículas, en ambos casos la incorporación lipídica al espacio intracelular de los macrófagos fue exacerbada, formándose gotículas rebosantes de lípidos de gran tamaño. Al igual que sucedió con las partículas procedentes del grupo normopeso, ya se sospechaba que se fuera a obtener dicho resultado con las TRL derivadas del consumo de la mantequilla, ricas en SFA. En contra, no se esperaba obtener la misma respuesta con las TRL derivadas del consumo del aceite, las cuales tenían una mayor concentración de MUFA pues, de acuerdo con lo que mostraron De Pascale et al. [358], debería haber una menor incorporación de lípidos al interior de las células.

Previamente ha sido demostrado también por nuestro grupo de investigación que la incubación *in vitro* de macrófagos THP-1 con TRL aisladas durante el periodo postprandial provoca un significativo incremento en la concentración intracelular de TG, pero no causó ningún efecto en la acumulación celular de colesterol libre y EC. Esos resultados sugirieron por tanto que la captación de las partículas de TRL por parte de los macrófagos THP-1 induce la formación de células espumosas principalmente debido a la acumulación intracelular de TG y no de EC [542]. En el presente estudio se comparó la composición de AG de los TG intracelulares de los macrófagos THP-1 control (-TRL) con la composición obtenida después de que las células

fueran incubadas con las TRL aisladas de los participantes del estudio. Esto permitiría evaluar la modulación del contenido de TG intracelular en los macrófagos tras la incorporación de las partículas. Además, se observó que fue cuando los cultivos celulares se incubaron con las TRL aisladas a la hora 4 del periodo postprandial cuando el contenido lipídico intracelular reflejaba de forma más aproximada el contenido lipídico de las TRL, tanto con las procedentes del grupo obeso como del normopeso. Este hecho confirmaba que fueron las TRL-4h las que partículas captadas con mayor eficacia por los macrófagos.

En la composición de los TG intracelulares caracterizada de los cultivos control (-TRL) detectamos que el 50% del total de los AG estaba constituido por SFA, estando tal porcentaje representado casi en su totalidad por los ácidos palmítico y esteárico. Este contenido apenas varió cuando los macrófagos se incubaron con las TRL aisladas de los individuos normopesos en ayunas y a las 2 horas después de ingerir cualquiera de las dos dietas experimentales, pero sí lo hizo con las TRL-4h, demostrando una vez más que son las aisladas en ese momento temporal las captadas con mayor eficacia [542]. Las TRL aisladas 4 horas después del consumo del desayuno de tipo mediterráneo, redujeron significativamente el porcentaje de SFA total contenido en las células, disminuyendo de forma importante el contenido de los dos SFA mayoritarios, los ácidos palmítico y esteárico. Por el contrario, a pesar de la eficiente captación de las partículas procedentes de la hora 4 por las células y de su mayor contenido de MUFA, no hubo cambios importantes en la concentración intracelular de MUFA con respecto a las células control (-TRL). No obstante, fue significativo el crecimiento del contenido intracelular de ácido oleico a causa de la incorporación de las TRL-4h derivadas del consumo de aceite de oliva. El porcentaje de ácido oleico alcanzó un nivel similar al contenido en las propias partículas. Llamó especialmente la atención el acusado incremento del contenido de los PUFA n-6 totales constituyentes de los TG intracelulares, y en particular el del ácido linoleico, tras la incubación de los macrófagos con las TRL aisladas en la hora 4 del periodo postprandial derivadas del consumo de los dos tipos de desayuno. Estos valores llegaron incluso a superar el doble del contenido original de los cultivos control, y reflejaron de nuevo el porcentaje de PUFA n-6 presente en las TRL, constituyendo otra prueba de la masiva captación de partículas procedentes de la hora 4. Apenas existen estudios realizados en los que se haya caracterizado el contenido lipídico intracelular en macrófagos después de que fueran incubados con TRL. No obstante, Quintero-Florez et al. [298] experimentaron algo similar cuando incubaron los macrófagos THP-1 con las CRLP que contenían la mayor concentración de ácido oleico, pues detectaron que esas células eran las que acumulaban la mayor cantidad de ese mismo AG, preservando el contenido

de AG de los TG transportados por las CRLP.

Cuando los cultivos de macrófagos fueron incubados con las TRL procedentes de los sujetos obesos, se observó que no solo las TRL-4h provocaron modificaciones en la composición intracelular de AG con respecto a las células control (-TRL) como se vio con las procedentes del grupo normopeso, sino que las partículas aisladas en ayunas (0 horas) también lo hicieron. A pesar de ello, fueron de nuevo las de la hora 4 del periodo postprandial las que indujeron los cambios más significativos, reflejando a su vez unos porcentajes de AG intracelulares más aproximados a los presentes en las partículas. Con respecto a las modificaciones causadas en el contenido intracelular total de SFA, MUFA, y PUFA tras la incubación de los macrófagos con las TRL-4h, éstas no mostraron grandes diferencias con respecto a las descritas con las partículas derivadas de los sujetos normopeso.

Ante los resultados expuestos, podrían extraerse varias conclusiones. La preservación del contenido de AG de los TG presentes en las TRL aisladas después del consumo de las comidas en el grupo normopeso y obeso en el contenido lipídico intracelular de los macrófagos, tiene lugar especialmente cuando las células son incubadas con las partículas aisladas en la hora 4 del periodo postprandial. Coincidiendo con la literatura científica, esto indica que son éstas las partículas captadas por los macrófagos con mayor eficiencia, causando por tanto una mayor formación de células espumosas [542]. Sin embargo, el contenido intracelular de los macrófagos que fueron incubados con las TRL procedentes de los obesos en ayunas también preservó el contenido de AG de las partículas, aunque no tan fielmente como con las TR-4h. Precisamente, se observó mediante las imágenes tomadas con el microscopio de los lípidos intracelulares, que estas partículas causaban células espumosas con un contenido más alto de lípidos que las procedentes de los normopesos. Esto parece indicar que las TRL que se encuentran en circulación durante el estado de ayunas en las personas con obesidad, también pueden ser captadas por los macrófagos de la misma manera, aunque en menor grado, que las TRL de la hora 4 del periodo postprandial, cosa que no ocurre con las TRL del grupo de peso normal a pesar de tener una composición lipídica equivalente. Como ya se ha indicado previamente, el grupo de sujetos obesos del presente estudio mostraba elevados niveles de glucosa plasmática en ayunas. Las reacciones de glucosilación que tienen lugar por acción de la glucosa, han sido asociadas con el desarrollo de ECV en personas diabéticas [545], y se ha demostrado que la glucosilación *ex vivo* de lipoproteínas induce la acumulación intracelular de lípidos en macrófagos [546]. Adicionalmente, como ha sido previamente mencionado, la glucosa ejerce un

efecto estimulador sobre la actividad de la LPL, ya que la glucosilación de la enzima es esencial para su actividad catalítica [536], colaborando por tanto a la incorporación de AG libres por la hidrólisis de los TG transportados por las TRL incluso en ayunas. Este podría constituir uno de los motivos por los que las TRL aisladas en ayunas en los individuos obesos son captadas más eficientemente por los macrófagos que aquellas aisladas del grupo normopeso. Asimismo, los elevados niveles de TG plasmáticos que presentan también en ayunas las personas obesas podrían a su vez ser responsables de que las TRL en circulación, sin que haya ingesta de alimentos, presenten de por sí un tamaño de partícula similar al que tienen 4 horas después de ingerir una comida, esto es, ni tan grande como las TRL nacientes (150-1000 nm en diámetro) ni tan pequeñas como las partículas LDL-remanentes (26-50 nm en diámetro) [37]. Esto no parece ocurrir en las personas normopesas, con unos niveles de trigliceridemia normal en ayunas. Con respecto a las diferencias encontradas en la composición lipídica intracelular de los macrófagos tras su incubación con las TRL aisladas de personas normopeso y obesas, podría sugerirse que las sintetizadas por los obesos tras el consumo del desayuno de origen occidental conducen a un perfil lipídico intracelular más aterogénico al provocar el incremento significativo del contenido total de SFA y la reducción de los niveles de MUFA con respecto al obtenido con las partículas derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo.

Todo lo expuesto invita a sugerir que el consumo de alimentos con un alto porcentaje de SFA por personas obesas, aumenta las propiedades aterogénicas de sus TRL. En contra, cuando son los individuos normopeso los que consumen el desayuno de tipo mediterráneo, con aceite de oliva como principal fuente de grasa, ello colabora a que los macrófagos reduzcan su contenido de SFA significativamente mediante la incorporación de TRL que inducen un perfil lipídico intracelular menos aterogénico.

## 5. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS RECEPTORES CELULARES DE SUPERFICIE IMPLICADOS EN LOS PROCESOS DE CAPTACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS POR MACRÓFAGOS

Los macrófagos son componentes celulares esenciales en el sistema defensivo de nuestro cuerpo, ya que participan tanto en la respuesta inmunitaria innata como en la adquirida. Pero, a pesar de que las funciones del sistema inmunológico están principalmente destinadas a la protección del huésped frente a microorganismos invasores, también adquieren un peso importante en los mecanismos a través de los cuales células inmunológicas como los macrófagos contribuyen al inicio y progresión de la aterosclerosis.

Comprender las vías responsables de la acumulación de lípidos en los macrófagos es uno de los factores a tener en cuenta para poder interferir en el proceso de formación de células espumosas y poder detener o prevenir el desarrollo de la aterosclerosis. Investigaciones realizadas con modelos animales hiperlipidémicos han establecido que, aunque existen medios alternativos que colaboran en el proceso de formación de células espumosas [109], el mecanismo de internalización de las TRL mediada por los receptores celulares de superficie de elevada afinidad es la vía de mayor importancia en los macrófagos *in vivo* [107, 108].

En el presente trabajo, la distinta composición de AG de las TRL aisladas después de que los individuos normopesos y obesos consumieran los dos tipos de desayunos experimentales, generó a su vez un diferente contenido lipídico en los macrófagos THP-1 cuando incorporaron las partículas. Uno de los objetivos propuestos fue evaluar si el contenido lipídico de las TRL es capaz de modular los niveles de expresión de los receptores de superficie. Para ello, tras el tratamiento de los macrófagos con las TRL aisladas en ayunas y durante el periodo postprandial, se cuantificaron los niveles de expresión génica relativa de varios receptores de superficie de macrófagos: receptores dependientes de apo E, e independientes de apo E o receptores scavenger (SR).

Se encontró una serie de importantes diferencias y/o limitaciones que hubo que considerar a la hora de comparar nuestros resultados con los encontrados en la literatura

científica. En primer lugar, los trabajos realizados acerca de la capacidad de las grasas de la dieta para modular los niveles de expresión de los receptores de superficie han sido en su mayoría desarrollados tras un periodo de intervención de semanas o meses. Por el contrario, en el presente estudio, la respuesta génica fue analizada durante las cuatro primeras horas del periodo postprandial, tras el consumo de una comida puntual. Y en segundo lugar, casi todos los trabajos desarrollados con líneas celulares humanas, han sido realizados *in vivo* empleando PBMCs aisladas de los propios sujetos participantes de sus estudios. En contra, nuestros ensayos *in vitro* se realizaron con la línea celular de monocitos THP-1, diferenciados posteriormente a macrófagos.

La familia de receptores LDLR ha sido identificada como el grupo de receptores que más contribuye a la incorporación de lipoproteínas por los macrófagos, debido a la gran afinidad que tienen para interactuar con las TRL mediante el reconocimiento específico de sus apolipoproteínas. LDLR reconoce apo B-100, mientras que VLDLR y LRP-1 son dependientes de apo E [115]. Puesto que las TRL y sus remanentes están muy enriquecidas en apo E, LRP-1 y VLDLR adquieren un peso importante en el proceso de incorporación de partículas aterogénicas y en la formación de células espumosas, pues es a través de estos dos receptores por los que las TRL son principalmente incorporadas en macrófagos [52, 115]. No hay duda de que la modulación de los niveles de expresión de estos receptores proporcionaría una excelente manera para prevenir el desarrollo de la aterosclerosis.

Existen estudios que muestran la capacidad del AOV para influir sobre los niveles de expresión de la familia de receptores LDLR. Un ejemplo de ellos es el sub-estudio del ensayo PREDIMED realizado por Llorente-Cortes et al. [226]. En él se investigó, mediante experimentos *in vitro*, el efecto de consumir una dieta al estilo mediterráneo enriquecida con AOV sobre la modulación de una serie de genes proaterotrombóticos en una población obesa con elevado riesgo cardiovascular. Tras un periodo de intervención nutricional de tres meses, observaron que la ingesta del AOV con la dieta logró evitar de manera específica la sobreexpresión del gen que codifica LRP-1 en cultivos de monocitos derivados a macrófagos [226]. Estos resultados fueron posteriormente corroborados por otros grupos [361]. El receptor LRP-1, además de ser uno de los más importantes en la formación de células espumosas [547], es clave en la transformación protrombótica de la pared vascular [548] y de la capacidad migratoria de las células vasculares [549]. De modo que, previniendo la sobreexpresión de LRP-1, el AOV estaría influenciando en algunos de los mecanismos más importantes involucrados en

la aterotrombosis. Sin embargo, Llorente-Cortez et al. [226] no lograron demostrar un efecto significativo sobre los niveles de expresión de LDLR después del consumo prolongado de AOV frente a la ingesta de una dieta con bajo contenido graso. Otras investigaciones realizadas con animales como modelo de estudio sí han sido capaces de demostrar que el número de receptores LDLR disponibles para la interacción con lipoproteínas en circulación está directamente influenciado por el tipo de AG ingerido con la dieta, aunque no con el consumo de aceite de oliva. Hace ya un tiempo considerable, Mustad et al. [550] demostraron en cerdos, mediante una intervención dietética de alto contenido graso de 30 días de duración, el efecto de consumir los ácidos palmítico y linoleico sobre la abundancia proteica y los niveles de ARNm LDLR. Aunque en su caso estudiaron la expresión de LDLR en hepatocitos y no en macrófagos, observaron que existía una modificación a nivel transcripcional y traduccional en paralelo. Determinaron que el consumo de PUFA era responsable del incremento de LDLR, mientras que la ingesta de SFA provocaba una reducción en sus niveles de expresión y síntesis de proteínas. Posteriormente, el mismo grupo confirmó tales resultados en células mononucleares aisladas de hombres y mujeres sanos [374]. Otros grupos han coincidido con estos resultados, en estudios con animales realizados previamente, confirmando que la capacidad de los SFA ingeridos con la dieta para reducir la expresión de LDLR en hepatocitos de animales no primates alcanza el 30-50% [551, 552].

En contra de lo observado por Llorente-Cortez et al. [226], en el presente trabajo de investigación, la incubación de las TRL con los macrófagos THP-1 causó un inmediato efecto modulador en la expresión de LDLR. Se detectó una reducción de los niveles de transcripción del receptor LDLR con respecto a la cuantificada en los cultivos control (-TRL) en todos los casos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pocathikorn et al., quienes examinaron la influencia de una comida de alto contenido graso sobre la expresión de receptores celulares en el periodo postprandial, entre los que también se encontraba LDLR [553]. El motivo de esta diferencia en los resultados obtenidos por Llorente-Cortez et al. [226] con los nuestros y los de Pocathikorn et al. [553] podría radicar en que los primeros analizaron las variaciones en la expresión génica de los receptores tras una intervención dietética a largo plazo. Por el contrario, en nuestro estudio y en el de Pocathikorn et al. [553], la expresión de los receptores fue cuantificada inmediatamente después de la ingesta de la comida experimental. En nuestro trabajo, la reducción de la expresión de LDLR en macrófagos tuvo lugar tras su tratamiento con las partículas procedentes tanto del grupo normopeso como del obeso después de ingerir los dos tipos de desayunos, e indistintamente de la hora en la que fueron aisladas, en ayunas o durante el

periodo postprandial. No obstante, se pudo apreciar que la capacidad de los AG para modular la abundancia de ARNm LDLR fue más potente con las TRL procedentes del grupo normopeso. En ese caso, se observó una reducción de hasta casi 4 veces en comparación con los niveles de expresión del cultivo control. La expresión de LDLR en la superficie de los macrófagos está inversamente regulada por la concentración intracelular de colesterol [554]. Las TRL, con un alto contenido en TG, también transportan colesterol en la partícula. Es posible que la masiva incorporación de las mismas por los macrófagos esté saturando esta vía de entrada e inmediatamente se reprima la síntesis de LDLR, evitando así el continuo flujo de lípidos al interior de las células por medio de estos receptores y limitando su transformación a células espumosas. O bien, podría igualmente sugerirse que el mayor contenido de PUFA n-3 detectado solo en las partículas aisladas de los sujetos normopeso esté ejerciendo un efecto protector mediante una mayor reducción de la expresión de LDLR. En la sección anterior se comentó que las TRL aisladas a las 4 horas de la ingesta de las comidas fueron las que se incorporaron más eficientemente en los macrófagos, lo que coincide con las horas a las que se ha detectado una menor expresión relativa de ARNm LDLR. En cuanto al efecto causado por el diferente perfil de AG de las lipoproteínas derivadas del consumo de los dos desayunos experimentales, no se detectaron diferencias significativas sobre el nivel de síntesis de LDLR. Sin embargo, cuando el grupo obeso consumió el desayuno de tipo occidental, se observó que las TRL aisladas en un momento más avanzado del periodo postprandial tendían a estimular el incremento de los niveles de expresión de LDLR. En cambio, cuando consumieron el desayuno de tipo mediterráneo, la transcripción de LDLR tendía a ir reduciéndose progresivamente. Esto generó que las TRL-4h derivadas de los dos tipos de desayunos causaran unos niveles de expresión de LDLR diferentes, siendo significativamente menor con las partículas procedentes del desayuno de tipo mediterráneo.

En general, la expresión de LRP-1 en macrófagos tendió a reducirse durante las 4 horas del periodo postprandial tras su tratamiento con las TRL. Sin embargo, pudo apreciarse que las partículas derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo por el grupo normopeso causaron un nivel de expresión de LRP-1 mucho menor. Esta observación parece estar de acuerdo con lo detectado por Llorente-Cortes et al. [226], aunque en nuestro caso, y como ya se ha comentado, dicha reducción tuvo lugar tras el consumo de una comida puntual y no tras una intervención nutricional durante un tiempo prolongado. Las únicas partículas cuyo componente lipídico causó diferencias significativas en la abundancia de ARNm LRP-1 fueron las TRL-4h aisladas del grupo normopeso, siendo las formadas tras el consumo del desayuno de tipo

mediterráneo las que redujeron de forma significativa los niveles de transcripción de LRP-1. En contra, las TRL aisladas tras la ingesta del de tipo occidental por este mismo grupo, no parecieron alterar durante todo el periodo postprandial la expresión de LRP-1 en macrófagos. Esta respuesta observada en lo que respecta a LDLR y LRP-1 concuerda con lo que obtuvieron Pocathikorn et al. [553]. En ambos casos, se ha detectado una reacción inmediata de los niveles de ARNm de los receptores LDLR y LRP-1 a la ingesta una comida con alto contenido graso. Con los ensayos *in vitro* que realizaron Pocathikorn et al. [553] con células mononucleares en circulación, detectaron que los dos receptores experimentan una reducción en su expresión de forma similar pero que ésta tiene lugar antes con LDLR y, posteriormente, sobre LRP.

Se ha sugerido que la función de los receptores LDLR y LRP-1 en la internalización de lipoproteínas por las células debe ser complementaria [555]. Tras la inmediata saturación de LDLR, la actividad de LRP-1 contribuye a la incorporación de TRL y formación de células espumosas antes de verse también reducida por el incremento de la concentración lipídica intracelular. En nuestro estudio, el consumo del desayuno de tipo mediterráneo por parte de los sujetos normopeso parece prevenir esta relación colaborativa. Las TRL-4h ricas en MUFA aisladas de este grupo, además de inducir una acusada reducción de la expresión de LDLR en macrófagos, también reduce los niveles de expresión de LRP-1. Este efecto sin embargo no fue detectado cuando el grupo obeso consumió el desayuno de tipo mediterráneo. Al contrario, se observó que la ingesta del desayuno occidental por personas obesas parece potenciar la relación colaborativa LDLR-LRP1. El tratamiento de los macrófagos con las TRL ricas en SFA aisladas del grupo obeso causó un significativo incremento de la expresión de LDLR, mientras que la de LRP-1 no sufrió ninguna reducción. Este efecto sería confirmado en las imágenes tomadas de los macrófagos incubados con las TRL aisladas de las personas obesas tras el consumo del desayuno de tipo occidental. En ellas, el contenido lipídico intracelular observado fue especialmente elevado.

El alto contenido de SFA en las TRL pudo ser también responsable en algunos casos de inducir una importante reducción en los niveles de expresión del receptor VLDLR. Cuando las partículas fueron aisladas de los sujetos obesos 4 horas después de que consumieran el desayuno de tipo occidental, se detectó que la abundancia de ARNm VLDLR se redujo de forma significativa. Ese efecto no se detectó cuando las TRL derivaban del consumo del desayuno de tipo mediterráneo. VLDLR y LDLR pertenecen a la misma familia de receptores, pero incorporan TRL al interior de los macrófagos mediante el reconocimiento específico de

apolipoproteínas diferentes. Se ha podido observar que las TRL-4h con elevado contenido de SFA procedentes de los obesos no alteran la expresión de LDLR, pero sí reducen la de VLDLR, posiblemente de forma compensatoria. Puesto que las TRL ricas en SFA aisladas del grupo obeso elevaron la expresión de LDLR, eso indicaría que aún no se encuentra saturada esta vía de incorporación de lípidos y, por tanto, los niveles de expresión de VLDLR se reducen ya que su síntesis en cantidades elevadas no es aún necesaria. Por el contrario, el tratamiento de los macrófagos con las TRL procedentes de los sujetos normopesos provocó el efecto contrario sobre la expresión de VLDLR. Las partículas aisladas en la hora 2 del periodo postprandial tras el consumo del desayuno de tipo occidental elevaron de manera considerable los niveles de transcripción de VLDLR, aunque en ningún caso hubo una diferencia significativa con la expresión obtenida con las TRL derivadas del desayuno de tipo mediterráneo. Las TRL formadas 2 horas después de consumir una comida han sido identificadas como las que contienen el mayor porcentaje de TG en la partícula y, por tanto, las de mayor tamaño [542]. En este caso, es posible que el exceso de carga lipídica transportado por estas partículas haya causado la saturación del receptor LDLR, estimulándose el incremento de la expresión de VLDLR como mecanismo alternativo para seguir incorporando lípidos. Esto parece sugerir que según las TRL procedan del grupo normopeso u obeso, el comportamiento entre los receptores LDLR-VLDLR es diferente, y de hecho opuesto.

Los SR también han demostrado tener una elevada influencia en el desarrollo y estabilidad de la placa aterosclerótica. Este grupo de receptores representan una de las vías con mayor afinidad para la internalización de lipoproteínas modificadas químicamente en macrófagos como las LDL oxidadas, aunque también son capaces de interactuar con TRL nativas [120]. Esto ha quedado claramente demostrado para los SR de tipo A [127, 128]. Sin embargo, los informes encontrados en la bibliografía científica que conciernen al rol que ejerce el receptor CD36 en el progreso de la aterosclerosis son algo controvertidos. CD36, además de estar involucrado en la captación del 50-60% de oxLDL por macrófagos [128, 556], es crucial para el transporte de AG libres en adipocitos y células musculares [557]. Experimentos *in vitro* realizados con células del músculo liso tratadas con ácido oleico mostraron que la incorporación del AG al interior celular es dependiente de CD36, colaborando en la formación de células espumosas [558]. En contra, la deficiencia de CD36 también se ha asociado con una aceleración del desarrollo de la aterosclerosis. Varios estudios han sugerido que la ausencia de expresión de este receptor causaría una significativa elevación de los AG libres en el medio extracelular [559], además de provocar un mayor número de LDL modificadas en circulación. Esto incrementaría el

estrés oxidativo y proporcionaría un ambiente más aterogénico. De una manera u otra, CD36 parece tener un peso importante en la aterosclerosis. Sin embargo, paradójicamente, la función de CD36 también se ha relacionado con propiedades anti-aterogénicas. Se ha sugerido que la ausencia de expresión de CD36 alteraría no solo el estado metabólico de los macrófagos, sino también su estado inflamatorio. En estudios con ratones hiperlipidémicos que no expresan apo E, se ha observado un importante incremento del tamaño de las lesiones ateroscleróticas si la vía de incorporación mediada por el receptor CD36 se inactivaba [132].

El potencial del aceite de oliva para reducir los niveles de ARNm de los SR ha sido mostrado una vez más en varios estudios desarrollados en animales. Miles et al. [362] desarrollaron un estudio con ratones a los que les administraron una dieta con alto contenido de grasa con aceite de coco, de oliva o de cártamo durante 12 semanas. Después de ese periodo de intervención, detectaron que los niveles de ARNm de los genes que codifican SRA1, SRA2 y CD36 en los macrófagos eran significativamente diferentes en función del tipo de grasa consumida. Observaron que solo los macrófagos aislados de los ratones alimentados con una dieta rica en aceite de oliva redujeron los niveles de ARNm de SRA1, SRA2 y CD36 con respecto a la dieta control, y con ello, los depósitos de lípidos intracelulares. En desacuerdo con esos resultados, Llorente-Cortés et al. [226] no detectaron alteración alguna en los niveles de expresión de CD36 en las PMBCs aisladas de los participantes del estudio tras un consumo prolongado de AOV. Además, los resultados que mostraron han sido confirmados por otros trabajos realizados con células humanas, como el desarrollado por Konstantinidou et al. [361]. Esto parece indicar que los mecanismos de regulación génica responden de manera diferente a la capacidad de modulación de los AG en células animales y humanas.

De los tres SR analizados en el presente trabajo, SRA2, SRB1 y CD36, CD36 fue el que experimentó una alteración en sus niveles de expresión más acusada cuando los macrófagos se trataron con las TRL. La abundancia de ARNm SRA2 y SRB1 después de tratar los macrófagos con las TRL postprandiales sufrió tan solo una ligera reducción con las aisladas en la hora 4 del grupo normopeso. En el resto de los casos, el nivel de expresión de estos dos receptores se mantuvo similar al obtenido en los cultivos control (-TRL). Además, no se detectaron diferencias significativas en el efecto causado por el diferente perfil lipídico de las partículas aisladas en el periodo postprandial. Konstantinidou et al. [361] tampoco observaron una alteración en la expresión de SRB1 a lo largo del periodo postprandial tras administrarle a su población de estudio una dieta de tipo mediterráneo suplementada con AOV. En cambio, en el presente

estudio, sí se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de SRB1 causados por el tratamiento con las TRL aisladas en ayunas del grupo normopeso. Las TRL procedentes de los sujetos normopeso antes de consumir los dos tipos de desayunos experimentales presentaron la misma composición lipídica, además de causar una acumulación lipídica en macrófagos similar. Sin embargo, las que fueron aisladas antes de comenzar el ensayo postprandial de tipo occidental indujeron una importante reducción en el nivel de transcripción de SRB1. Esta observación podría indicar que la expresión de SRB1 está modulada a su vez por otros factores ajenos a la capacidad de modulación de los AG. En lo que respecta a SRA2, Miles et al. [362] obtuvieron un efecto reductor sobre su expresión por el consumo de AOV, aunque en su caso fue en macrófagos de ratones, mientras que Llorente-Cortez et al. [226] tampoco detectaron un efecto inmediato de la expresión de SRA2 a la carga grasa ingerida. Estos resultados confirmarían de nuevo la diferente respuesta a las grasas en la expresión génica entre células animales y humanas.

En este estudio se detectó que la expresión del receptor CD36, tal como sucedió con LDLR, se alteró por el tratamiento de los macrófagos con las TRL aisladas tanto en ayunas como en el periodo postprandial, de los dos grupos experimentales. Y nuevamente, nuestros resultados están en desacuerdo con lo mostrado por Llorente-Cortés et al. [226], quienes tampoco detectaron la alteración de CD36. Estas diferencias vuelven a poner de manifiesto que la ingesta a largo plazo de una dieta tiene un efecto distinto del que se observa de forma inmediata tras una comida. En los experimentos *in vitro* realizados en el presente estudio se observó un incremento en los niveles de expresión de CD36 en prácticamente todos los casos. En particular, fueron las TRL aisladas 2 horas después de que los dos grupos de participantes consumieran los desayunos experimentales las que causaron los niveles más elevados de ARNm CD36. Las TRL-2h presentan el mayor tamaño de partícula, y a las TRL-4h se les atribuye un tamaño intermedio [542], por lo que entre las 2 y 4 horas del periodo postprandial debe haber una alta liberación de AG debido a la hidrólisis de los TG que transportan. Los niveles de expresión de CD36 se incrementan mediante la influencia de los AG sobre los PPARs, y es posible que esa masiva liberación de AG esté modulando la actividad de estos reguladores transcripcionales. Se ha observado que una expresión elevada de PPAR- $\alpha$  coincide con una reducida expresión de CD36, mientras que la activación de PPAR- $\gamma$  induce una expresión elevada del receptor para el transporte de AG libres vía CD36 [560]. EPA y DHA han demostrado controlar la expresión de CD36, al inducir la supresión de su expresión mediante la inhibición de la actividad transcripcional de PPAR- $\delta$  en monocitos humanos [561], lo que fue confirmado posteriormente

con los resultados de Edwards et al. [562]. Sin embargo, los efectos moduladores de los AG son algo contradictorios en la literatura científica, ya que otros grupos como Vallvé et al. han obtenido el efecto contrario con PUFA [370]. Pocos han sido los estudios realizados para evaluar el efecto de SFA y MUFA sobre la regulación de PPARs. Esser et al. [563]. Llegaron a la conclusión de que el consumo de una comida con alto contenido en MUFA era capaz de incrementar la expresión de muchos genes diana de PPAR- $\alpha$  en hombres obesos y delgados. Además, experimentos previos *in vitro* y en modelos animales han demostrado que los AG insaturados de cadena larga son mejores ligandos de PPARs que SFA [564, 565], aunque, se ha visto que una dieta rica en ácido palmítico estimula igualmente la expresión de PPAR- $\delta$  en macrófagos [566]. Llegar a un consenso en cuanto al efecto modular de los AG sobre PPARs es por tanto algo complejo. Los niveles de expresión relativa de ARNm CD36 detectados en este estudio fueron significativamente más elevados cuando las TRL-2h aisladas de los individuos obesos transportaban un elevado contenido de SFA. En cambio, fueron las TRL-2h aisladas del grupo normopeso con un mayor contenido de MUFA las que indujeron una expresión superior del receptor CD36. Estos resultados parecen indicar que el consumo de la comida de tipo mediterráneo por parte de la población obesa estaría reduciendo el estado inflamatorio de los macrófagos al reducir la internalización lipídica, aunque por otro lado, una menor expresión de CD36 estaría reduciendo a su vez la retirada de partículas aterogénicas. En contra, el efecto es diferente cuando los individuos normopesos ingieren el desayuno de tipo mediterráneo, pues en su caso, el consumo de aceite de oliva estaría colaborando a reducir los elevados niveles de lipoproteínas y otras moléculas citotóxicas acumuladas en el interior de la arteria mediante el incremento en la expresión de CD36. Del mismo modo que sucedió con los niveles de expresión de LDLR y VLDLR, el efecto modulador de los AG sobre CD36 es contrario según las TRL procedan del grupo normopeso u obeso.

En términos generales, se ha observado que coincidiendo con el momento en el cual las TRL aisladas del grupo normopeso son incorporadas más eficientemente y causan los mayores depósitos de lípidos intracelulares (4 horas tras la ingesta), los niveles de expresión de los receptores celulares son los más bajos. Como se vio anteriormente, la internalización de las partículas formadas 4 horas después de consumir los dos desayunos experimentales causó una reducción de la concentración intracelular de SFA en macrófagos, pero solo las TRL aisladas tras la ingesta del de tipo mediterráneo incrementaron el contenido de MUFA. Fue precisamente con el incremento de la concentración intracelular de MUFA cuando se obtuvieron los menores niveles de ARNm de prácticamente todos los receptores celulares con las TRL procedentes de los

dos grupos de participantes del estudio. Es cierto que CD36 experimentó un incremento bastante significativo cuando los macrófagos fueron incubados con las TRL-2h derivadas del desayuno de tipo mediterráneo de los individuos normopeso, pero éste fue transitorio, y probablemente tuvo lugar para reducir el exceso de AG libres del entorno celular. De modo que el consumo del desayuno mediterráneo estaría proporcionando tanto a la población obesa como a la normopesa una actividad cardioprotectora al colaborar con la reducción de la formación de células espumosas. Además, se ha detectado el efecto perjudicial causado en las personas con obesidad cuando consumen el desayuno occidental, ya que induce un incremento significativo de la expresión de los receptores LDLR y CD36 durante el periodo postprandial, no detectado en los sujetos normopeso, colaborando así a la formación de células espumosas.

## 6. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEL COMPONENTE LIPÍDICO DE LAS LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS PARA MODULAR LA ACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEÍNA LIPASA DE MACRÓFAGOS

La enzima LPL ha sido asociada a funciones antiaterogénicas debido a su contribución en la reducción de los TG en circulación y la mejora del perfil lipídico. Sin embargo, también puede ejercer acciones proaterogénicas que incrementan el desarrollo de la aterosclerosis. Esta enzima, a parte de ser producida en órganos con alta demanda energética como corazón, músculos y tejido adiposo [80, 536], es producida en las lesiones ateroscleróticas por monocitos, macrófagos y células del músculo liso [83, 84]. El gen que codifica a la LPL se encuentra además entre los que más se expresan en los macrófagos [567], y la liberación de AG por la acción de la LPL que sintetizan puede constituir un potente estímulo proinflamatorio. Varios estudios han demostrado el efecto directo que tiene la secreción de LPL por macrófagos sobre la formación de las lesiones ateroscleróticas. En el estudio llevado a cabo por Van Eck et al. [568] utilizaron ratones a los que se les transplantaron células de médula ósea LPL-deficientes. Demostraron que tras ocho semanas de alimentar a los ratones con una dieta de alto contenido lipídico, la ausencia de LPL derivada de macrófagos incrementó los niveles de TG en circulación, pero redujo en un 52% la formación de lesiones ateroscleróticas. Además, se detectó una menor internalización de lípidos en los macrófagos LPL -/- de los animales. Existen estudios científicos anteriores cuyos resultados coinciden con los de Van Eck et al., lo que confirma el importante papel de la LPL derivada de macrófagos en el desarrollo de la aterosclerosis [569]. La naturaleza proaterogénica de la LPL no solo se debe a su acción hidrolítica sobre los TG, sino que ha sido en gran parte asociada a su función no-catalítica o “de puente”. Esta enzima actúa como molécula de unión entre las TRL y sus remanentes con los receptores de superficie [570, 571], aunque también media la interacción directa entre lipoproteínas y la superficie de los monocitos THP-1, como demostraron Makoveichuk et al. [572]. Asimismo, se ha visto que puede actuar como molécula de adhesión a través de su interacción con los proteoglicanos heparán sulfato de la superficie celular, facilitando la unión de los monocitos a la superficie de las células endoteliales de la pared arterial [91]. Por tanto, la LPL es un determinante crítico en la formación de células espumosas y desarrollo de la placa de ateroma.

La actividad de LPL se encuentra cuidadosamente regulada a través de múltiples mecanismos que actúan principalmente a nivel transcripcional y post-traducciona. Estudios recientes han indentificado a los componentes de la familia de proteínas similares a la angiopoyetina (angiopoyetin-like proteins, ANGPTLs) como los mayores reguladores fisiológicos de la actividad de LPL, entre los cuales destaca ANGPTL4. Mediante experimentos *in vivo* realizados con diferentes modelos de animales transgénicos que sobreexpresaban ANGPTL4, se ha demostrado que los ratones desarrollan hipertrigliceridemia debido a la drástica elevación de los niveles de TG en suero causada por la reducción del aclaramiento de los TG que es mediado por la LPL. En cambio, la deleción de ANGPTL4 provoca hipotrigliceridemia, debido a la alta actividad catalítica de la LPL [92, 93]. Ensayos bioquímicos han mostrado que la inhibición que ejerce ANGPTL4 sobre la actividad de la LPL tiene lugar mediante la interacción directa del dominio ccd-ANGPTL4, localizado en el extremo N-terninal de la proteína, con la LPL [573].

Existen moléculas capaces de influir potencialmente en la interacción ANGPTL4-LPL, protegiendo la actividad de la enzima, como son la heparina y GPIHBP1, y además las lipoproteínas. Ha quedado demostrado que la fuerte interacción que establece la LPL con las TRL también la protegen de su inactivación por ANGPTL4 [574]. Se ha mostrado la capacidad de los AG para unirse a la LPL y estabilizar la estructura activa de la enzima, incluso a concentraciones micromolares [575]. Nilsson et al. [574] observaron con experimentos *in vivo* que la adición de QM y VLDL a cultivos de hepatocitos murinos primarios a una concentración similar a los niveles normales de TG plasmáticos (>1mg TG/ml), ayuda a preservar significativamente la actividad de la LPL en presencia de NT-ANGPTL3 y NT-ANGPTL4 humanas recombinantes. También lo demostraron *in vivo* con los QM y sus remanentes formados tras inyectarles a los ratones NT-ANGPTL4 junto con aceite de oliva. En cambio, se ha sugerido que unos niveles elevados de AG libres tras la lipólisis postprandial de las TRL son capaces de inducir la sobreexpresión de ANGPTL4, y reducir en consecuencia la actividad de la LPL [576]. Lichtenstein et al. [567] propusieron que se trata de un mecanismo de protección de los propios macrófagos para reducir la toxicidad celular inducida por la alta concentración de AG libres mediante la reducción de la hidrólisis de los TG, y para evitar la fuerte incorporación de lípidos en los macrófagos. Varios son los grupos de investigación que han demostrado que la sobreexpresión de ANGPTL4 protege frente al desarrollo de la aterosclerosis [577]. Los AG libres han demostrado ser también uno de los factores más importantes en la regulación de la actividad de ANGPTL4. Estas moléculas tienen la capacidad de alterar la estructura/función de

ANGPTL4 e influir sobre la acción inhibitoria de ccd-ANGPTL4 sobre LPL. Esto es posible gracias a la estrecha unión que establecen con ccd-ANGPTL4 cerca del sitio de unión de este dominio con la LPL. De hecho, la afinidad de ccd-ANGPTL4 por los AG ha resultado ser mayor que la mostrada por LPL [448]. La interacción entre los AG libres y ccd-ANGPTL4 se caracteriza por una asociación rápida y disociación muy lenta, conduciendo a la formación de complejos muy estables. Robal et al. [448] revelaron que, una vez los AG se unen a ccd-ANGPTL4, la secuencia sufre cambios conformacionales que debilitan su estructura, lo que reduce el ratio de formación del complejo ANGPTL4-LPL.

Ante el evidente control que ejercen los AG sobre la actividad de ANGPTL4, varios estudios *in vitro* han mostrado el efecto diferencial de diferentes emulsiones lipídicas en los niveles en circulación de ANGPTL4. Así pues, en experimentos con células animales se ha observado que existe una menor expresión de ANGPTL4 cuando las células se incuban con ácido oleico (MUFA), la más alta era inducida por DHA (PUFA), y que el ácido cáprico (10:0) (SFA) no tiene efecto en su nivel de expresión [578]. Además, la afinidad de unión de ANGPTL4 con los AG depende de su grado de saturación. Robal et al. observaron que los SFA y MUFA se unen más estrechamente a ccd-ANGPTL4 que los PUFA, y a mayor afinidad de los AG por ccd-ANGPTL4, mayor capacidad para proteger LPL de su inhibición [448]. El control que ejercen los AG sobre los niveles de expresión de ANGPTL4 y LPL es principalmente a través de su capacidad para estimular la activación de los PPARs en macrófagos [579]. Se ha demostrado que aquellos AG con mayor afinidad por PPAR- $\alpha$  son los responsables de incrementar la expresión de LPL [579] y por PPAR- $\delta$  de elevar la de ANGPTL4 en macrófagos [580].

Los AG no solo interfieren con los niveles de expresión de ANGPTL4 y LPL en macrófagos, sino que también afectan a la actividad hidrolítica de la LPL, pues la prioridad que presenta la enzima para hidrolizar unos TG frente a otros depende de su composición de AG. Como ya ha sido comentado previamente, estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la predilección de la LPL por unos AG u otros [519, 520, 521, 522, 523]. Entre ellos, Bravo et al. [581] observaron por medio de sus experimentos *in vivo* con ratas que QM con distinta composición de AG debido a la ingesta de distintos aceites, presentaban diferente ratio de aclaramiento. Mostraron que los QM derivados del consumo de aceite de pescado (rico en PUFA n-3) o de aceite de maíz (rico PUFA n-6) eran retirados de la circulación más rápidamente que aquellos derivados del aceite de oliva (rico en MUFA) o del aceite de palma (rico en SFA de cadena larga).

A pesar de la abundancia de estudios en la literatura científica sobre la capacidad de los AG para regular los niveles de expresión de ANGPTL4, existe poca información de la regulación de ANGPTL4 en macrófagos, así como de la actividad de la LPL endógena sintetizada por macrófagos. Además, la mayoría de los estudios encontrados hacen referencia a la modulación de la actividad de ambas proteínas por acción de AG libres, y no como constituyentes de TRL. Con el fin de profundizar en la capacidad del componente lipídico contenido en las TRL para regular el sistema ANGPTL4-LPL en macrófagos, en esta sección se propuso analizar *in vitro* el efecto diferencial del grado de saturación de los AG contenidos en los QM sobre los niveles de actividad de la LPL en macrófagos THP-1.

Aislar QM y sus remanentes del suero humano sin que exista contaminación de otras lipoproteínas resulta bastante complicado. Por este motivo, se optó por usar partículas de QM sintetizadas artificialmente (Chylomicron remnants-like particles, CRLPs). Estas partículas constituyen un adecuado modelo para el estudio del metabolismo de los QM remanentes. Gracias a que presentan su mismo tamaño, densidad y composición lipídica, además de contener apo E humana, son capaces de imitar su efecto fisiológico en macrófagos. Tan solo difieren de los QM remanentes naturales en que carecen de apo B-48 en su estructura. Sin embargo, varios estudios han mostrado que las CRLP de este tipo sin apo B-48 tienen el mismo comportamiento que las partículas de origen natural en su aclaramiento de la circulación y metabolismo *in vivo*, y en su efecto en varios cultivos celulares *in vitro* [582, 583]. Además, las CRLP causan una acumulación lipídica en macrófagos THP-1 comparable a la obtenida por los QM remanentes de origen natural, como se ha visto con partículas aisladas en ratas *in vivo* en macrófagos J774 [358].

La composición de las CRLP es fácilmente manipulable, lo que permitió que se pudiese sintetizar tres grupos de CRLP con TG de diferente grado de saturación: trilinoleína (LLL, PUFA), trioleína (OOO, MUFA) y 2-oleil-1,3-dipalmitina (POP, SFA). Inicialmente se propuso que las CRLP enriquecidas en SFA contuviesen tripalmitina (PPP), pero ante la tendencia de PPP a formar agregados, tuvo que reemplazarse por POP como fuente de SFA. La introducción de ácido oleico en la segunda posición de los TG permitió que éstos fueran capaces de disolverse con mayor facilidad y fuera posible formar las emulsiones lipídicas requeridas para la preparación de las CRLP ricas en SFA.

Previamente, se ha detectado que es a las 5-6 horas cuando la LPL muestra las mayores diferencias en el ratio de hidrólisis de TG en presencia de emulsiones lipídicas [584]. Sin embargo, De Pascale et al. [358] observaron que a las 5 horas de incubación de los macrófagos con las CRLP, la acumulación lipídica es muy baja, y la mayor incorporación tiene lugar a las 48 horas. Un periodo de 6 horas de incubación permitiría un control de los AG sobre los niveles de expresión génica, aunque algo limitado por su escasa incorporación intracelular, y 48 horas supondría un tiempo demasiado extenso puesto que la LPL es muy sensible, y en periodos largos de incubación comienza a perder actividad [584]. En base a ello, fueron seleccionadas las 6 y 24 horas para el tratamiento de los macrófagos THP-1 con los tres grupos de CRLP. Transcurridos dichos periodos de incubación, se recogerían las diferentes fracciones sobre las que analizar el efecto del componente lipídico en los niveles de actividad de la LPL en macrófagos.

Se ha establecido que para estudiar la regulación de la actividad de la LPL en macrófagos, hay que enfocar la atención principalmente sobre la fracción de LPL localizada en la superficie celular. Experimentos *in vitro* con medio condicionado han confirmado que la inactivación de LPL presente en el medio de cultivo por ANGPTL4 no es probable. Para que ANGPTL4 inactive a LPL, es necesaria la formación de oligómeros de ANGPTL4 [585]. Makoveichuk et al. [586] observaron que la formación de tales oligómeros covalentes de ANGPTL4 ocurre en las membranas celulares de los macrófagos THP-1, donde co-localiza con la LPL e interacciona con ella. Además, ha sido demostrado que la formación de los oligómeros coincide en el tiempo con la inactivación de la LPL. Todo esto parece confirmar que la inactivación de la LPL tiene lugar en la superficie celular y que el control de la regulación por parte del componente lipídico de las CRLP debería verse reflejado en esta fracción. Observaron a su vez que la activación de los PPARs estimula la reducción de la actividad de LPL desde las 3 horas del tratamiento con los AG, cuando mayor cantidad de ANGPTL4 aparece en la superficie celular. Y mostraron que a partir de ese momento, la cantidad de proteínas de ANGPTL4 y LPL inactiva se incrementan en el medio tras ser liberada de la superficie celular.

Aunque la actividad de la LPL unida a la superficie celular representa una fracción pequeña del total de la actividad de LPL en macrófagos THP-1, la fracción recogida a las 6 horas ya debería reflejar la acción inhibitoria de ANGPTL4, así como el efecto modulador del componente lipídico de las CRLP. Tras 6 horas de tratamiento con las CRLP, la actividad de la LPL tan solo sufrió una reducción con las partículas compuestas por PUFA, lo que coincide con los resultados de Robal et al. [448], quienes detectaron este mismo efecto en la actividad de la

LPL con los distintos AG. Puesto que la formación de los fuertes complejos formados entre los SFA y ANGPTL4 protegen la actividad catalítica de la enzima, de ahí que los niveles de actividad se mantengan similares a los del control. En cambio, debido a la menor interacción de PUFA con ANGPTL4, la actividad de LPL se reduce. Por otro lado, Brands et al. [578] demostraron que el ácido oleico tiene la capacidad de reducir los niveles de expresión de ANGPTL4. Esto podría explicar que no se observara una reducción de la actividad de LPL con las CRLP ricas en MUFA en nuestro estudio. Michaud et al. [579] detectaron esa misma modulación de la actividad de LPL por parte de los PUFA y SFA, y establecieron que la respectiva reducción e incremento de los niveles de expresión, y por tanto de síntesis de LPL, tenía lugar a través de su acción sobre los PPARs. Como se ha comentado, la actividad hidrolítica de LPL es mayor en presencia de TRL con un elevado contenido de PUFA [519]. Tras un elevado proceso hidrolítico de estas partículas, puesto que los PUFA son activos ligandos de PPAR- $\delta$ , su liberación podría estar estimulando la sobreexpresión de ANGPTL4, además de inducir una importante reducción en los niveles de ARNm LPL. Sin embargo, el efecto modulador de los AG sobre los mecanismos que involucran PPARs deberían ser considerados siempre y cuando exista una abundante incorporación lipídica por los macrófagos. De acuerdo con lo mostrado por De Pascale et al. [358] después de 5 horas de incubación de macrófagos THP-1 con las CRLP, la internalización de lípidos fue relativamente baja. Esto parece sugerir que el efecto modulador de los AG a corto plazo es causado a través de su interacción directa con ANGPTL4 en la superficie celular. En cambio, tras 24 horas de tratamiento de los macrófagos con las CRLP, se observó una significativa reducción en los niveles de actividad de la LPL en todos los casos y sin apreciarse diferencias significativas entre ellas. De Pascale et al. detectaron que a las 24 horas de incubación ya existe una elevada acumulación lipídica. En su caso, las CRLP compuestas por SFA fueron las causantes de la mayor internalización de lípidos en las células [358]. Al contrario, en el presente estudio no se detectaron diferencias significativas en los niveles de acumulación lipídica entre las diferentes partículas, aunque sí se apreció una tendencia. Se observó que las CRLP ricas en MUFA causaron la mayor incorporación de lípidos, y las CRLP ricas en SFA la menor. Esto parece sugerir que a las 24 horas, los TG compuestos por AG con diferentes grados de saturación causan niveles similares de depósitos lipídicos intracelulares en macrófagos, y que modulan la actividad de la LPL de superficie de manera similar.

La cuantificación de los niveles de actividad de la LPL en el medio de cultivo si mostró en cambio diferencias significativas según el componente lipídico de las partículas. Esta fracción contiene la LPL sintetizada y liberada en su forma catalíticamente activa, además de la LPL inactivada por acción de ANGPTL4, que ha sido liberada al medio. Cuando los macrófagos THP-1 se trataron durante 6 horas con las CRLP, la actividad de la LPL detectada en el medio de los cultivos reveló que las partículas ricas en MUFA y PUFA provocaron una reducción significativa frente a la de los cultivos control, siendo la menor con PUFA. En cambio, cuando las CRLP contenían SFA, la actividad de LPL en el medio no se vio alterada en comparación con los cultivos control. Puesto que la inactivación de la enzima localizada en la superficie conlleva su posterior liberación al medio, estos resultados coinciden con la actividad detectada en la superficie. Así pues, con el tratamiento con las CRLP enriquecidas en PUFA se han detectado los menores niveles de actividad tanto en el medio como en la superficie. Aunque ANGPTL4 interacciona también con bastante afinidad con MUFA, no se debería descartar que existiera cierta inhabilitación de la enzima por parte de ANGPTL4 y liberación en su forma inactiva al medio de cultivo. La mayor afinidad de ANGPTL4 por SFA [448] explicaría a su vez que la LPL mantenga su nivel de actividad en el medio de cultivo, pues no hay liberación de LPL inactiva al medio. Sin embargo, cuando se procedió a cuantificar los niveles de actividad de la LPL en el medio de cultivo a las 24 horas de tratamiento, esta vez las CRLP ricas en SFA sí provocaron una significativa reducción, incluso por debajo de los niveles obtenidos con las CRLP enriquecidas en MUFA. Los menores niveles detectados fueron de nuevo observados tras la presencia de PUFA en los cultivos celulares. A las 24 horas, ya existe una abundante incorporación de lípidos en macrófagos, por lo que los mecanismos de control que involucran PPARs adquieren mayor importancia. De todas maneras, estos resultados no pueden ser del todo concluyentes, ya que sería necesario medir la masa de LPL y calcular la actividad específica de la enzima. Eso permitiría analizar la cantidad de LPL realmente activa en el medio de cultivo, pues es posible que la alta liberación de enzima inactiva al medio esté enmascarando los niveles reales de actividad de LPL.

El análisis de la actividad de la LPL localizada en el espacio intracelular antes de ser trasladada a la membrana plasmática de las células proporcionó unos resultados muy similares a los obtenidos en la superficie celular. En este caso, también fue únicamente tras la incubación de los macrófagos con las CRLP enriquecidas en PUFA cuando los niveles de actividad de la LPL intracelular se redujeron significativamente. Puesto que en el espacio intracelular la LPL aún no ha entrado en contacto con ANGPTL4, en este caso los PUFA n-3 incorporados, aunque pocos al

tratarse de solo 6 horas de tratamiento, estarían reduciendo la actividad mediante la modulación de la abundancia de ARNm LPL. Esto coincidiría con los resultados de Michaud et al. [579], aunque en su caso la expresión de LPL se analizó en animales de experimentación.

Se ha observado que durante la transición del estado postprandial a ayunas, los cambios en la abundancia de ARNm ANGPTL4 están inversamente correlacionados con la actividad de LPL en el tejido adiposo [573]. Esos datos demuestran que la expresión de ANGPTL4 responde rápidamente al estado nutricional. En el estado postprandial, cuando los niveles de partículas de TRL en circulación son elevados, la expresión de ANGPTL4 es menor [573], lo que permite un adecuado metabolismo de los TG por la LPL tras la ingesta de las comidas. La alta liberación de AG libres que tiene lugar por acción de la LPL incrementa las probabilidades de que estas moléculas sean capaces de modular la expresión genética de LPL y ANGPTL4 [579]. Se procedió a estudiar la capacidad del componente lipídico de las CRLP para modular los niveles de expresión de ARNm ANGPTL4 y LPL, y confirmar la inversa correlación establecida. Solo pudo estudiarse la modulación de la expresión génica de ANGPTL4 y LPL en respuesta a las partículas enriquecidas en MUFA y PUFA. No se detectaron diferencias significativas en la expresión de los dos genes, aunque de nuevo se observó una tendencia. A las 24 horas de incubar los macrófagos con las CRLP, se detectó en ambos casos una importante reducción en la expresión de LPL y una sobreexpresión de ANGPTL4 frente a los cultivos control, especialmente con las CRLP ricas en PUFA. Como se ha comentado, la LPL tiene predilección por las TRL con elevado contenido en PUFA [519], y de acuerdo con establecido por Lichtenstein et al. [567], es probable que las elevadas concentraciones de AG libres generados por la hidrólisis de los TG contenidos en las CRLP-LLL estén sirviendo de estímulo para la sobreexpresión de ANGPTL4 como mecanismo protector [577]. La gran reducción de la expresión de LPL detectada con las CRLP ricas en PUFA coincide una vez más con los resultados obtenidos por Michaud et al. [579]. Estos autores observaron que después de alimentar a los ratones con una dieta rica en aceite de pescado, con alto contenido de PUFA n-3, los niveles de ARNm LPL en macrófagos experimentaron una importante reducción. También se detectó que tras 48 horas, se reducía la secreción de proteínas LPL [579]. Aunque el contenido de MUFA en las CRLP manifiesta un efecto protector frente al desarrollo de la aterosclerosis al reducir la formación de células espumosas mediante la modulación de los niveles de expresión de LPL y ANGPTL4, el efecto conseguido por PUFA fue mayor.

No fue posible determinar el efecto modulador de la expresión de ANGPTL4 y LPL por los SFA. Sin embargo, el mantenimiento de la actividad de LPL detectado cuando los macrófagos se trataron con las CRLP ricas en SFA parece sugerir que estos AG, además de proteger la actividad catalítica de la enzima, inducen una mayor expresión de LPL a corto plazo. Esto coincidiría de nuevo con lo mostrado por Michaud et al. [579], quienes detectaron que los ácidos palmítico, esteárico y araquidónico ejercen un efecto regulador dependiente de PPARs, y potencian la actividad de unión de proteínas nucleares al elemento PPRE presente en el gen LPL de forma PPAR-específica. Según sus resultados, los SFA incrementan la producción de LPL, promoviendo por tanto la formación de células espumosas. La posterior reducción observada de la actividad de LPL tras un periodo de incubación más extenso, 24 horas, sería debida a una sobreexpresión de ANGPTL4 como medio de defensa ante la elevada incorporación de lípidos en los macrófagos. Sin embargo, haría falta confirmarlo mediante la cuantificación de la abundancia de ARNm ANGPTL4.

En conjunto, estos resultados parecen confirmar que la actividad de la LPL es susceptible de ser modulada por la composición de AG de las CRLP, por lo que ANGPTL4 y LPL pueden considerarse atractivas dianas para la prevención de la aterosclerosis. La capacidad del componente lipídico de las partículas para regular la actividad de estas dos proteínas parece ser clave en la formación de células espumosas. Hemos demostrado que los AG contenidos en las TRL modulan la actividad de LPL mediante la interacción directa con ANGPTL4 y a través de la expresión de ARNm ANGPTL4 y LPL, en macrófagos THP-1. La mayor alteración de la actividad de LPL por parte del componente lipídico se detectó a las 24 horas en la superficie celular, donde coinciden ANGPTL4 y LPL. Teniendo en cuenta la función proaterogénica de la LPL y su colaboración en la formación de células espumosas, los resultados obtenidos sugieren que la sobreexpresión de ANGPTL4 tras el tratamiento de los macrófagos THP-1 con las CRLP ricas en MUFA y PUFA es un buen indicador de las propiedades protectoras de estos AG frente al desarrollo de la aterosclerosis. Su capacidad para reducir los niveles de actividad de LPL estaría contribuyendo a que se establezca una menor unión entre TRL y receptores celulares y, por tanto, a reducir la formación de células espumosas. En cambio, las CRLPs enriquecidas en SFA parecen ayudar a mantener los niveles de actividad de LPL, estimulando la acumulación de lípidos en el interior de los macrófagos.

# CONCLUSIONES

Una vez finalizado el estudio, puede concluirse que:

1. El consumo del desayuno de tipo mediterráneo favorece una respuesta lipídica postprandial más reducida en individuos obesos, y contribuye a mantener una adecuada homeostasis lipídica en personas de peso normal.
2. El consumo de manera continuada de un desayuno de tipo occidental podría contribuir a la resistencia a la insulina en sujetos con obesidad, ya que la sustitución de lo MUFA de la dieta por SFA contribuiría a mantener elevados los niveles postprandiales de insulina. Asimismo, el consumo del desayuno de tipo mediterráneo demostró mejorar la sensibilidad a la insulina en los individuos normopeso.
3. La ingesta del desayuno de tipo mediterráneo por personas con peso normal estimula una menor liberación de mediadores de inflamación. En cambio, para que las personas obesas se beneficien de este efecto, parece ser necesaria una previa pérdida de peso.
4. La incorporación en macrófagos de las TRL derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo procedentes de los sujetos obesos y normopesos, condujo a un perfil lipídico intracelular menos aterogénico. No obstante, sólo se detectó una menor formación de células espumosas con las TRL aisladas de las personas de peso normal.
5. El incremento intracelular de MUFA totales en macrófagos contribuyó a reducir la expresión de la mayoría de los receptores celulares de superficie en macrófagos, en especial LDLR y CD36 en los individuos obesos y LRP-1 en los individuos normopesos.
6. El desayuno de tipo occidental potenció la relación colaborativa entre los receptores LDLR y LRP-1 que contribuye a la formación de células espumosas en ambos grupos, aunque más significativamente en los sujetos obesos. Al contrario, el desayuno de tipo mediterráneo pareció prevenirla, aunque solo en personas con peso normal.
7. Al contrario que los SFA, los MUFA y, en especial, los PUFA, contenidos en TRL artificiales (o CRLP) demostraron reducir la expresión de LPL e incrementar la de ANGPTL4, protegiendo frente a la formación de células espumosas mediante una menor actividad de la LPL.

**En general, los resultados obtenidos permiten concluir que el consumo de un desayuno de tipo mediterráneo ayuda a reducir la respuesta lipídica postprandial en las personas obesas, y contribuye a una menor formación de células espumosas mediante la reducción de los niveles de expresión de los receptores celulares, así como la actividad de la LPL. No obstante, para que la respuesta inflamatoria establecida en la obesidad se reduzca por la ingesta de una dieta rica en MUFA, sería necesario que éstos individuos perdieran previamente peso corporal.**

# REFERENCIAS

- [1] M. O’Flaherty, I. Buchan, and S. Capewell, “Contributions of treatment and lifestyle to declining CVD mortality: why have CVD mortality rates declined so much since the 1960s?,” *Heart Br. Card. Soc.*, vol. 99, no. 3, pp. 159–162, Feb. 2013.
- [2] H. Wang *et al.*, “Age-specific and sex-specific mortality in 187 countries, 1970-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 380, no. 9859, pp. 2071–2094, Dec. 2012.
- [3] CJ Murray, T Vos, R Lozano, et al., “Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.,” *Lancet*, p. 380:2197e223, 2012.
- [4] RL Holman, HC McGill, JP Strong, JC Geer, “Observations on the natural history of atherosclerosis,” *J State Med Soc*, vol. 110(11):361-9, 1958.
- [5] A. Bertomeu Ruiz et al, “La placa aterogénica: fisiopatología y consecuencias clínicas.” *Med Integr*, vol. 40:394-405, 2002.
- [6] A. Michael Gimbrone, Jr., “Vascular Endothelium, Hemodynamic Forces, and Atherogenesis.” *Am J Pathol*, vol. 155(1): 1–5, 1999.
- [7] F. W. Lusinskas and M. A. Gimbrone, “Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 47, pp. 413–421, 1996.
- [8] M. Gouverneur, B. Berg, M. Nieuwdorp, E. Stroes, and H. Vink, “Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress,” *J. Intern. Med.*, vol. 259, no. 4, pp. 393–400, Apr. 2006.
- [9] M. Civelek, E. Manduchi, R. J. Riley, C. J. Stoeckert, and P. F. Davies, “Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis,” *Circ. Res.*, vol. 105, no. 5, pp. 453–461, Aug. 2009.
- [10] J. N. Topper, J. Cai, D. Falb, and M. A. Gimbrone, “Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 19, pp. 10417–10422, Sep. 1996.
- [11] J. Lei, Y. Vodovotz, E. Tzeng, and T. R. Billiar, “Nitric oxide, a protective molecule in the cardiovascular system,” *Nitric Oxide Biol. Chem.*, vol. 35, pp. 175–185, Nov. 2013.
- [12] D. C. Schwenke and T. E. Carew, “Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries,” *Arterioscler. Dallas Tex*, vol. 9, no. 6, pp. 908–918, Dec. 1989.
- [13] M. Belting, “Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier.” *Trends Biochem*

*Sci*, vol. 28(3):145-51. Review., 2003.

- [14] M. A. Gimbrone and G. García-Cardeña, "Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis," *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.*, vol. 22, no. 1, pp. 9–15, Feb. 2013.
- [15] S. SenBanerjee *et al.*, "KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation," *J. Exp. Med.*, vol. 199, no. 10, pp. 1305–1315, May 2004.
- [16] Z. Ungvari, M. S. Wolin, and A. Csiszar, "Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling?," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 8, no. 7–8, pp. 1121–1129, Aug. 2006.
- [17] U. P. Steinbrecher, "Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 959, no. 1, pp. 20–30, Mar. 1988.
- [18] M. F. Linton, P. G. Yancey, S. S. Davies, W. G. (Jay) Jerome, E. F. Linton, and K. C. Vickers, "The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis," in *Endotext*, L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer, and A. Vinik, Eds. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.
- [19] R. E. Gerszten *et al.*, "MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions," *Nature*, vol. 398, no. 6729, pp. 718–723, Apr. 1999.
- [20] K. E. Paulson, S.-N. Zhu, M. Chen, S. Nurmohamed, J. Jongstra-Bilen, and M. I. Cybulsky, "Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis," *Circ. Res.*, vol. 106, no. 2, pp. 383–390, Feb. 2010.
- [21] N. Torres, M. Guevara-Cruz, L. A. Velázquez-Villegas, and A. R. Tovar, "Nutrition and Atherosclerosis," *Arch. Med. Res.*, vol. 46, no. 5, pp. 408–426, Jul. 2015.
- [22] R. Puri *et al.*, "Factors underlying regression of coronary atheroma with potent statin therapy," *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 24, pp. 1818–1825, Jun. 2013.
- [23] Guyton JR, "Phospholipid hydrolytic enzymes in a 'cesspool' of arterial intimal lipoproteins: a mechanism for atherogenic lipid accumulation," *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 21(6):884-6, 2001.
- [24] S. M. Schwartz, "The intima : A new soil," *Circ. Res.*, vol. 85, no. 10, pp. 877–879, Nov. 1999.
- [25] P. Libby, "Changing concepts of atherogenesis," *J. Intern. Med.*, vol. 247, no. 3, pp. 349–358, Mar. 2000.
- [26] K. J. Moore and M. W. Freeman, "Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1702–1711, Aug. 2006.

- [27] S. Ghosh, B. Zhao, J. Bie, and J. Song, "Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis," *Vascul. Pharmacol.*, vol. 52, no. 1–2, pp. 1–10, Feb. 2010.
- [28] Libby P, Mach F, Schönbeck U, Bourcier T, Aikawa M., "Regulation of the thrombotic potential of atheroma.," *Thromb Haemost*, vol. 82(2):736-41. Review, 1999.
- [29] A. J. Lusis, "Atherosclerosis," *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 233–241, Sep. 2000.
- [30] N.V. Bhagavan, *Medical Biochemistry*, 4th ed. 2002.
- [31] Jonas A., "Lipoprotein structure," in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, 4th Edtn., Elsevier Science B. V., 2002, p. Chapter 18.
- [32] Errico TL, Chen X, Martin Campos JM, Julve J, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F., "Basic mechanisms: structure, function and metabolism of plasma lipoproteins," *Clin Investig Arter.*, vol. 25(2):98-103, 2013.
- [33] A. M. Palmer *et al.*, "Differential uptake of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins by THP-1 macrophages," *Atherosclerosis*, vol. 180, no. 2, pp. 233–244, 2005.
- [34] Antelo A, Perona JS, "Evaluation of a method of preparation of lipid emulsions as a model for chylomicron-like particles," *J Liposome Res*, vol. 23(2):126-33, 2013.
- [35] Koschinsky MLB, MB, Marcovina, SM, "Lipoprotein(a). Ballantyne CM, ed.," in *Clinical Lipidology, a companion to Braunwald's Heart Disease.*, Elsevier Saunders, 2015, pp. 109–127.
- [36] D. J. Rader *et al.*, "The low density lipoprotein receptor is not required for normal catabolism of Lp(a) in humans," *J. Clin. Invest.*, vol. 95, no. 3, pp. 1403–1408, Mar. 1995.
- [37] G.L. Zubay, *Biochemistry*, 4th Edtn. Wm. C. Brown Publishers, 1998.
- [38] F. Brites F, Gómez Rosso LA, Meroño T, Menafrá M, "6º Curso de Capacitación de Posgrado a Distancia Síndrome Metabólico y Riesgo Vascular, de la Fundación para el Estudio, la Prevención y el Tratamiento de la Enfermedad Vascular Aterosclerótica (FEPREVA). Lípidos y Lipoproteínas Características, Fisiología y Acciones Biológicas." 2012-2011.
- [39] Mataix Verdu, J, *Nutrición y salud humana*, Ergon S.A. 2002.
- [40] M. F. Linton, A. H. Hasty, V. R. Babaev, and S. Fazio, "Hepatic apo E expression is required for remnant lipoprotein clearance in the absence of the low density lipoprotein receptor," *J. Clin. Invest.*, vol. 101, no. 8, pp. 1726–1736, Apr. 1998.
- [41] M. R. Wardell, P. A. Suckling, and E. D. Janus, "Genetic variation in human apolipoprotein E," *J. Lipid Res.*, vol. 23, no. 8, pp. 1174–1182, Nov. 1982.
- [42] A. J. Murphy *et al.*, "ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 10, pp. 4138–4149, Oct. 2011.
- [43] D. Wu *et al.*, "Apolipoprotein E-deficient lipoproteins induce foam cell formation by

- downregulation of lysosomal hydrolases in macrophages,” *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 12, pp. 2571–2578, Dec. 2007.
- [44] P. G. Yancey, H. Yu, M. F. Linton, and S. Fazio, “A pathway-dependent on apoE, ApoAI, and ABCA1 determines formation of buoyant high-density lipoprotein by macrophage foam cells,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 5, pp. 1123–1131, May 2007.
- [45] R. W. Mahley and T. L. Innerarity, “Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 737, no. 2, pp. 197–222, May 1983.
- [46] Mahley, R. W., Z-S. Ji, W. J. Brecht, R. D. Miranda, and D. He., “Role of heparan sulfate proteoglycans and the LDL receptor-related protein in remnant lipoprotein metabolism,” *Ann NY Acad Sci*, vol. 737: 39–52, 1994.
- [47] Mahley, R. W., “Heparan sulfate proteoglycan/low density lipoprotein receptor-related protein pathway involved in type III hyperlipoproteinemia and Alzheimer’s disease,” *J Med Sci*, vol. 32: 414–429., 1996.
- [48] S. H. Zhang, R. L. Reddick, J. A. Piedrahita, and N. Maeda, “Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E,” *Science*, vol. 258, no. 5081, pp. 468–471, Oct. 1992.
- [49] Fazio S, Linton MF, “Regulation and Clearance of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins. In: Ballantyne CM, ed.,” in *Clinical Lipidology, a companion to Braunwald’s Heart Disease.*, Elsevier Saunders, 2015, pp. 11–24.
- [50] J. P. Kane, “Apolipoprotein B: structural and metabolic heterogeneity,” *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 45, pp. 637–650, 1983.
- [51] M. M. Véniant *et al.*, “Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient ‘apo-B48- only’ and ‘apo-B100-only’ mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 102, no. 8, pp. 1559–1568, 1998.
- [52] S. H. Gianturco, M. P. Ramprasad, R. Song, R. Li, M. L. Brown, and W. a Bradley, “Apolipoprotein B-48 or its apolipoprotein B-100 equivalent mediates the binding of triglyceride-rich lipoproteins to their unique human monocyte-macrophage receptor,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 18, no. 6, pp. 968–976, 1998.
- [53] R. W. Milne and Y. L. Marcel, “Monoclonal antibodies against human low density lipoprotein. Stoichiometric binding studies using Fab fragments,” *FEBS Lett.*, vol. 146, no. 1, pp. 97–100, Sep. 1982.
- [54] M. Amigo-Benavent, L. Sinausia, E. Montero, and J. S. Perona, “Brief Communication: Discordant ability of the triglyceride to apolipoprotein B ratio to predict triglyceride-rich lipoprotein particle size in normal-weight and obese men,” *Exp. Biol. Med. Maywood NJ*, vol. 241, no. 16, pp. 1772–1775, Oct. 2016.

- [55] A. L. Wu and H. G. Windmueller, "Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat," *J. Biol. Chem.*, vol. 254, no. 15, pp. 7316–7322, Aug. 1979.
- [56] A. Jonas, S. A. Sweeny, and P. N. Herbert, "Discoidal complexes of A and C apolipoproteins with lipids and their reactions with lecithin: cholesterol acyltransferase," *J. Biol. Chem.*, vol. 259, no. 10, pp. 6369–6375, May 1984.
- [57] J. C. LaRosa, R. I. Levy, P. Herbert, S. E. Lux, and D. S. Fredrickson, "A specific apoprotein activator for lipoprotein lipase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 41, no. 1, pp. 57–62, Oct. 1970.
- [58] W. C. Breckenridge, J. A. Little, G. Steiner, A. Chow, and M. Poapst, "Hypertriglyceridemia associated with deficiency of apolipoprotein C-II," *N. Engl. J. Med.*, vol. 298, no. 23, pp. 1265–1273, Jun. 1978.
- [59] F. Shelburne, J. Hanks, W. Meyers, and S. Quarfordt, "Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat," *J. Clin. Invest.*, vol. 65, no. 3, pp. 652–658, Mar. 1980.
- [60] J.M. Ordovas, D.K. Cassidy, F. Civeira, C.L. Bisgaier, E.J. and Schaefer, "Familial apolipoprotein A-I, C-III, and A-IV deficiency and premature atherosclerosis due to deletion of a gene complex on chromosome 11," vol. 264, p. 16339–16342., 1989.
- [61] R.A. Norum, J.B. Lakier, S. Goldstein, A. Angel, R.B., H. Iwasaki et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1483 (2000) 316–324 323, Goldberg, W.D. Block, D.K. Nojze, P.J. Dolphin, J. Edelglass, and D.D. Bogorad, P. Alaupovic, "Familial deficiency of apolipoproteins A-I and C-III and precocious coronary artery disease," *New Engl J Med*, vol. 306, pp. 1513–1519, 1982.
- [62] Gongonea, V., "Structural Insights into High Density Lipoprotein: Old Models and New Facts," *Front Pharmacol*, vol. 6:318, 2016.
- [63] R. W. Mahley, T. L. Innerarity, S. C. Rall, and K. H. Weisgraber, "Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function," *J. Lipid Res.*, vol. 25, no. 12, pp. 1277–1294, Dec. 1984.
- [64] M. G. Wilhelm and A. D. Cooper, "Induction of atherosclerosis by human chylomicron remnants: a hypothesis," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 10, no. 3, pp. 132–139, 2003.
- [65] Bravo E, Napolitano M, "Mechanisms involved in chylomicron remnant lipid uptake by macrophages," *Biochem Soc Trans*, vol. 35(Pt 3):459-63. Review., 2007.
- [66] Hayashi, H., K Fujimoto, J. A. Cardelli, D. F. Nutting, S. and Bergstedt, and P. Tso, "Fat feeding increases size but not number of chylomicrons," *Am J Physiol*, vol. 22: G709-G719., 1990.
- [67] I. J. Martins, B. C. Mortimer, J. Miller, and T. G. Redgrave, "Effects of particle size and

- number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants,” *J Lipid Res*, vol. 37, no. 12, pp. 2696–2705, 1996.
- [68] Thomas M. Devlin (Ed.), *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania, 1997.
- [69] Carey MC, Small DM, Bliss CM., “Lipid digestion and absorption,” *Annu Rev Physiol*, vol. 45:651-77. Review, 1983.
- [70] Hussain MM., “Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation,” *Curr Opin Lipidol*, vol. 25(3):200-6. Review, 2014.
- [71] C. M. Mansbach and F. Gorelick, “Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons,” *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 293, no. 4, pp. G645-650, Oct. 2007.
- [72] S. Wang *et al.*, “IRE1 $\alpha$ -XBP1s induces PDI expression to increase MTP activity for hepatic VLDL assembly and lipid homeostasis,” *Cell Metab.*, vol. 16, no. 4, pp. 473–486, Oct. 2012.
- [73] S. Liang, X. Wu, E. A. Fisher, and H. N. Ginsberg, “The amino-terminal domain of apolipoprotein B does not undergo retrograde translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Proteasomal degradation of nascent apolipoprotein B begins at the carboxyl terminus of the protein, while apolipoprotein B is still in its original translocon,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 41, pp. 32003–32010, Oct. 2000.
- [74] Williams CM, Bateman PA, Jackson KG, Yaqoob P, “Dietary fatty acids and chylomicron synthesis and secretion,” *Biochem Soc Trans*, vol. 32(Pt 1):55-8. Review., 2004.
- [75] Zhu J, Lee B, Buhman KK, Cheng JX., “A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by ex vivo and in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging,” *J Lipid Res*, vol. 50(6):1080-9., 2009.
- [76] Bouchoux JI, Beilstein F, Pauquai T, Guerrero IC, Chateau D, Ly N, Alqub M, Klein C, Chambaz J, Rousset M, Lacorte JM, Morel E, Demignot S., “The proteome of cytosolic lipid droplets isolated from differentiated Caco-2/TC7 enterocytes reveals cell-specific characteristics.” *Biol Cell*, vol. 103(11):499-517., 2011.
- [77] S. Kersten, “Physiological regulation of lipoprotein lipase,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1841, no. 7, pp. 919–933, 2014.
- [78] Olivecrona T, Bengtsson-Olivecrona G., “Lipoprotein lipase and hepatic lipase,” *Curr Opin Lipidol*, vol. 4:187–196., 1993.
- [79] Goldberg IJ., “Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis,” *J Lipid Res*, vol. 37:693–707., 1996.

- [80] Zechner R., "The tissue-specific expression of lipoprotein lipase: implications for energy and lipoprotein metabolism.," *Curr Opin Lipidol*, vol. 8:77– 88., 1997.
- [81] B. S. J. Davies *et al.*, "GPIHBP1 Is Responsible for the Entry of Lipoprotein Lipase into Capillaries," *Cell Metab.*, vol. 12, no. 1, pp. 42–52, Jul. 2010.
- [82] C. N. Goulbourne *et al.*, "The GPIHBP1-LPL complex is responsible for the margination of triglyceride-rich lipoproteins in capillaries," *Cell Metab.*, vol. 19, no. 5, pp. 849–860, May 2014.
- [83] Ylä-Herttuala S *et al.*, "Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88:10143–10147., 1991.
- [84] O'Brien KD *et al.*, "Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques," *J Clin Invest*, vol. 89:1544 –1550.
- [85] M. Shimada *et al.*, "Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 14, pp. 7242–7246, Jul. 1996.
- [86] E. Zsigmond, K. Kobayashi, K. W. Tzung, L. Li, Y. Fuke, and L. Chan, "Adenovirus-mediated gene transfer of human lipoprotein lipase ameliorates the hyperlipidemias associated with apolipoprotein E and LDL receptor deficiencies in mice," *Hum. Gene Ther.*, vol. 8, no. 16, pp. 1921–1933, Nov. 1997.
- [87] G. Renier, E. Skamene, J. B. DeSanctis, and D. Radzioch, "High macrophage lipoprotein lipase expression and secretion are associated in inbred murine strains with susceptibility to atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, vol. 13, no. 2, pp. 190–196, Feb. 1993.
- [88] U. Beisiegel, "New aspects on the role of plasma lipases in lipoprotein catabolism and atherosclerosis," *Atherosclerosis*, vol. 124, no. 1, pp. 1–8, Jul. 1996.
- [89] I. J. Edwards, I. J. Goldberg, J. S. Parks, H. Xu, and W. D. Wagner, "Lipoprotein lipase enhances the interaction of low density lipoproteins with artery-derived extracellular matrix proteoglycans," *J. Lipid Res.*, vol. 34, no. 7, pp. 1155–1163, Jul. 1993.
- [90] J. C. Rutledge, M. M. Woo, A. A. Rezai, L. K. Curtiss, and I. J. Goldberg, "Lipoprotein lipase increases lipoprotein binding to the artery wall and increases endothelial layer permeability by formation of lipolysis products," *Circ. Res.*, vol. 80, no. 6, pp. 819–828, Jun. 1997.
- [91] J. C. Mamputu, A. C. Desfaits, and G. Renier, "Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells," *J. Lipid Res.*, vol. 38, no. 9, pp. 1722–1729, Sep. 1997.

- [92] O. Kroupa *et al.*, “Linking nutritional regulation of Angptl4, Gpihbp1, and Lmf1 to lipoprotein lipase activity in rodent adipose tissue,” *BMC Physiol.*, vol. 12, p. 13, Nov. 2012.
- [93] A. Köster *et al.*, “Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism,” *Endocrinology*, vol. 146, no. 11, pp. 4943–4950, Nov. 2005.
- [94] U. Desai *et al.*, “Lipid-lowering effects of anti-angiopoietin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiopoietin-like 4 knockout mice,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 28, pp. 11766–11771, Jul. 2007.
- [95] Y. Kobayashi, T. Nakajima, and I. Inoue, “Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 18, pp. 4701–4710, Sep. 2002.
- [96] V. Sukonina, A. Lookene, T. Olivecrona, and G. Olivecrona, “Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 46, pp. 17450–17455, Nov. 2006.
- [97] K. M. Botham and C. P. D. Wheeler-Jones, “Introduction to the Biochemical Society Focused Meeting on Diet and Cardiovascular Health: chylomicron remnants and their emerging roles in vascular dysfunction in atherosclerosis,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 3, pp. 437–439, Jun. 2007.
- [98] J. S. Perona, M. Avella, K. M. Botham, and V. Ruiz-Gutierrez, “Uptake of triacylglycerol-rich lipoproteins of differing triacylglycerol molecular species and unsaponifiable content by liver cells,” *Br. J. Nutr.*, vol. 95, no. 2006, pp. 889–897, 2006.
- [99] K. I. Stanford *et al.*, “Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 11, pp. 3236–3245, 2009.
- [100] U. Beisiegel, “Lipoprotein metabolism,” *Eur. Heart J.*, vol. 19 Suppl A, pp. A20-23, Feb. 1998.
- [101] M. M. Hussain, “A proposed model for the assembly of chylomicrons,” *Atherosclerosis*, vol. 148, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2000.
- [102] T. L. Errico, X. Chen, J. M. Martin Campos, J. Julve, J. C. Escolà-Gil, and F. Blanco-Vaca, “[Basic mechanisms: structure, function and metabolism of plasma lipoproteins],” *Clin. E Investig. En Arterioscler. Publicacion Of. Soc. Espanola Arterioscler.*, vol. 25, no. 2, pp. 98–103, Jun. 2013.
- [103] A.-E. van der Velde, “Reverse cholesterol transport: from classical view to new insights,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 16, no. 47, pp. 5908–5915, Dec. 2010.

- [104] A. Jonas, "Lecithin cholesterol acyltransferase," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1529, no. 1–3, pp. 245–256, Dec. 2000.
- [105] C. Rosales, B. K. Gillard, A. M. Gotto, and H. J. Pownall, "High-Density Lipoprotein Processing and Premature Cardiovascular Disease," *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.*, vol. 11, no. 3, pp. 181–185, Sep. 2015.
- [106] A. Kratzer, H. Giral, and U. Landmesser, "High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease," *Cardiovasc. Res.*, vol. 103, no. 3, pp. 350–361, Aug. 2014.
- [107] V. R. Babaev *et al.*, "Reduced atherosclerotic lesions in mice deficient for total or macrophage-specific expression of scavenger receptor-A," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. 2593–2599, Dec. 2000.
- [108] M. Febbraio *et al.*, "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 105, no. 8, pp. 1049–1056, Apr. 2000.
- [109] H. S. Kruth, "Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 13, no. 5, pp. 483–488, Oct. 2002.
- [110] E. B. Smith and C. Ashall, "Low-density lipoprotein concentration in interstitial fluid from human atherosclerotic lesions. Relation to theories of endothelial damage and lipoprotein binding," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 754, no. 3, pp. 249–257, Dec. 1983.
- [111] Y. Kojima *et al.*, "Endothelial lipase modulates monocyte adhesion to the vessel wall. A potential role in inflammation," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 52, pp. 54032–54038, Dec. 2004.
- [112] T. Simmons, Y. M. Newhouse, K. S. Arnold, T. L. Innerarity, and K. H. Weisgraber, "Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 41, pp. 25531–25536, Oct. 1997.
- [113] S. C. Blacklow, "Versatility in ligand recognition by LDL receptor family proteins: advances and frontiers," vol. 17, no. 4, pp. 419–426, 2009.
- [114] J. L. Goldstein and M. S. Brown, "Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis," *Circulation*, vol. 76, no. 3, pp. 504–507, Sep. 1987.
- [115] S. H. Gianturco, M. P. Ramprasad, a H. Lin, R. Song, and W. a Bradley, "Cellular binding site and membrane binding proteins for triglyceride-rich lipoproteins in human monocyte-macrophages and THP-1 monocytic cells.," *J. Lipid Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 1674–1687, 1994.
- [116] C. H. Floren and A. Chait, "Uptake of chylomicron remnants by the native LDL receptor in

- human monocyte-derived macrophages,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 665, no. 3, pp. 608–611, Sep. 1981.
- [117] J. L. Ellsworth, F. B. Kraemer, and A. D. Cooper, “Transport of beta-very low density lipoproteins and chylomicron remnants by macrophages is mediated by the low density lipoprotein receptor pathway,” *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 5, pp. 2316–2325, Feb. 1987.
- [118] Y. Fujioka, A. D. Cooper, and L. G. Fong, “Multiple processes are involved in the uptake of chylomicron remnants by mouse peritoneal macrophages,” *J. Lipid Res.*, vol. 39, no. 12, pp. 2339–2349, Dec. 1998.
- [119] C. L. Elsegood, S. Pal, P. D. Roach, and J. C. Mamo, “Binding and uptake of chylomicron remnants by primary and THP-1 human monocyte-derived macrophages: determination of binding proteins,” *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 101, pp. 111–119, 2001.
- [120] M. S. Brown, J. L. Goldstein, M. Krieger, Y. K. Ho, and R. G. Anderson, “Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins,” *J. Cell Biol.*, vol. 82, no. 3, pp. 597–613, Sep. 1979.
- [121] B. Yazgan, S. Ustunsoy, B. Karademir, and N. Kartal-Ozer, “CD36 as a biomarker of atherosclerosis,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 75 Suppl 1, p. S10, Oct. 2014.
- [122] M. S. Brown, S. K. Basu, J. R. Falck, Y. K. Ho, and J. L. Goldstein, “The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages,” *J. Supramol. Struct.*, vol. 13, no. 1, pp. 67–81, 1980.
- [123] T. Kodama, M. Freeman, L. Rohrer, J. Zabrecky, P. Matsudaira, and M. Krieger, “Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils,” *Nature*, vol. 343, no. 6258, pp. 531–535, Feb. 1990.
- [124] N. V. L. Yap, F. J. Whelan, D. M. E. Bowdish, and G. B. Golding, “The Evolution of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain of the Class A Scavenger Receptors,” *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 342, 2015.
- [125] P. J. Gough, D. R. Greaves, and S. Gordon, “A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake,” *J. Lipid Res.*, vol. 39, no. 3, pp. 531–543, Mar. 1998.
- [126] M. Naito, H. Suzuki, T. Mori, A. Matsumoto, T. Kodama, and K. Takahashi, “Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions,” *Am. J. Pathol.*, vol. 141, no. 3, pp. 591–599, Sep. 1992.
- [127] H. Suzuki *et al.*, “A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection,” *Nature*, vol. 386, no. 6622, pp. 292–296, Mar. 1997.

- [128] V. V. Kunjathoor *et al.*, “Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 51, pp. 49982–49988, Dec. 2002.
- [129] D. Teupser, O. Stein, R. Burkhardt, K. Nebendahl, Y. Stein, and J. Thiery, “Scavenger receptor activity is increased in macrophages from rabbits with low atherosclerotic response: studies in normocholesterolemic high and low atherosclerotic response rabbits,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, no. 5, pp. 1299–1305, May 1999.
- [130] J. E. Murphy, P. R. Tedbury, S. Homer-Vanniasinkam, J. H. Walker, and S. Ponnambalam, “Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors,” *Atherosclerosis*, vol. 182, no. 1, pp. 1–15, Sep. 2005.
- [131] M. Febbraio, E. Guy, and R. L. Silverstein, “Stem cell transplantation reveals that absence of macrophage CD36 is protective against atherosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 12, pp. 2333–2338, Dec. 2004.
- [132] K. J. Moore *et al.*, “Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice,” *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 8, pp. 2192–2201, Aug. 2005.
- [133] S. L. Acton, P. E. Scherer, H. F. Lodish, and M. Krieger, “Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor,” *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 33, pp. 21003–21009, Aug. 1994.
- [134] S. Acton, A. Rigotti, K. T. Landschulz, S. Xu, H. H. Hobbs, and M. Krieger, “Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor,” *Science*, vol. 271, no. 5248, pp. 518–520, Jan. 1996.
- [135] M. Van Eck, I. S. T. Bos, R. B. Hildebrand, B. T. Van Rij, and T. J. C. Van Berkel, “Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development,” *Am. J. Pathol.*, vol. 165, no. 3, pp. 785–794, Sep. 2004.
- [136] D. B. Zilversmit, “Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins,” *Clin. Chem.*, vol. 41, no. 1, pp. 153–158, Jan. 1995.
- [137] N. J. Stone *et al.*, “Treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults: synopsis of the 2013 American College of Cardiology/American Heart Association cholesterol guideline,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 160, no. 5, pp. 339–343, Mar. 2014.
- [138] A. B. Jørgensen, R. Frikke-Schmidt, A. S. West, P. Grande, B. G. Nordestgaard, and A. Tybjaerg-Hansen, “Genetically elevated non-fasting triglycerides and calculated remnant cholesterol as causal risk factors for myocardial infarction,” *Eur. Heart J.*, vol. 34, no. 24, pp. 1826–1833, Jun. 2013.

- [139] F. Karpe, "Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis," *J. Intern. Med.*, vol. 246, no. 4, pp. 341–355, Oct. 1999.
- [140] J. H. Rapp *et al.*, "Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selected-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque," *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, vol. 14, no. 11, pp. 1767–1774, Nov. 1994.
- [141] S. D. Proctor and J. C. Mamo, "Retention of fluorescent-labelled chylomicron remnants within the intima of the arterial wall--evidence that plaque cholesterol may be derived from post-prandial lipoproteins," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 28, no. 6, pp. 497–503, Jun. 1998.
- [142] J. C. Mamo and J. R. Wheeler, "Chylomicrons or their remnants penetrate rabbit thoracic aorta as efficiently as do smaller macromolecules, including low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, and albumin," *Coron. Artery Dis.*, vol. 5, no. 8, pp. 695–705, Aug. 1994.
- [143] S. Patel *et al.*, "Acute hypertriglyceridaemia in humans increases the triglyceride content and decreases the anti-inflammatory capacity of high density lipoproteins," *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 2, pp. 424–428, Jun. 2009.
- [144] K. V. Batt, M. Avella, E. H. Moore, B. Jackson, K. E. Suckling, and K. M. Botham, "Differential effects of low-density lipoprotein and chylomicron remnants on lipid accumulation in human macrophages," *Exp. Biol. Med. Maywood NJ*, vol. 229, no. 6, pp. 528–537, Jun. 2004.
- [145] S. H. Gianturco and W. A. Bradley, "Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: cellular aspects," *Clin. Cardiol.*, vol. 22, no. 6 Suppl, pp. II7-14, Jun. 1999.
- [146] M. C. Wyler von Ballmoos, B. Haring, and F. M. Sacks, "The risk of cardiovascular events with increased apolipoprotein CIII: A systematic review and meta-analysis," *J. Clin. Lipidol.*, vol. 9, no. 4, pp. 498–510, Aug. 2015.
- [147] S. Hardy, Y. Langelier, and M. Prentki, "Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 22, pp. 6353–6358, Nov. 2000.
- [148] M. B. Paumen, Y. Ishida, M. Muramatsu, M. Yamamoto, and T. Honjo, "Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 6, pp. 3324–3329, Feb. 1997.
- [149] W. Chang, J. Lin, J. Dong, and D. Li, "Pyroptosis: an inflammatory cell death implicates in atherosclerosis," *Med. Hypotheses*, vol. 81, no. 3, pp. 484–486, Sep. 2013.
- [150] K. Nakajima *et al.*, "Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons," *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 412, no. 15–16, pp. 1306–1318, Jul. 2011.
- [151] S. Bansal, J. E. Buring, N. Rifai, S. Mora, F. M. Sacks, and P. M. Ridker, "Fasting

- compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women,” *JAMA*, vol. 298, no. 3, pp. 309–316, Jul. 2007.
- [152] B. G. Nordestgaard, M. Benn, P. Schnohr, and A. Tybjaerg-Hansen, “[Non-fasting triglycerides and risk of for myocardial infarction and death among women and men],” *Ugeskr. Laeger*, vol. 169, no. 45, pp. 3865–3868, Nov. 2007.
- [153] J. S. Cohn, J. R. McNamara, and E. J. Schaefer, “Lipoprotein cholesterol concentrations in the plasma of human subjects as measured in the fed and fasted states,” *Clin. Chem.*, vol. 34, no. 12, pp. 2456–2459, Dec. 1988.
- [154] J. R. Patsch *et al.*, “Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state,” *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1336–1345, Nov. 1992.
- [155] M. Guerin *et al.*, “Cholesteryl ester flux from HDL to VLDL-1 is preferentially enhanced in type IIB hyperlipidemia in the postprandial state,” *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 10, pp. 1652–1660, Oct. 2002.
- [156] K. G. Jackson *et al.*, “Impact of age and menopausal status on the postprandial triacylglycerol response in healthy women,” *Atherosclerosis*, vol. 208, no. 1, pp. 246–252, Jan. 2010.
- [157] J. C. Fruchart, H. B. Brewer, and E. Leitersdorf, “Consensus for the use of fibrates in the treatment of dyslipoproteinemia and coronary heart disease. Fibrate Consensus Group,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 81, no. 7, pp. 912–917, Apr. 1998.
- [158] R. Ross, “Atherosclerosis--an inflammatory disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, no. 2, pp. 115–126, Jan. 1999.
- [159] P. Libby, “Inflammation in atherosclerosis,” *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 868–874, Dec. 2002.
- [160] K. G. Jackson, S. D. Poppitt, and A. M. Minihane, “Postprandial lipemia and cardiovascular disease risk: Interrelationships between dietary, physiological and genetic determinants,” *Atherosclerosis*, vol. 220, no. 1, pp. 22–33, Jan. 2012.
- [161] J. S. Cohn, “Postprandial lipemia and remnant lipoproteins,” *Clin. Lab. Med.*, vol. 26, no. 4, pp. 773–786, Dec. 2006.
- [162] J. B. Christian, N. Bourgeois, R. Snipes, and K. A. Lowe, “Prevalence of severe (500 to 2,000 mg/dl) hypertriglyceridemia in United States adults,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 107, no. 6, pp. 891–897, Mar. 2011.
- [163] N. Sarwar *et al.*, “Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies,” *Circulation*, vol. 115, no. 4, pp.

450–458, Jan. 2007.

- [164] M. Miller *et al.*, “Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 51, no. 7, pp. 724–730, Feb. 2008.
- [165] G. Yuan, K. Z. Al-Shali, and R. A. Hegele, “Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment,” *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.*, vol. 176, no. 8, pp. 1113–1120, Apr. 2007.
- [166] “WHO | Obesity and overweight,” *WHO*. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. [Accessed: 09-Mar-2017].
- [167] M. M. Finucane *et al.*, “National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 377, no. 9765, pp. 557–567, Feb. 2011.
- [168] G. A. Stevens *et al.*, “National, regional, and global trends in adult overweight and obesity prevalences,” *Popul. Health Metr.*, vol. 10, no. 1, p. 22, Nov. 2012.
- [169] M. Ng *et al.*, “Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013,” *The Lancet*, vol. 384, no. 9945, pp. 766–781, 2014.
- [170] B. Samb *et al.*, “Prevention and management of chronic disease: a litmus test for health-systems strengthening in low-income and middle-income countries,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 376, no. 9754, pp. 1785–1797, Nov. 2010.
- [171] S. S. Lim *et al.*, “A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 380, no. 9859, pp. 2224–2260, Dec. 2012.
- [172] R. Dobbs *et al.*, “How the world could better fight obesity | McKinsey & Company.” [Online]. Available: <http://www.mckinsey.com/industries/healthcare-systems-and-services/our-insights/how-the-world-could-better-fight-obesity>. [Accessed: 09-Mar-2017].
- [173] OECD, “Obesity Update,” June, 2014.
- [174] A. Berrington de Gonzalez *et al.*, “Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 23, pp. 2211–2219, Dec. 2010.
- [175] S. Jonsson, B. Hedblad, G. Engström, P. Nilsson, G. Berglund, and L. Janzon, “Influence of obesity on cardiovascular risk. Twenty-three-year follow-up of 22,025 men from an urban Swedish population,” *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.*, vol. 26, no.

8, pp. 1046–1053, Aug. 2002.

- [176] P. Poirier *et al.*, “Bariatric surgery and cardiovascular risk factors: a scientific statement from the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 123, no. 15, pp. 1683–1701, Apr. 2011.
- [177] J. Vendrell *et al.*, “Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity,” *Obes. Res.*, vol. 12, no. 6, pp. 962–971, Jun. 2004.
- [178] G. Varela-Moreiras *et al.*, “Obesidad y sedentarismo en el siglo XXI: ¿qué se puede y se debe hacer?,” *Nutr. Hosp.*, vol. 28, pp. 1–12, Sep. 2013.
- [179] “International Obesity Task Force.”
- [180] M. V. D. García, G. G. H. Bravo, and A. A. M. López, “La reacción inflamatoria en la fisiopatogenia de la obesidad,” *Cienc. -Sum*, vol. 19, no. 1, pp. 75–82, 2012.
- [181] M. Laclaustra, D. Corella, and J. M. Ordovas, “Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*, vol. 17, no. 2, pp. 125–139, Feb. 2007.
- [182] R. Monteiro and I. Azevedo, “Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2010, no. Atp Iii, 2010.
- [183] B. V. Howard, G. Ruotolo, and D. C. Robbins, “Obesity and dyslipidemia,” *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, vol. 32, no. 4, pp. 855–867, Dec. 2003.
- [184] J. K. Sethi and A. J. Vidal-Puig, “Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation,” *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 6, pp. 1253–1262, Jun. 2007.
- [185] S. Schenk, M. Saberi, and J. M. Olefsky, “Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation,” *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 9, pp. 2992–3002, Sep. 2008.
- [186] J. Turinsky, D. M. O’Sullivan, and B. P. Bayly, “1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo,” *J. Biol. Chem.*, vol. 265, no. 28, pp. 16880–16885, Oct. 1990.
- [187] L. F. Van Gaal, “Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease,” *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 12, no. February, p. 21, 2010.
- [188] B. V. Howard *et al.*, “LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL: The Strong Heart Study,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 830–835, Mar. 2000.
- [189] D. C. Chan, G. F. Watts, T. G. Redgrave, T. A. Mori, and P. H. R. Barrett, “Apolipoprotein B-100 kinetics in visceral obesity: associations with plasma apolipoprotein C-III concentration,” *Metabolism.*, vol. 51, no. 8, pp. 1041–1046, Aug. 2002.
- [190] A. Kawakami *et al.*, “Toll-like receptor 2 mediates apolipoprotein CIII-induced monocyte

- activation,” *Circ. Res.*, vol. 103, no. 12, pp. 1402–1409, Dec. 2008.
- [191] C. A. Janeway and R. Medzhitov, “Innate immune recognition,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, pp. 197–216, 2002.
- [192] “International Diabetes Federation (2010) IDF worldwide definition of the metabolic syndrome. [http://www.idf.org/idf-worldwide-definition-metabolic-syndrome.](http://www.idf.org/idf-worldwide-definition-metabolic-syndrome)” .
- [193] S. M. Grundy *et al.*, “Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement: Executive Summary,” *Crit. Pathw. Cardiol.*, vol. 4, no. 4, pp. 198–203, Dec. 2005.
- [194] G. M. Reaven, “Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988,” *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif*, vol. 13, no. 1, p. 65; discussion 64, 66, Jan. 1997.
- [195] D. B. Carr *et al.*, “Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome,” *Diabetes*, vol. 53, no. 8, pp. 2087–2094, Aug. 2004.
- [196] J. Tong *et al.*, “Intra-abdominal fat accumulation predicts the development of the metabolic syndrome in non-diabetic Japanese-Americans,” *Diabetologia*, vol. 50, no. 6, pp. 1156–1160, Jun. 2007.
- [197] T. Wilsgaard and B. K. Jacobsen, “Lifestyle factors and incident metabolic syndrome. The Tromsø Study 1979-2001,” *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 78, no. 2, pp. 217–224, Nov. 2007.
- [198] G. S. Hotamisligil, “Inflammation and metabolic disorders,” *Nature*, vol. 444, no. 7121, pp. 860–867, Dec. 2006.
- [199] C. N. Serhan, “Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, pp. 101–137, 2007.
- [200] G. J. Bellingan *et al.*, “Adhesion molecule-dependent mechanisms regulate the rate of macrophage clearance during the resolution of peritoneal inflammation,” *J. Exp. Med.*, vol. 196, no. 11, pp. 1515–1521, Dec. 2002.
- [201] M.-L. N. Huynh, V. A. Fadok, and P. M. Henson, “Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation,” *J. Clin. Invest.*, vol. 109, no. 1, pp. 41–50, Jan. 2002.
- [202] J. Nijhuis, S. S. Rensen, Y. Slaats, F. M. H. van Dielen, W. A. Buurman, and J. W. M. Greve, “Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation,” *Obes. Silver Spring Md*, vol. 17, no. 11, pp. 2014–2018, Nov. 2009.
- [203] S. P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel, and A. W. Ferrante, “Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue,” *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 12, pp. 1796–1808, Dec. 2003.

- [204] Yu, R., Kwon, B.S., Kawada, T, “Chemokines as novel target for obesity-related pathologies. Japanese Society in Study of Obesity, 11 (3), 27-34.” 2005.
- [205] L. Schwingshackl and G. Hoffmann, “Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: A systematic review and meta-analysis of intervention trials,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 24, no. 9, pp. 929–939, 2014.
- [206] P. Dandona, A. Aljada, and A. Bandyopadhyay, “Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes,” *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 1, pp. 4–7, Jan. 2004.
- [207] C. M. Apovian and N. Gokce, “Obesity and cardiovascular disease,” *Circulation*, vol. 125, no. 9, pp. 1178–1182, Mar. 2012.
- [208] P. Ziccardi *et al.*, “Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year,” *Circulation*, vol. 105, no. 7, pp. 804–809, Feb. 2002.
- [209] B. J. Nicklas *et al.*, “Diet-induced weight loss, exercise, and chronic inflammation in older, obese adults: a randomized controlled clinical trial,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 4, pp. 544–551, Apr. 2004.
- [210] H.-P. Kopp, K. Krzyzanowska, M. Möhlig, J. Spranger, A. F. H. Pfeiffer, and G. Schernthaner, “Effects of marked weight loss on plasma levels of adiponectin, markers of chronic subclinical inflammation and insulin resistance in morbidly obese women,” *Int. J. Obes. 2005*, vol. 29, no. 7, pp. 766–771, Jul. 2005.
- [211] H. P. Kopp *et al.*, “Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 1042–1047, Jun. 2003.
- [212] D. C. W. Lau, B. Dhillon, H. Yan, P. E. Szmitko, and S. Verma, “Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis,” *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 288, no. 5, pp. H2031-2041, May 2005.
- [213] G. S. Hotamisligil, N. S. Shargill, and B. M. Spiegelman, “Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance,” *Science*, vol. 259, no. 5091, pp. 87–91, Jan. 1993.
- [214] M. Kawakami, P. H. Pekala, M. D. Lane, and A. Cerami, “Lipoprotein lipase suppression in 3T3-L1 cells by an endotoxin-induced mediator from exudate cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 3, pp. 912–916, Feb. 1982.
- [215] M. Sumida, K. Sekiya, H. Okuda, Y. Tanaka, and T. Shiosaka, “Inhibitory effect of tumor necrosis factor on gene expression of hormone sensitive lipase in 3T3-L1 adipocytes,” *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 107, no. 1, pp. 1–2, Jan. 1990.

- [216] G. S. Hotamisligil, "Inflammatory pathways and insulin action," *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.*, vol. 27 Suppl 3, pp. S53-55, Dec. 2003.
- [217] G. S. Hotamisligil and B. M. Spiegelman, "Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link," *Diabetes*, vol. 43, no. 11, pp. 1271–1278, Nov. 1994.
- [218] P. Dandona, R. Weinstock, K. Thusu, E. Abdel-Rahman, A. Aljada, and T. Wadden, "Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 83, no. 8, pp. 2907–2910, Aug. 1998.
- [219] B. E. Wisse, "The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity," *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*, vol. 15, no. 11, pp. 2792–2800, Nov. 2004.
- [220] K. E. Wellen and G. S. Hotamisligil, "Inflammation, stress, and diabetes," *J. Clin. Invest.*, vol. 115, no. 5, pp. 1111–1119, May 2005.
- [221] E. Dragomir and M. Simionescu, "Monocyte chemoattractant protein-1--a major contributor to the inflammatory process associated with diabetes," *Arch. Physiol. Biochem.*, vol. 112, no. 4–5, pp. 239–244, Dec. 2006.
- [222] B. J. Rollins, "Chemokines," *Blood*, vol. 90, no. 3, pp. 909–928, Aug. 1997.
- [223] M. Takeya, T. Yoshimura, E. J. Leonard, and K. Takahashi, "Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody," *Hum. Pathol.*, vol. 24, no. 5, pp. 534–539, May 1993.
- [224] L. Gu *et al.*, "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice," *Mol. Cell*, vol. 2, no. 2, pp. 275–281, Aug. 1998.
- [225] P. Sartipy and D. J. Loskutoff, "Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 12, pp. 7265–7270, Jun. 2003.
- [226] V. Llorente-Cortés *et al.*, "Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk," *Atherosclerosis*, vol. 208, no. 2, pp. 442–450, 2010.
- [227] S. Nomura, A. Shouzu, S. Omoto, M. Nishikawa, and S. Fukuhara, "Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 121, no. 3, pp. 437–443, Sep. 2000.
- [228] P. G. Tipping and W. W. Hancock, "Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques," *Am. J. Pathol.*, vol. 142, no. 6, pp. 1721–1728, Jun. 1993.

- [229] M. P. Bevilacqua, J. S. Pober, G. R. Majeau, W. Fiers, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone, "Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 12, pp. 4533–4537, Jun. 1986.
- [230] P. Libby, D. J. Wyler, M. W. Janicka, and C. A. Dinarello, "Differential effects of human interleukin-1 on growth of human fibroblasts and vascular smooth muscle cells," *Arterioscler. Dallas Tex*, vol. 5, no. 2, pp. 186–191, Apr. 1985.
- [231] M. P. Bevilacqua, J. S. Pober, M. E. Wheeler, R. S. Cotran, and M. A. Gimbrone, "Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines," *J. Clin. Invest.*, vol. 76, no. 5, pp. 2003–2011, Nov. 1985.
- [232] T. Yamauchi *et al.*, "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity," *Nat. Med.*, vol. 7, no. 8, pp. 941–946, Aug. 2001.
- [233] Y. Matsuzawa, "The metabolic syndrome and adipocytokines," *FEBS Lett.*, vol. 580, no. 12, pp. 2917–2921, May 2006.
- [234] N. Ouchi *et al.*, "Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin," *Circulation*, vol. 100, no. 25, pp. 2473–2476, Dec. 1999.
- [235] N. Ouchi *et al.*, "Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages," *Circulation*, vol. 103, no. 8, pp. 1057–1063, Feb. 2001.
- [236] Y. Arita *et al.*, "Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell," *Circulation*, vol. 105, no. 24, pp. 2893–2898, Jun. 2002.
- [237] K. Hotta *et al.*, "Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 6, pp. 1595–1599, Jun. 2000.
- [238] M. Kumada *et al.*, "Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 85–89, Jan. 2003.
- [239] G. Fantuzzi and R. Faggioni, "Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 68, no. 4, pp. 437–446, Oct. 2000.
- [240] S. Aydin, A. O. Barim, and O. Akin, "Ghrelin and leptin concentrations in obsessive-compulsive disorder: commentary," *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 32, no. 2, p. 601, Feb. 2008.
- [241] C. Buettner *et al.*, "Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent

- mechanisms,” *Nat. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 667–675, Jun. 2008.
- [242] R. V. Considine, “Regulation of leptin production,” *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 2, no. 4, pp. 357–363, Oct. 2001.
- [243] M. Lehrke *et al.*, “Serum concentrations of cortisol, interleukin 6, leptin and adiponectin predict stress induced insulin resistance in acute inflammatory reactions,” *Crit. Care Lond. Engl.*, vol. 12, no. 6, p. R157, 2008.
- [244] A. Minocci *et al.*, “Leptin plasma concentrations are dependent on body fat distribution in obese patients,” *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.*, vol. 24, no. 9, pp. 1139–1144, Sep. 2000.
- [245] S. Loffreda *et al.*, “Leptin regulates proinflammatory immune responses,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 57–65, Jan. 1998.
- [246] Q. L. K. Lam and L. Lu, “Role of leptin in immunity,” *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–13, Feb. 2007.
- [247] S. Konstantinides, K. Schäfer, S. Koschnick, and D. J. Loskutoff, “Leptin-dependent platelet aggregation and arterial thrombosis suggests a mechanism for atherothrombotic disease in obesity,” *J. Clin. Invest.*, vol. 108, no. 10, pp. 1533–1540, Nov. 2001.
- [248] A. Singhal *et al.*, “Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease?,” *Circulation*, vol. 106, no. 15, pp. 1919–1924, Oct. 2002.
- [249] M. Bulló, P. García-Lorda, I. Megias, and J. Salas-Salvadó, “Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression,” *Obes. Res.*, vol. 11, no. 4, pp. 525–531, Apr. 2003.
- [250] C. J. Hukshorn *et al.*, “Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, no. 4, pp. 1773–1778, Apr. 2004.
- [251] M. Visser, L. M. Bouter, G. M. McQuillan, M. H. Wener, and T. B. Harris, “Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults,” *JAMA*, vol. 282, no. 22, pp. 2131–2135, Dec. 1999.
- [252] P. Trayhurn and I. S. Wood, “Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue,” *Br. J. Nutr.*, vol. 92, no. 3, pp. 347–355, Sep. 2004.
- [253] A. D. Pradhan, J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, and P. M. Ridker, “C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus,” *JAMA*, vol. 286, no. 3, pp. 327–334, Jul. 2001.
- [254] J. S. Yudkin, C. D. Stehouwer, J. J. Emeis, and S. W. Coppack, “C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*,

vol. 19, no. 4, pp. 972–978, Apr. 1999.

- [255] P. M. Ridker, “C-reactive protein and the prediction of cardiovascular events among those at intermediate risk: moving an inflammatory hypothesis toward consensus,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 21, pp. 2129–2138, May 2007.
- [256] E. Paffen and M. P. M. DeMaat, “C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor?,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 71, no. 1, pp. 30–39, Jul. 2006.
- [257] A. K. Shrivastava, H. V. Singh, A. Raizada, and S. K. Singh, “C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease,” *Egypt. Heart J.*, vol. 67, no. 2, pp. 89–97, 2015.
- [258] R. R. S. Packard and P. Libby, “Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction,” *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 1, pp. 24–38, Jan. 2008.
- [259] Saenko EL, “Biological functions of ceruloplasmin expressed through copper-binding sites and a cellular receptor,” *J Trace Elem Exp Med*, vol. 7, p. 69–88., 1994.
- [260] N. Shukla, J. Maher, J. Masters, G. D. Angelini, and J. Y. Jeremy, “Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?,” *Atherosclerosis*, vol. 187, no. 2, pp. 238–250, Aug. 2006.
- [261] P. L. Fox, B. Mazumder, E. Ehrenwald, and C. K. Mukhopadhyay, “Ceruloplasmin and cardiovascular disease,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 28, no. 12, pp. 1735–1744, Jun. 2000.
- [262] S. Taysi, F. Polat, M. Gul, R. A. Sari, and E. Bakan, “Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis,” *Rheumatol. Int.*, vol. 21, no. 5, pp. 200–204, Mar. 2002.
- [263] O. Y. Kim, M. J. Shin, J. Moon, and J. H. Chung, “Plasma ceruloplasmin as a biomarker for obesity: A proteomic approach,” *Clin. Biochem.*, vol. 44, no. 5–6, pp. 351–356, 2011.
- [264] P. Lind, B. Hedblad, L. Stavenow, L. Janzon, K. F. Eriksson, and F. Lindgärde, “Influence of plasma fibrinogen levels on the incidence of myocardial infarction and death is modified by other inflammation-sensitive proteins: a long-term cohort study,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, no. 3, pp. 452–458, Mar. 2001.
- [265] G. Engström, P. Lind, B. Hedblad, L. Stavenow, L. Janzon, and F. Lindgärde, “Effects of cholesterol and inflammation-sensitive plasma proteins on incidence of myocardial infarction and stroke in men,” *Circulation*, vol. 105, no. 22, pp. 2632–2637, Jun. 2002.
- [266] V. Panichi *et al.*, “The link of biocompatibility to cytokine production,” *Kidney Int. Suppl.*, vol. 76, pp. S96-103, Aug. 2000.
- [267] E. Gonzalez-Jimenez, J. Schmidt-Riovalle, L. Sinausia, M. Carmen Valenza, and J. S. Perona, “Predictive value of ceruloplasmin for metabolic syndrome in adolescents,” *BioFactors Oxf. Engl.*, vol. 42, no. 2, pp. 163–170, 2016.

- [268] F. B. Hu and W. C. Willett, "Optimal diets for prevention of coronary heart disease," *JAMA*, vol. 288, no. 20, pp. 2569–2578, Nov. 2002.
- [269] D. Mozaffarian, L. J. Appel, and L. Van Horn, "Components of a cardioprotective diet: new insights," *Circulation*, vol. 123, no. 24, pp. 2870–2891, Jun. 2011.
- [270] F. B. Hu, "Dietary pattern analysis: a new direction in nutritional epidemiology," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 13, no. 1, pp. 3–9, Feb. 2002.
- [271] D. R. Labarthe and S. B. Dunbar, "Global cardiovascular health promotion and disease prevention: 2011 and beyond," *Circulation*, vol. 125, no. 21, pp. 2667–2676, May 2012.
- [272] S. A. Schroeder, "Shattuck Lecture. We can do better--improving the health of the American people," *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 12, pp. 1221–1228, Sep. 2007.
- [273] P. Kris-Etherton, R. H. Eckel, B. V. Howard, S. St Jeor, T. L. Bazzarre, and Nutrition Committee Population Science Committee and Clinical Science Committee of the American Heart Association, "AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease," *Circulation*, vol. 103, no. 13, pp. 1823–1825, Apr. 2001.
- [274] I. Nut, C. D. Investigacio, C. Interuniversitario, I. D. Nutricio, D. Foundation, and U. La, "Editorial The Mediterranean diet : culture , health and science q British Journal of Nutrition," no. 2015, pp. 3–5, 2015.
- [275] W. C. Willett *et al.*, "Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 61, no. 6 Suppl, p. 1402S–1406S, Jun. 1995.
- [276] J. Stamler, "Toward a modern Mediterranean diet for the 21st century," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*, vol. 23, no. 12, pp. 1159–1162, Dec. 2013.
- [277] M. A. Martínez-González and N. Martín-Calvo, "Mediterranean diet and life expectancy; beyond olive oil, fruits, and vegetables," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 19, no. 6, pp. 401–407, Nov. 2016.
- [278] M. A. Martínez-González and M. Bes-Rastrollo, "Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 25, no. 1, pp. 20–26, Feb. 2014.
- [279] M. A. Martínez-González, J. Salas-Salvadó, R. Estruch, D. Corella, M. Fitó, and E. Ros, "Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study," *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 58, no. 1, pp. 50–60, 2015.
- [280] F. Sofi, C. Macchi, R. Abbate, G. F. Gensini, and A. Casini, "Mediterranean diet and health status: an updated meta-analysis and a proposal for a literature-based adherence score," *Public Health Nutr.*, vol. 17, no. 12, pp. 2769–2782, Dec. 2014.

- [281] R. J. Widmer, A. J. Flammer, L. O. Lerman, and A. Lerman, “The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease,” *Am. J. Med.*, vol. 128, no. 3, pp. 229–238, 2015.
- [282] A. Keys *et al.*, “Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40-59 in seven countries,” *Acta Med. Scand. Suppl.*, vol. 460, pp. 1–392, 1966.
- [283] A. Keys *et al.*, “The diet and 15-year death rate in the seven countries study,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 124, no. 6, pp. 903–915, Dec. 1986.
- [284] M. de Lorgeril *et al.*, “Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 343, no. 8911, pp. 1454–1459, Jun. 1994.
- [285] M. de Lorgeril, P. Salen, J. L. Martin, I. Monjaud, J. Delaye, and N. Mamelle, “Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study,” *Circulation*, vol. 99, no. 6, pp. 779–785, Feb. 1999.
- [286] M. A. Martínez-González *et al.*, “Benefits of the Mediterranean Diet: Insights From the PREDIMED Study,” *Prog. Cardiovasc. Dis.*, vol. 58, no. 1, pp. 50–60, Aug. 2015.
- [287] R. Estruch *et al.*, “Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, no. 14, pp. 1279–1290, Apr. 2013.
- [288] E. Toledo *et al.*, “Effect of the Mediterranean diet on blood pressure in the PREDIMED trial: results from a randomized controlled trial,” *BMC Med.*, vol. 11, p. 207, Sep. 2013.
- [289] A. Sala-Vila *et al.*, “Changes in ultrasound-assessed carotid intima-media thickness and plaque with a Mediterranean diet: a substudy of the PREDIMED trial,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 34, no. 2, pp. 439–445, Feb. 2014.
- [290] M. Fitó *et al.*, “Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial,” *Arch. Intern. Med.*, vol. 167, no. 11, pp. 1195–1203, Jun. 2007.
- [291] J. Salas-Salvadó *et al.*, “Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 62, no. 5, pp. 651–659, May 2008.
- [292] D. Lairon, “Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 10, pp. 1209–1214, Oct. 2007.
- [293] L. Schwingshackl and G. Hoffmann, “Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease: synopsis of the evidence available from systematic reviews and meta-analyses,” *Nutrients*, vol. 4, no. 12, pp. 1989–2007, Dec. 2012.
- [294] V. Ruiz-Gutiérrez, J. S. Perona, “The most ancient functional food in history,” *Chevreur Medal Lect.*, vol. 18 (3), 2007.
- [295] R. Rodríguez-Rodríguez, M. D. Herrera, M. A. de Sotomayor, and V. Ruiz-Gutiérrez,

- “Effects of pomace olive oil-enriched diets on endothelial function of small mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats,” *Br. J. Nutr.*, vol. 102, no. 10, pp. 1435–1444, Nov. 2009.
- [296] G. Beltrán, C. Del Rio, S. Sánchez, and L. Martínez, “Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 11, pp. 3434–3440, Jun. 2004.
- [297] C. Di Vaio, S. Nocerino, A. Paduano, and R. Sacchi, “Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 5, pp. 1134–1139, Mar. 2013.
- [298] A. Quintero-Flórez, L. Sinausia Nieva, A. Sánchez-Ortíz, G. Beltrán, and J. S. Perona, “The Fatty Acid Composition of Virgin Olive Oil from Different Cultivars Is Determinant for Foam Cell Formation by Macrophages,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 63, no. 30, pp. 6731–6738, 2015.
- [299] B. Bermudez *et al.*, “Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 17, no. 8, pp. 831–843, 2011.
- [300] A. Alonso, V. Ruiz-Gutierrez, and M. A. Martínez-González, “Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence,” *Public Health Nutr.*, vol. 9, no. 2, pp. 251–257, Apr. 2006.
- [301] J. S. Perona, R. Cabello-Moruno, and V. Ruiz-Gutierrez, “The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 7, pp. 429–445, Jul. 2006.
- [302] J. S. Perona, M. Fitó, M.-I. Covas, M. Garcia, and V. Ruiz-Gutierrez, “Olive oil phenols modulate the triacylglycerol molecular species of human very low-density lipoprotein. A randomized, crossover, controlled trial,” *Metabolism.*, vol. 60, no. 6, pp. 893–899, Jun. 2011.
- [303] A. M. Salter, “Dietary fatty acids and cardiovascular disease,” *Anim. Int. J. Anim. Biosci.*, vol. 7 Suppl 1, pp. 163–171, Mar. 2013.
- [304] S. Eguaras, E. Toledo, A. Hernández-Hernández, S. Cervantes, and M. A. Martínez-González, “Better adherence to the mediterranean diet could mitigate the adverse consequences of obesity on cardiovascular disease: The SUN prospective cohort,” *Nutrients*, vol. 7, no. 11, pp. 9154–9162, 2015.
- [305] L. G. Gillingham, S. Harris-Janz, and P. J. H. Jones, “Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors,” *Lipids*, vol. 46, no. 3, pp. 209–228, 2011.
- [306] K. Esposito *et al.*, “Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial,” *JAMA*, vol. 292, no. 12, pp. 1440–1446, Sep. 2004.

- [307] M.-P. Mena *et al.*, “Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 89, no. 1, pp. 248–256, Jan. 2009.
- [308] R. Estruch *et al.*, “Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 145, no. 1, pp. 1–11, Jul. 2006.
- [309] S. Tsimikas, A. Philis-Tsimikas, S. Alexopoulos, F. Sigari, C. Lee, and P. D. Reaven, “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.*, vol. 19, no. 1, pp. 122–130, Jan. 1999.
- [310] M.I. Covas, “Olive oil and the cardiovascular system,” *Pharmacol. Res.*, vol. 55, no. 3, pp. 175–186, Mar. 2007.
- [311] J. Ruano *et al.*, “Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 86, no. 2, pp. 341–346, Aug. 2007.
- [312] C. Bellido *et al.*, “Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 6, pp. 1487–1491, Dec. 2004.
- [313] F. Fuentes *et al.*, “Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgin olive oil and a low-fat diet enriched with alpha-linolenic acid on postprandial endothelial function in healthy men,” *Br. J. Nutr.*, vol. 100, no. 1, pp. 159–165, Jul. 2008.
- [314] P. Bogani, C. Galli, M. Villa, and F. Visioli, “Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil,” *Atherosclerosis*, vol. 190, no. 1, pp. 181–186, Jan. 2007.
- [315] Y. Jiménez-Gómez *et al.*, “Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men,” *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 2, pp. e70-76, Jun. 2009.
- [316] M. P. J. de Winther, E. Kanters, G. Kraal, and M. H. Hofker, “Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 5, pp. 904–914, May 2005.
- [317] P. Yaqoob, E. A. Newsholme, and P. C. Calder, “Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids,” *Immunol. Lett.*, vol. 41, no. 2–3, pp. 241–247, Jul. 1994.
- [318] M. M. El Seweid, S. E. El-Swefy, F. R. Abdallah, and R. M. Hashem, “Dietary fatty acid unsaturation levels, lipoprotein oxidation and circulating chemokine in experimentally induced atherosclerotic rats,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 57, no. 11, pp. 1467–1474, Nov. 2005.

- [319] R. de la Puerta, A. Marquez-Martin, A. Fernandez-Arche, and V. Ruiz-Gutierrez, "Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages," *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif*, vol. 25, no. 5, pp. 548–554, May 2009.
- [320] E. K. Vassiliou, A. Gonzalez, C. Garcia, J. H. Tadros, G. Chakraborty, and J. H. Toney, "Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems," *Lipids Health Dis.*, vol. 8, p. 25, Jun. 2009.
- [321] J. Fan and T. Watanabe, "Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis," *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 10, no. 2, pp. 63–71, 2003.
- [322] J. L. Peñalvo *et al.*, "Greater adherence to a Mediterranean dietary pattern is associated with improved plasma lipid profile: the Aragon Health Workers Study cohort," *Rev. Espanola Cardiol. Engl. Ed*, vol. 68, no. 4, pp. 290–297, Apr. 2015.
- [323] C. D. Gardner and H. C. Kraemer, "Monounsaturated versus polyunsaturated dietary fat and serum lipids. A meta-analysis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 15, no. 11, pp. 1917–1927, Nov. 1995.
- [324] F. B. Hu *et al.*, "Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women," *N. Engl. J. Med.*, vol. 337, no. 21, pp. 1491–1499, Nov. 1997.
- [325] F. H. Mattson and S. M. Grundy, "Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man," *J. Lipid Res.*, vol. 26, no. 2, pp. 194–202, Feb. 1985.
- [326] P. M. Kris-Etherton, "AHA Science Advisory. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. American Heart Association. Nutrition Committee," *Circulation*, vol. 100, no. 11, pp. 1253–1258, Sep. 1999.
- [327] J. J. Moreno and M. T. Mitjavila, "The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review)," *J. Nutr. Biochem.*, vol. 14, no. 4, pp. 182–195, 2003.
- [328] American Heart Association Nutrition Committee *et al.*, "Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee," *Circulation*, vol. 114, no. 1, pp. 82–96, Jul. 2006.
- [329] R. Albertini, R. Moratti, and G. De Luca, "Oxidation of low-density lipoprotein in atherosclerosis from basic biochemistry to clinical studies," *Curr. Mol. Med.*, vol. 2, no. 6, pp. 579–592, Sep. 2002.
- [330] H. Esterbauer, J. Gebicki, H. Puhl, and G. Jürgens, "The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 341–390, Oct. 1992.

- [331] A. F. G. Cicero *et al.*, “Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study,” *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 27, no. 2, pp. 314–320, Apr. 2008.
- [332] J. A. Moreno *et al.*, “A monounsaturated fatty acid-rich diet reduces macrophage uptake of plasma oxidised low-density lipoprotein in healthy young men,” *Br. J. Nutr.*, vol. 100, no. 3, pp. 569–575, Sep. 2008.
- [333] H. Schröder, J. Marrugat, J. Vila, M. I. Covas, and R. Elosua, “Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population,” *J. Nutr.*, vol. 134, no. 12, pp. 3355–3361, Dec. 2004.
- [334] G. Buckland, A. Bach, and L. Serra-Majem, “Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies,” *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.*, vol. 9, no. 6, pp. 582–593, Nov. 2008.
- [335] M. A. Mendez *et al.*, “Adherence to a Mediterranean diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity,” *J. Nutr.*, vol. 136, no. 11, pp. 2934–2938, Nov. 2006.
- [336] S. Eguaras *et al.*, “Does the Mediterranean diet counteract the adverse effects of abdominal adiposity?,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 25, no. 6, pp. 569–574, 2015.
- [337] I. Shai *et al.*, “Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 3, pp. 229–241, Jul. 2008.
- [338] B. V. Howard *et al.*, “Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women’s Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial,” *JAMA*, vol. 295, no. 6, pp. 655–666, Feb. 2006.
- [339] P. J. H. Jones, S. Jew, and S. AbuMweis, “The effect of dietary oleic, linoleic, and linolenic acids on fat oxidation and energy expenditure in healthy men,” *Metabolism.*, vol. 57, no. 9, pp. 1198–1203, Sep. 2008.
- [340] G. J. Schwartz *et al.*, “The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety,” *Cell Metab.*, vol. 8, no. 4, pp. 281–288, Oct. 2008.
- [341] B. Vessby, “Dietary fat and insulin action in humans,” *Br. J. Nutr.*, vol. 83 Suppl 1, pp. S91–96, Mar. 2000.
- [342] J. a Paniagua *et al.*, “A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects.,” *J. Am. Coll. Nutr.*, vol. 26, no. 5, pp. 434–444, 2007.
- [343] M. Shah, B. Adams-Huet, L. Brinkley, S. M. Grundy, and A. Garg, “Lipid, glycemic, and insulin responses to meals rich in saturated, cis-monounsaturated, and polyunsaturated (n-3 and n-6) fatty acids in subjects with type 2 diabetes,” *Diabetes Care*, vol. 30, no. 12, pp. 2993–2998, Dec. 2007.

- [344] F. Pérez-Jiménez *et al.*, “A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons,” *Diabetologia*, vol. 44, no. 11, pp. 2038–2043, Nov. 2001.
- [345] B. Vessby *et al.*, “Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study,” *Diabetologia*, vol. 44, no. 3, pp. 312–319, Mar. 2001.
- [346] A. C. Tierney and H. M. Roche, “The potential role of olive oil-derived MUFA in insulin sensitivity,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 10, pp. 1235–1248, Oct. 2007.
- [347] A. Garg, A. Bonanome, S. M. Grundy, Z. J. Zhang, and R. H. Unger, “Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated-fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 319, no. 13, pp. 829–834, Sep. 1988.
- [348] S. López, B. Bermúdez, Y. M. Pacheco, J. Villar, R. Abia, and F. J. G. Muriana, “Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 88, no. 3, pp. 638–644, Sep. 2008.
- [349] G. Rojo-Martínez *et al.*, “Dietary fatty acids and insulin secretion: a population-based study,” *Eur. J. Clin. Nutr.*, vol. 60, no. 10, pp. 1195–1200, Oct. 2006.
- [350] M. Ryan, D. McInerney, D. Owens, P. Collins, A. Johnson, and G. H. Tomkin, “Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity,” *QJM Mon. J. Assoc. Physicians*, vol. 93, no. 2, pp. 85–91, Feb. 2000.
- [351] L. Schwingshackl, B. Strasser, and G. Hoffmann, “Effects of monounsaturated fatty acids on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis,” *Ann. Nutr. Metab.*, vol. 59, no. 2–4, pp. 176–186, 2011.
- [352] M. P. Hoevenaar-Blom *et al.*, “Mediterranean style diet and 12-year incidence of cardiovascular diseases: the EPIC-NL cohort study,” *PloS One*, vol. 7, no. 9, p. e45458, 2012.
- [353] S. Terés *et al.*, “Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 37, pp. 13811–13816, Sep. 2008.
- [354] L. A. Ferrara, A. S. Raimondi, L. d’Episcopo, L. Guida, A. Dello Russo, and T. Marotta, “Olive oil and reduced need for antihypertensive medications,” *Arch. Intern. Med.*, vol. 160, no. 6, pp. 837–842, Mar. 2000.
- [355] J. S. Perona, J. Cañizares, E. Montero, J. M. Sánchez-Domínguez, A. Catalá, and V. Ruiz-Gutiérrez, “Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects,” *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.*, vol. 23, no. 5, pp. 1113–1121, Oct. 2004.

- [356] F. Barceló *et al.*, “Mediterranean-style diet effect on the structural properties of the erythrocyte cell membrane of hypertensive patients: the Prevencion con Dieta Mediterranea Study,” *Hypertens. Dallas Tex* 1979, vol. 54, no. 5, pp. 1143–1150, Nov. 2009.
- [357] E. Waterman and B. Lockwood, “Active components and clinical applications of olive oil,” *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.*, vol. 12, no. 4, pp. 331–342, Dec. 2007.
- [358] C. De Pascale, M. Avella, J. S. Perona, V. Ruiz-Gutierrez, C. P. D. Wheeler-Jones, and K. M. Botham, “Fatty acid composition of chylomicron remnant-like particles influences their uptake and induction of lipid accumulation in macrophages,” *FEBS J.*, vol. 273, no. 24, pp. 5632–5640, 2006.
- [359] K. M. Botham and C. P. D. Wheeler-Jones, “Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 52, no. 4, pp. 446–464, Oct. 2013.
- [360] R. Cabello-Moruno, J. S. Perona, and V. Ruiz-Gutierrez, “Influence of minor components of olive oils on the composition and size of TRLs and on macrophage receptors involved in foam cell formation,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. Pt 3, pp. 470–471, Jun. 2007.
- [361] V. Konstantinidou *et al.*, “In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial.,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 24, no. 7, pp. 2546–57, 2010.
- [362] E. A. Miles, F. A. Wallace, and P. C. Calder, “An olive oil-rich diet reduces scavenger receptor mRNA in murine macrophages.,” *Br. J. Nutr.*, vol. 85, no. 2, pp. 185–191, 2001.
- [363] J. Luoma *et al.*, “Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions,” *J. Clin. Invest.*, vol. 93, no. 5, pp. 2014–2021, May 1994.
- [364] V. Llorente-Cortés, M. Otero-Viñas, M. Berrozpe, and L. Badimon, “Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 34, no. 3, pp. 182–190, Mar. 2004.
- [365] V. Llorente-Cortés, T. Royo, M. Otero-Viñas, M. Berrozpe, and L. Badimon, “Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 74, no. 3, pp. 526–536, Jun. 2007.
- [366] S. W. Sakr *et al.*, “The uptake and degradation of matrix-bound lipoproteins by macrophages require an intact actin Cytoskeleton, Rho family GTPases, and myosin ATPase activity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 40, pp. 37649–37658, Oct. 2001.
- [367] K. Handschug *et al.*, “Low-density lipoprotein receptor-related protein in atherosclerosis

- development: up-regulation of gene expression in patients with coronary obstruction,” *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, vol. 76, no. 8, pp. 596–600, Jul. 1998.
- [368] S. Schulz *et al.*, “The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis--novel genomic variants and functional consequences,” *Hum. Mutat.*, vol. 20, no. 5, p. 404, Nov. 2002.
- [369] P. Boucher *et al.*, “Effect of dietary cholesterol on low density lipoprotein-receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, and low density lipoprotein receptor-related protein mRNA expression in healthy humans,” *Lipids*, vol. 33, no. 12, pp. 1177–1186, Dec. 1998.
- [370] J.-C. Vallvé *et al.*, “Unsaturated fatty acids and their oxidation products stimulate CD36 gene expression in human macrophages,” *Atherosclerosis*, vol. 164, no. 1, pp. 45–56, Sep. 2002.
- [371] A. Alexander Aguilera, G. Hernández Díaz, M. Lara Barcelata, O. Angulo Guerrero, and R. M. Oliart Ros, “Induction of Cd36 expression elicited by fish oil PUFA in spontaneously hypertensive rats,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17, no. 11, pp. 760–765, Nov. 2006.
- [372] A. C. Nicholson, “Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling,” *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 14, no. 1, pp. 8–12, Jan. 2004.
- [373] L. M. Varela, A. Ortega-Gomez, S. Lopez, R. Abia, F. J. G. Muriana, and B. Bermudez, “The effects of dietary fatty acids on the postprandial triglyceride-rich lipoprotein/apoB48 receptor axis in human monocyte/macrophage cells,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 24, no. 12, pp. 2031–2039, Dec. 2013.
- [374] V. A. Mustad *et al.*, “Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women,” *J. Lipid Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 459–468, Mar. 1997.
- [375] L. Rastrelli, S. Passi, F. Ippolito, G. Vacca, and F. De Simone, “Rate of degradation of alpha-tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 20, pp. 5566–5570, Sep. 2002.
- [376] M. B. Katan *et al.*, “Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels,” *Mayo Clin. Proc.*, vol. 78, no. 8, pp. 965–978, Aug. 2003.
- [377] M. Richelle *et al.*, “Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 1, pp. 171–177, Jul. 2004.
- [378] B. Hansel, R. Courie, Y. Bayet, F. Delestre, and E. Bruckert, “Phytosterols and atherosclerosis,” *Rev. Med. Interne*, vol. 32, no. 2, pp. 124–129, Feb. 2011.
- [379] T. Sudhop, B. M. Gottwald, and K. von Bergmann, “Serum plant sterols as a potential risk

- factor for coronary heart disease,” *Metabolism.*, vol. 51, no. 12, pp. 1519–1521, Dec. 2002.
- [380] E. Psomiadou and M. Tsimidou, “On the role of squalene in olive oil stability,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 47, no. 10, pp. 4025–4032, Oct. 1999.
- [381] C. L. Huang and B. E. Sumpio, “Olive oil, the mediterranean diet, and cardiovascular health,” *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 207, no. 3, pp. 407–416, Sep. 2008.
- [382] D. Raederstorff, “Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review,” *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.- Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.*, vol. 79, no. 3, pp. 152–165, May 2009.
- [383] M. A. Carluccio *et al.*, “Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 4, pp. 622–629, Apr. 2003.
- [384] J. Lopez-Miranda *et al.*, “Olive oil and the haemostatic system,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 51, no. 10, pp. 1249–1259, Oct. 2007.
- [385] S. Cicerale, L. Lucas, and R. Keast, “Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 2, pp. 458–479, Feb. 2010.
- [386] Arbonés-Mainar, J. M., Navarro, M. A., Lou-Bonafonte, J. M., Martínez-Gracia, M. V. *et al.*, in: Vasallo, N. (Ed.), *Olive Oil Phenolic Compounds as Potential Therapeutical Agents*, Nova, La Veletta, 2008. .
- [387] M.I. Covas, V. Konstantinidou, and M. Fitó, “Olive oil and cardiovascular health,” *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, vol. 54, no. 6, pp. 477–482, Dec. 2009.
- [388] S. H. Omar, “Oleuropein in olive and its pharmacological effects,” *Sci. Pharm.*, vol. 78, no. 2, pp. 133–154, Jun. 2010.
- [389] E. Tripoli, M. Giammanco, G. Tabacchi, D. Di Majo, S. Giammanco, and M. La Guardia, “The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health,” *Nutr. Res. Rev.*, vol. 18, no. 1, pp. 98–112, Jun. 2005.
- [390] M. Pérez-Bonilla *et al.*, “Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1112, no. 1–2, pp. 311–318, Apr. 2006.
- [391] S. Acín *et al.*, “Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice,” *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 140, no. 3, pp. 383–391, Sep. 2006.
- [392] L. I. Somova, F. O. Shode, P. Ramnanan, and A. Nadar, “Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 84, no. 2–3, pp. 299–305, Feb. 2003.
- [393] K. Yunoki *et al.*, “Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNA microarray analysis,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no.

24, pp. 12052–12058, Dec. 2008.

- [394] Y. Allouche, G. Beltrán, J. J. Gaforio, M. Uceda, and M. D. Mesa, “Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids,” *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 48, no. 10, pp. 2885–2890, Oct. 2010.
- [395] A. Márquez Martín, R. de la Puerta Vázquez, A. Fernández-Arche, and V. Ruiz-Gutiérrez, “Suppressive effect of maslinic acid from pomace olive oil on oxidative stress and cytokine production in stimulated murine macrophages,” *Free Radic. Res.*, vol. 40, no. 3, pp. 295–302, Mar. 2006.
- [396] S. Balanehru and B. Nagarajan, “Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation,” *Biochem. Int.*, vol. 24, no. 5, pp. 981–990, Jul. 1991.
- [397] Y. Allouche *et al.*, “Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 59, no. 1, pp. 121–130, Jan. 2011.
- [398] J. Liu, H. Sun, W. Duan, D. Mu, and L. Zhang, “Maslinic acid reduces blood glucose in KK-Ay mice,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 30, no. 11, pp. 2075–2078, Nov. 2007.
- [399] L. O. Somova, A. Nadar, P. Rammanan, and F. O. Shode, “Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension,” *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, vol. 10, no. 2–3, pp. 115–121, Mar. 2003.
- [400] C. L. de Melo *et al.*, “Oleanolic acid, a natural triterpenoid improves blood glucose tolerance in normal mice and ameliorates visceral obesity in mice fed a high-fat diet,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 185, no. 1, pp. 59–65, Apr. 2010.
- [401] X. Wang *et al.*, “Antidiabetic Effect of Oleanolic Acid: A Promising Use of a Traditional Pharmacological Agent,” *Phytother. Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 1031–1040, Jul. 2011.
- [402] R. Rodríguez-Rodríguez, M. D. Herrera, J. S. Perona, and V. Ruiz-Gutiérrez, “Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two triterpenoids contained in ‘orujo’ olive oil, on rat aorta,” *Br. J. Nutr.*, vol. 92, no. 4, pp. 635–642, Oct. 2004.
- [403] U. Simonsen, R. Rodríguez-Rodríguez, T. Dalsgaard, N. H. Buus, and E. Stankevicius, “Novel approaches to improving endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilatation,” *Pharmacol. Rep. PR*, vol. 61, no. 1, pp. 105–115, Feb. 2009.
- [404] J. Martínez-González *et al.*, “Oleanolic acid induces prostacyclin release in human vascular smooth muscle cells through a cyclooxygenase-2-dependent mechanism,” *J. Nutr.*, vol. 138, no. 3, pp. 443–448, Mar. 2008.
- [405] S. Senthil, M. Sridevi, and K. V. Pugalendi, “Cardioprotective effect of oleanolic acid on

- isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 3, pp. 418–423, Apr. 2007.
- [406] L. I. Somova, F. O. Shode, and M. Mipando, “Cardiotonic and antidysrhythmic effects of oleanolic and ursolic acids, methyl maslinate and uvaol,” *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, vol. 11, no. 2–3, pp. 121–129, Feb. 2004.
- [407] J. Feng, P. Zhang, X. Chen, and G. He, “PI3K and ERK/Nrf2 pathways are involved in oleanolic acid-induced heme oxygenase-1 expression in rat vascular smooth muscle cells,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 112, no. 6, pp. 1524–1531, Jun. 2011.
- [408] V. S. Graham, C. Lawson, C. P. D. Wheeler-Jones, J. S. Perona, V. Ruiz-Gutierrez, and K. M. Botham, “Triacylglycerol-rich lipoproteins derived from healthy donors fed different olive oils modulate cytokine secretion and cyclooxygenase-2 expression in macrophages: The potential role of oleanolic acid,” *Eur. J. Nutr.*, vol. 51, no. 3, pp. 301–309, 2012.
- [409] A. T. Dinkova-Kostova *et al.*, “Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 12, pp. 4584–4589, Mar. 2005.
- [410] K. K. Dharmappa, R. V. Kumar, A. Nataraju, R. Mohamed, H. V. Shivaprasad, and B. S. Vishwanath, “Anti-inflammatory activity of oleanolic acid by inhibition of secretory phospholipase A2,” *Planta Med.*, vol. 75, no. 3, pp. 211–215, Feb. 2009.
- [411] W. T. Friedewald, R. I. Levy, and D. S. Fredrickson, “Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge,” *Clin. Chem.*, vol. 18, no. 6, pp. 499–502, Jun. 1972.
- [412] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, “A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues,” *J. Biol. Chem.*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, May 1957.
- [413] M. M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,” *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–254, May 1976.
- [414] J. Auwerx, “The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation,” *Experientia*, vol. 47, no. 1, pp. 22–31, Jan. 1991.
- [415] T. G. Redgrave and R. C. Maranhao, “Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 835, no. 1, pp. 104–112, Jun. 1985.
- [416] P. Diard, M. I. Malewiak, D. Lagrange, and S. Griglio, “Hepatic lipase may act as a ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes,” *Biochem. J.*, vol. 299 ( Pt 3), pp. 889–894, May 1994.

- [417] C. Holm, G. Olivecrona, and M. Ottosson, "Assays of lipolytic enzymes," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 155, pp. 97–119, 2001.
- [418] Melmed S, et al., *Williams Textbook of Endocrinology*, 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011.
- [419] D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, and R. C. Turner, "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man," *Diabetologia*, vol. 28, no. 7, pp. 412–419, Jul. 1985.
- [420] M. L. Garmendia, L. Lera, H. Sánchez, R. Uauy, and C. Albala, "[Homeostasis model assessment (HOMA) values in Chilean elderly subjects]," *Rev. Med. Chil.*, vol. 137, no. 11, pp. 1409–1416, Nov. 2009.
- [421] J. F. Ascaso, P. Romero, J. T. Real, R. I. Lorente, J. Martínez-Valls, and R. Carmena, "Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population," *Eur. J. Intern. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 101–106, Mar. 2003.
- [422] J. M. Gill, G. P. Mees, K. N. Frayn, and A. E. Hardman, "Moderate exercise, postprandial lipaemia and triacylglycerol clearance," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 31, no. 3, pp. 201–207, Mar. 2001.
- [423] G. F. Lewis *et al.*, "Fasting hypertriglyceridemia in noninsulin-dependent diabetes mellitus is an important predictor of postprandial lipid and lipoprotein abnormalities," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 72, no. 4, pp. 934–944, Apr. 1991.
- [424] M. Carstensen, C. Thomsen, and K. Hermansen, "Incremental area under response curve more accurately describes the triglyceride response to an oral fat load in both healthy and type 2 diabetic subjects," *Metabolism.*, vol. 52, no. 8, pp. 1034–1037, 2003.
- [425] E. J. Feskens *et al.*, "Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study," *Diabetes Care*, vol. 18, no. 8, pp. 1104–1112, Aug. 1995.
- [426] F. M. Sacks and M. Katan, "Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease," *Am. J. Med.*, vol. 113 Suppl 9B, p. 13S–24S, Dec. 2002.
- [427] E. Warensjö, J. Sundström, B. Vessby, T. Cederholm, and U. Risérus, "Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 88, no. 1, pp. 203–209, Jul. 2008.
- [428] M. U. Jakobsen *et al.*, "Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 89, no. 5, pp. 1425–1432, May

2009.

- [429] L. Berglund *et al.*, “Comparison of monounsaturated fat with carbohydrates as a replacement for saturated fat in subjects with a high metabolic risk profile: Studies in the fasting and postprandial states,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 86, no. 6, pp. 1611–1620, 2007.
- [430] WRITING GROUP MEMBERS *et al.*, “Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association,” *Circulation*, vol. 121, no. 7, pp. e46–e215, Feb. 2010.
- [431] “United States Department of Agriculture (2010) Dietary guidelines for Americans. <http://www.cnpp.usda.gov/dietaryguidelines.htm>.” .
- [432] M. A. Martínez-González *et al.*, “Adherence to Mediterranean diet and risk of developing diabetes: prospective cohort study,” *BMJ*, vol. 336, no. 7657, pp. 1348–1351, Jun. 2008.
- [433] S. Eguaras *et al.*, “Does the Mediterranean diet counteract the adverse effects of abdominal adiposity?,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 25, no. 6, pp. 569–574, 2015.
- [434] L. W. & Wilkins, “Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report,” *Circulation*, vol. 106, no. 25, pp. 3143–3143, Dec. 2002.
- [435] R. P. Mensink, P. L. Zock, A. D. M. Kester, and M. B. Katan, “Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 77, no. 5, pp. 1146–1155, May 2003.
- [436] R. Lichnovská, S. Gwozdziwiczová, and J. Hřebíček, “Gender differences in factors influencing insulin resistance in elderly hyperlipemic non-diabetic subjects,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 1, p. 4, Oct. 2002.
- [437] M. Motta, E. Bennati, L. Ferlito, M. Passamonte, and M. Malaguarnera, “Insulin-resistance (IR) in older age,” *Arch. Gerontol. Geriatr.*, vol. 46, no. 2, pp. 203–209, Apr. 2008.
- [438] J. Lopez-Miranda and P. Perez-Martinez, “It is time to define metabolically obese but normal-weight (MONW) individuals,” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 79, no. 3, pp. 314–315, Sep. 2013.
- [439] M. Hamer and E. Stamatakis, “Metabolically healthy obesity and risk of all-cause and cardiovascular disease mortality,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 7, pp. 2482–2488, Jul. 2012.
- [440] G. Assmann and H. Schulte, “Identification of individuals at high risk for myocardial infarction,” *Atherosclerosis*, vol. 110 Suppl, pp. S11-21, Oct. 1994.

- [441] M. J. Chapman *et al.*, “Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management,” *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 11, pp. 1345–1361, Jun. 2011.
- [442] J. Petto *et al.*, “Comparison of postprandial lipemia between women who are on oral contraceptive methods and those who are not,” *Arq. Bras. Cardiol.*, vol. 103, no. 3, pp. 245–250, Sep. 2014.
- [443] P. Perez-Martinez *et al.*, “Consumption of diets with different type of fat influences triacylglycerols-rich lipoproteins particle number and size during the postprandial state,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 21, no. 1, pp. 39–45, 2011.
- [444] J. Hartwich *et al.*, “Lipoprotein profile, plasma ischemia modified albumin and LDL density change in the course of postprandial lipemia. Insights from the LIPGENE study,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 70, no. 3, pp. 201–208, Apr. 2010.
- [445] A. Lozano *et al.*, “Body mass interacts with fat quality to determine the postprandial lipoprotein response in healthy young adults,” *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*, vol. 22, no. 4, pp. 355–361, Apr. 2012.
- [446] Y. Jiménez-Gómez *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.*, vol. 140, no. 9, pp. 1595–1601, Sep. 2010.
- [447] S. J. van Dijk, M. Mensink, D. Esser, E. J. M. Feskens, M. Müller, and L. A. Afman, “Responses to high-fat challenges varying in fat type in subjects with different metabolic risk phenotypes: A randomized trial,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 7, 2012.
- [448] T. Robal, M. Larsson, M. Martin, G. Olivecrona, and A. Lookene, “Fatty acids bind tightly to the N-terminal domain of angiotensin-like protein 4 and modulate its interaction with lipoprotein lipase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 35, pp. 29739–29752, 2012.
- [449] A. Baxheinrich, B. Stratmann, Y. H. Lee-Barkey, D. Tschoepe, and U. Wahrburg, “Effects of a rapeseed oil-enriched hypoenergetic diet with a high content of  $\alpha$ -linolenic acid on body weight and cardiovascular risk profile in patients with the metabolic syndrome,” *Br. J. Nutr.*, vol. 108, no. 4, pp. 682–691, Aug. 2012.
- [450] L. Bozzetto *et al.*, “The association of hs-CRP with fasting and postprandial plasma lipids in patients with type 2 diabetes is disrupted by dietary monounsaturated fatty acids,” *Acta Diabetol.*, vol. 50, no. 2, pp. 273–276, Apr. 2013.
- [451] K. G. Parhofer and P. H. R. Barrett, “‘What we have learned about VLDL and LDL metabolism from human kinetics studies,’ 47, no. 8, pp. 1620–1630, 2006.” *J. Lipid Res.*, vol. 47, no. 8, pp. 1620–1630, 2006.

- [452] P. Perez-Martinez *et al.*, “Metabolic phenotypes of obesity influence triglyceride and inflammation homoeostasis,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 44, no. 11, pp. 1053–1064, Nov. 2014.
- [453] O. Rasmussen, F. F. Lauszus, C. Christiansen, C. Thomsen, and K. Hermansen, “Differential effects of saturated and monounsaturated fat on blood glucose and insulin responses in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 63, no. 2, pp. 249–253, Feb. 1996.
- [454] M. Milanski *et al.*, “Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 29, no. 2, pp. 359–370, Jan. 2009.
- [455] H. Tilg and A. R. Moschen, “Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 10, pp. 772–783, Oct. 2006.
- [456] K. E. Wellen and G. S. Hotamisligil, “Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue,” *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 12, pp. 1785–1788, Dec. 2003.
- [457] A. Koerner, J. Kratzsch, and W. Kiess, “Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 19, no. 4, pp. 525–546, Dec. 2005.
- [458] M. E. Trujillo and P. E. Scherer, “Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease,” *Endocr. Rev.*, vol. 27, no. 7, pp. 762–778, Dec. 2006.
- [459] A. Kumar, Y. Takada, A. M. Boriak, and B. B. Aggarwal, “Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease,” *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, vol. 82, no. 7, pp. 434–448, Jul. 2004.
- [460] T. A. Lakka, H. M. Lakka, R. Salonen, G. A. Kaplan, and J. T. Salonen, “Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men,” *Atherosclerosis*, vol. 154, no. 2, pp. 497–504, Feb. 2001.
- [461] C.S. Kim *et al.*, “Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters,” *Int. J. Obes. 2005*, vol. 30, no. 9, pp. 1347–1355, Sep. 2006.
- [462] M. Jernås *et al.*, “Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression,” *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. 1540–1542, Jul. 2006.
- [463] T. Skurk, C. Alberti-Huber, C. Herder, and H. Hauner, “Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 3, pp. 1023–1033, Mar. 2007.
- [464] R. Canello *et al.*, “Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced

- weight loss,” *Diabetes*, vol. 54, no. 8, pp. 2277–2286, Aug. 2005.
- [465] S. P. Weisberg *et al.*, “CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 1, pp. 115–124, Jan. 2006.
- [466] I. Harman-Boehm *et al.*, “Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 6, pp. 2240–2247, Jun. 2007.
- [467] C. N. Lumeng, J. L. Bodzin, and A. R. Saltiel, “Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization,” *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 1, pp. 175–184, Jan. 2007.
- [468] K. Karastergiou and V. Mohamed-Ali, “The autocrine and paracrine roles of adipokines,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 318, no. 1–2, pp. 69–78, Apr. 2010.
- [469] C. de Luca and J. M. Olefsky, “Stressed out about obesity and insulin resistance,” *Nat. Med.*, vol. 12, no. 1, p. 41–42; discussion 42, Jan. 2006.
- [470] C. H. Lang, C. Dobrescu, and G. J. Bagby, “Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output,” *Endocrinology*, vol. 130, no. 1, pp. 43–52, Jan. 1992.
- [471] P. D. Miles, O. M. Romeo, K. Higo, A. Cohen, K. Razaat, and J. M. Olefsky, “TNF- $\alpha$ -induced insulin resistance in vivo and its prevention by troglitazone,” *Diabetes*, vol. 46, no. 11, pp. 1678–1683, Nov. 1997.
- [472] C. A. Aguilar-Salinas *et al.*, “High adiponectin concentrations are associated with the metabolically healthy obese phenotype,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 10, pp. 4075–4079, Oct. 2008.
- [473] P. Greenland *et al.*, “2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 56, no. 25, pp. e50–103, Dec. 2010.
- [474] J. L. Mehta, R. Sukhija, F. Romeo, and J. L. Sepulveda, “Value of CRP in coronary risk determination,” *Indian Heart J.*, vol. 59, no. 2, pp. 173–177, Apr. 2007.
- [475] M. B. Pepys and G. M. Hirschfield, “C-reactive protein: a critical update,” *J. Clin. Invest.*, vol. 111, no. 12, pp. 1805–1812, Jun. 2003.
- [476] P. C. Calder *et al.*, “Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity,” *Br. J. Nutr.*, vol. 106 Suppl, pp. S5–78, 2011.
- [477] P. J. Enriori, A. E. Evans, P. Sinnayah, and M. A. Cowley, “Leptin resistance and obesity,” *Obes. Silver Spring Md*, vol. 14 Suppl 5, p. 254S–258S, Aug. 2006.

- [478] A. Romero-Corral *et al.*, “Relationships between leptin and C-reactive protein with cardiovascular disease in the adult general population,” *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, no. 7, pp. 418–425, Jul. 2008.
- [479] C. J. Lavie, R. V. Milani, and H. O. Ventura, “Untangling the heavy cardiovascular burden of obesity,” *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.*, vol. 5, no. 7, pp. 428–429, Jul. 2008.
- [480] C.-H. Kim *et al.*, “Elevated serum ceruloplasmin levels in subjects with metabolic syndrome: a population-based study,” *Metabolism.*, vol. 51, no. 7, pp. 838–842, Jul. 2002.
- [481] M. Cignarelli *et al.*, “Relationship of obesity and body fat distribution with ceruloplasmin serum levels,” *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.*, vol. 20, no. 9, pp. 809–813, Sep. 1996.
- [482] Y. Ding *et al.*, “Association of homeostasis model assessment of insulin resistance, adiponectin, and low-grade inflammation with the course of the metabolic syndrome,” *Clin. Biochem.*, vol. 48, no. 7–8, pp. 503–507, May 2015.
- [483] M. J. Aguilar Cordero *et al.*, “[Ceruloplasmin and its clinical relevance as an inductor of cardiovascular risk factor in a school population of Granada],” *Nutr. Hosp.*, vol. 26, no. 3, pp. 655–658, Jun. 2011.
- [484] P. Giordano *et al.*, “Metabolic, inflammatory, endothelial and haemostatic markers in a group of Italian obese children and adolescents,” *Eur. J. Pediatr.*, vol. 170, no. 7, pp. 845–850, Jul. 2011.
- [485] N. Giurgea, M. I. Constantinescu, R. Stanciu, S. Suci, and A. Muresan, “Ceruloplasmin - acute-phase reactant or endogenous antioxidant? The case of cardiovascular disease,” *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, vol. 11, no. 2, pp. RA48-51, Feb. 2005.
- [486] M. R. Hayden and S. C. Tyagi, “Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atherosclerosis: a malignant transformation,” *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 3, p. 1, Feb. 2004.
- [487] R. Memişoğullari and E. Bakan, “Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus,” *J. Diabetes Complications*, vol. 18, no. 4, pp. 193–197, Aug. 2004.
- [488] V. Leoni *et al.*, “Glucose accelerates copper- and ceruloplasmin-induced oxidation of low-density lipoprotein and whole serum,” *Free Radic. Res.*, vol. 36, no. 5, pp. 521–529, May 2002.
- [489] P. Blackburn *et al.*, “Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men,” *Obes. Silver Spring Md*, vol. 14, no. 10, pp. 1747–1754, Oct. 2006.
- [490] M. B. Zimmermann and I. Aeberli, “Dietary determinants of subclinical inflammation, dyslipidemia and components of the metabolic syndrome in overweight children: a review,” *Int.*

*J. Obes.* 2005, vol. 32 Suppl 6, pp. S11-18, Dec. 2008.

- [491] S. J. van Dijk *et al.*, “A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 90, no. 6, pp. 1656–1664, Dec. 2009.
- [492] P. C. Calder, “N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic,” *Lipids*, vol. 38, no. 4, pp. 343–352, Apr. 2003.
- [493] P. C. Calder, “n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 83, no. 6 Suppl, p. 1505S–1519S, Jun. 2006.
- [494] E. Lopez-Garcia *et al.*, “Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women,” *J. Nutr.*, vol. 134, no. 7, pp. 1806–1811, Jul. 2004.
- [495] T. Madsen *et al.*, “C-reactive protein, dietary n-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 88, no. 10, pp. 1139–1142, Nov. 2001.
- [496] J.-M. Fernández-Real, M. Broch, J. Vendrell, and W. Ricart, “Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition,” *Diabetes Care*, vol. 26, no. 5, pp. 1362–1368, May 2003.
- [497] H. Petersson, S. Basu, T. Cederholm, and U. Risérus, “Serum fatty acid composition and indices of stearoyl-CoA desaturase activity are associated with systemic inflammation: longitudinal analyses in middle-aged men,” *Br. J. Nutr.*, vol. 99, no. 6, pp. 1186–1189, Jun. 2008.
- [498] D. J. Baer, J. T. Judd, B. A. Clevidence, and R. P. Tracy, “Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 6, pp. 969–973, Jun. 2004.
- [499] C. Chrysohoou, D. B. Panagiotakos, C. Pitsavos, U. N. Das, and C. Stefanadis, “Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 152–158, Jul. 2004.
- [500] T. T. Fung *et al.*, “Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 82, no. 1, pp. 163–173, Jul. 2005.
- [501] T. Okumura *et al.*, “Chylomicron remnants stimulate release of interleukin-1beta by THP-1 cells,” *J. Atheroscler. Thromb.*, vol. 13, no. 1, pp. 38–45, Feb. 2006.
- [502] J.-M. Fernández-Real, J. Vendrell, and W. Ricart, “Circulating adiponectin and plasma fatty acid profile,” *Clin. Chem.*, vol. 51, no. 3, pp. 603–609, Mar. 2005.
- [503] F. Sofi *et al.*, “Effects of a 1-year dietary intervention with n-3 polyunsaturated fatty acid-

enriched olive oil on non-alcoholic fatty liver disease patients: a preliminary study,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 61, no. 8, pp. 792–802, Dec. 2010.

- [504] K. N. Aronis *et al.*, “Short-term walnut consumption increases circulating total adiponectin and apolipoprotein A concentrations, but does not affect markers of inflammation or vascular injury in obese humans with the metabolic syndrome: data from a double-blinded, randomized, placebo-controlled study,” *Metabolism.*, vol. 61, no. 4, pp. 577–582, Apr. 2012.
- [505] J. A. Paniagua *et al.*, “Monounsaturated fat-rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects,” *Diabetes Care*, vol. 30, no. 7, pp. 1717–1723, Jul. 2007.
- [506] A. Lozano *et al.*, “An acute intake of a walnut-enriched meal improves postprandial adiponectin response in healthy young adults,” *Nutr. Res.*, vol. 33, no. 12, pp. 1012–1018, 2013.
- [507] S. Bonhomme *et al.*, “Gastric bypass up-regulates insulin signaling pathway,” *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif*, vol. 27, no. 1, pp. 73–80, Jan. 2011.
- [508] D. Rubin *et al.*, “Postprandial plasma adiponectin decreases after glucose and high fat meal and is independently associated with postprandial triacylglycerols but not with -- 11388 promoter polymorphism,” *Br. J. Nutr.*, vol. 99, no. 1, pp. 76–82, Jan. 2008.
- [509] K. Hotta *et al.*, “Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 6, pp. 1595–1599, Jun. 2000.
- [510] J. A. Paniagua *et al.*, “Central obesity and altered peripheral adipose tissue gene expression characterize the NAFLD patient with insulin resistance: Role of nutrition and insulin challenge,” *Nutrition*, vol. 30, no. 2, pp. 177–185, 2014.
- [511] R. Casas *et al.*, “The effects of the mediterranean diet on biomarkers of vascular wall inflammation and plaque vulnerability in subjects with high risk for cardiovascular disease. A randomized trial,” *PloS One*, vol. 9, no. 6, p. e100084, 2014.
- [512] A. Sarkar *et al.*, “Copper and ceruloplasmin levels in relation to total thiols and GST in type 2 diabetes mellitus patients,” *Indian J. Clin. Biochem. IJCB*, vol. 25, no. 1, pp. 74–76, Jan. 2010.
- [513] Ashok Kumar Jeppu, Asha Augusthy, Kavitha Ashok Kumar, “Plasma Glucose and Serum Ceruloplasmin in Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus Type 2,” *Recent Adv. Biol. Med.*, 2016.
- [514] K. T. Teng, L. F. Chang, S. R. Vethakkan, K. Nesaretnam, and T. A. B. Sanders, “Effects of exchanging carbohydrate or monounsaturated fat with saturated fat on inflammatory and thrombogenic responses in subjects with abdominal obesity: A randomized controlled trial,”

*Clin. Nutr.*, 2016.

- [515] A. Schlitt *et al.*, “Serum phospholipid transfer protein activity after a high fat meal in patients with insulin-treated type 2 diabetes,” *Lipids*, vol. 45, no. 2, pp. 129–135, Feb. 2010.
- [516] K.-T. Teng, G. Nagapan, H. M. Cheng, and K. Nesaretnam, “Palm olein and olive oil cause a higher increase in postprandial lipemia compared with lard but had no effect on plasma glucose, insulin and adipocytokines,” *Lipids*, vol. 46, no. 4, pp. 381–388, Apr. 2011.
- [517] M. Herieka and C. Erridge, “High-fat meal induced postprandial inflammation,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 58, no. 1, pp. 136–146, Jan. 2014.
- [518] S. M. Camhi, M. L. Stefanick, P. M. Ridker, and D. R. Young, “Changes in C-reactive protein from low-fat diet and/or physical activity in men and women with and without metabolic syndrome,” *Metabolism.*, vol. 59, no. 1, pp. 54–61, Jan. 2010.
- [519] K. M. Botham, M. Avella, A. Cantafora, and E. Bravo, “The lipolysis of chylomicrons derived from different dietary fats by lipoprotein lipase in vitro,” *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.*, vol. 1349, no. 3, pp. 257–263, 1997.
- [520] A. Nilsson and B. Landin, “Metabolism of chylomicron arachidonic and linoleic acid in the rat,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 959, no. 3, pp. 288–295, Apr. 1988.
- [521] A. Nilsson, B. Landin, and M. C. Schotz, “Hydrolysis of chylomicron arachidonate and linoleate ester bonds by lipoprotein lipase and hepatic lipase,” *J. Lipid Res.*, vol. 28, no. 5, pp. 510–517, May 1987.
- [522] T. Melin, C. Qi, G. Bengtsson-Olivecrona, B. Akesson, and A. Nilsson, “Hydrolysis of chylomicron polyenoic fatty acid esters with lipoprotein lipase and hepatic lipase,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1075, no. 3, pp. 259–266, Oct. 1991.
- [523] E. H. Moore *et al.*, “Protection of chylomicron remnants from oxidation by incorporation of probucol into the particles enhances their uptake by human macrophages and increases lipid accumulation in the cells,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 12, pp. 2417–2427, Jun. 2004.
- [524] Y. Jinno, M. Nakakuki, H. Kawano, T. Notsu, K. Mizuguchi, and K. Imada, “Eicosapentaenoic acid administration attenuates the pro-inflammatory properties of VLDL by decreasing its susceptibility to lipoprotein lipase in macrophages,” *Atherosclerosis*, vol. 219, no. 2, pp. 566–572, 2011.
- [525] K. Sato, Y. Takahashi, T. Takahashi, N. Katoh, and Y. Akiba, “Identification of factors regulating lipoprotein lipase catalyzed hydrolysis in rats with the aid of monoacid-rich lipoprotein preparations(1),” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 13, no. 9, p. 528, Sep. 2002.
- [526] M. S. Lambert, K. M. Botham, and P. a Mayes, “Modification of the fatty acid composition

- of dietary oils and fats on incorporation into chylomicrons and chylomicron remnants.,” *Br. J. Nutr.*, vol. 76, no. 1996, pp. 435–445, 1996.
- [527] J. S. Cohn *et al.*, “Contribution of apoB-48 and apoB-100 triglyceride-rich lipoproteins (TRL) to postprandial increases in the plasma concentration of TRL triglycerides and retinyl esters,” *J. Lipid Res.*, vol. 34, no. 12, pp. 2033–2040, Dec. 1993.
- [528] T. G. Redgrave, “Formation and metabolism of chylomicrons,” *Int. Rev. Physiol.*, vol. 28, pp. 103–130, 1983.
- [529] R. Abia, Y. M. Pacheco, J. S. Perona, E. Montero, F. J. G. Muriana, and V. Ruiz-Gutiérrez, “The Metabolic Availability of Dietary Triacylglycerols from Two High Oleic Oils during the Postprandial Period Does Not Depend on the Amount of Oleic Acid Ingested by Healthy Men,” *J. Nutr.*, vol. 131, no. 1, pp. 59–65, Jan. 2001.
- [530] J. Julve, J. M. Martín-Campos, J. C. Escolà-Gil, and F. Blanco-Vaca, “Chylomicrons: Advances in biology, pathology, laboratory testing, and therapeutics,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 455, pp. 134–148, 2016.
- [531] T. D’Aquila, Y. H. Hung, A. Carreiro, and K. K. Buhman, “Recent discoveries on absorption of dietary fat: Presence, synthesis, and metabolism of cytoplasmic lipid droplets within enterocytes,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1861, no. 8, pp. 730–747, 2016.
- [532] J. Halpern, P. Tso, and C. M. Mansbach, “Mechanism of lipid mobilization by the small intestine after transport blockade,” *J. Clin. Invest.*, vol. 82, no. 1, pp. 74–81, Jul. 1988.
- [533] W. S. Harris, P. M. Kris-Etherton, and K. A. Harris, “Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults,” *Curr. Atheroscler. Rep.*, vol. 10, no. 6, pp. 503–509, Dec. 2008.
- [534] E. Ros, “Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 89, no. 5, p. 1649S–56S, May 2009.
- [535] F. Soriguer *et al.*, “Jejunal wall triglyceride concentration of morbidly obese persons is lower in those with type 2 diabetes mellitus,” *J. Lipid Res.*, vol. 51, no. 12, pp. 3516–3523, Dec. 2010.
- [536] I. J. Goldberg, R. H. Eckel, and N. a Abumrad, “Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways.,” *J. Lipid Res.*, vol. 50 Suppl, pp. S86–90, 2009.
- [537] K. Edwards, R. Y. Chan, and W. H. Sawyer, “Interactions between fatty acids and lipoprotein lipase: specific binding and complex formation,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 33, no. 45, pp. 13304–13311, Nov. 1994.

- [538] C. Thomsen *et al.*, “Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 69, no. 6, pp. 1135–1143, Jun. 1999.
- [539] Y. Park, P. G. Jones, and W. S. Harris, “Triacylglycerol-rich lipoprotein margination: a potential surrogate for whole-body lipoprotein lipase activity and effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 80, no. 1, pp. 45–50, Jul. 2004.
- [540] C. Vasandani *et al.*, “Upregulation of hepatic LDL transport by n-3 fatty acids in LDL receptor knockout mice,” *J. Lipid Res.*, vol. 43, no. 5, pp. 772–784, May 2002.
- [541] D. Ricart-Jané, P. Cejudo-Martín, J. Peinado-Onsurbe, M. D. López-Tejero, and M. Llobera, “Changes in lipoprotein lipase modulate tissue energy supply during stress,” *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985*, vol. 99, no. 4, pp. 1343–1351, Oct. 2005.
- [542] R. Cabello-Moruno, L. Sinausia, K. Botham, E. Moreno, M. Avella, J. S. Perona, “Postprandial phase time influences the uptake of TAG from postprandial TAG-rich lipoproteins by THP-1 macrophages,” *Br. J. Nutr.*, vol. 112, no. 9, pp. 1469–1477, 2014.
- [543] N. Mekki *et al.*, “Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men,” *J. Nutr.*, vol. 132, no. 12, pp. 3642–3649, Dec. 2002.
- [544] M. M. van Greevenbroek, G. van Meer, D. W. Erkelens, and T. W. de Bruin, “Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells,” *Atherosclerosis*, vol. 121, no. 1, pp. 139–150, Mar. 1996.
- [545] I. Rashid, B.E. Brown, D. M. van Reyk, M.J. Davies, The roles of glycation and glycoxidation and advanced glycation end product formation in diabetes-induced atherosclerosis in: *Biochemistry of Atherosclerosis*. Springer Verlag, New York: Cheema, S.K., Ed, 2006.
- [546] B. E. Brown, F. M. Mahroof, N. L. Cook, D. M. van Reyk, and M. J. Davies, “Hydrazine compounds inhibit glycation of low-density lipoproteins and prevent the in vitro formation of model foam cells from glycolaldehyde-modified low-density lipoproteins,” *Diabetologia*, vol. 49, no. 4, pp. 775–783, Apr. 2006.
- [547] V. Llorente-Cortés, T. Royo, M. Otero-Viñas, M. Berrozpe, and L. Badimon, “Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 74, no. 3, pp. 526–536, Jun. 2007.
- [548] S. Camino-López, V. Llorente-Cortés, J. Sendra, and L. Badimon, “Tissue factor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A

translocation in human vascular smooth muscle cells,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 73, no. 1, pp. 208–216, Jan. 2007.

- [549] T. Padró, E. Peña, M. García-Arguinzonis, V. Llorente-Cortes, and L. Badimon, “Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 77, no. 1, pp. 211–220, Jan. 2008.
- [550] V. A. Mustad, J. L. Ellsworth, A. D. Cooper, P. M. Kris-Etherton, and T. D. Etherton, “Dietary linoleic acid increases and palmitic acid decreases hepatic LDL receptor protein and mRNA abundance in young pigs,” *J. Lipid Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 2310–2323, 1996.
- [551] J. C. Fox, H. C. McGill, K. D. Carey, and G. S. Getz, “In vivo regulation of hepatic LDL receptor mRNA in the baboon. Differential effects of saturated and unsaturated fat,” *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 15, pp. 7014–7020, May 1987.
- [552] L. K. Hennessy *et al.*, “Effects of dietary fats and cholesterol on liver lipid content and hepatic apolipoprotein A-I, B, and E and LDL receptor mRNA levels in cebus monkeys,” *J. Lipid Res.*, vol. 33, no. 3, pp. 351–360, Mar. 1992.
- [553] A. Pocathikorn, R. R. Taylor, I. James, and C. D. S. Mamotte, “LDL-receptor mRNA expression in men is downregulated within an hour of an acute fat load and is influenced by genetic polymorphism,” *J. Nutr.*, vol. 137, no. 9, pp. 2062–7, 2007.
- [554] J. L. Goldstein and M. S. Brown, “Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis,” *Circulation*, vol. 76, no. 3, pp. 504–507, Sep. 1987.
- [555] I. J. Martins, E. Hone, C. Chi, U. Seydel, R. N. Martins, and T. G. Redgrave, “Relative roles of LDLr and LRP in the metabolism of chylomicron remnants in genetically manipulated mice,” *J. Lipid Res.*, vol. 41, no. 2, pp. 205–213, Feb. 2000.
- [556] D. Teupser *et al.*, “CD36 mRNA expression is increased in CD14+ monocytes of patients with coronary heart disease,” *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, vol. 35, no. 5–6, pp. 552–556, May 2008.
- [557] A. N. Carley and A. M. Kleinfeld, “Fatty acid (FFA) transport in cardiomyocytes revealed by imaging unbound FFA is mediated by an FFA pump modulated by the CD36 protein,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4589–4597, Feb. 2011.
- [558] S. Ma, D. Yang, D. Li, B. Tang, and Y. Yang, “Oleic acid induces smooth muscle foam cell formation and enhances atherosclerotic lesion development via CD36,” *Lipids Health Dis.*, vol. 10, p. 53, Apr. 2011.
- [559] C. F. Kwok, C.-C. Juan, and L.-T. Ho, “Endothelin-1 decreases CD36 protein expression in

- vascular smooth muscle cells,” *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 292, no. 2, pp. E648-652, Feb. 2007.
- [560] S. Toomey, H. Roche, D. Fitzgerald, and O. Belton, “Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE<sup>-/-</sup> mouse by conjugated linoleic acid,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 31, no. Pt 5, pp. 1075–1079, Oct. 2003.
- [561] J. Y. Lee and D. H. Hwang, “Docosahexaenoic acid suppresses the activity of peroxisome proliferator-activated receptors in a colon tumor cell line,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 298, no. 5, pp. 667–674, Nov. 2002.
- [562] I. J. Edwards and J. T. O’Flaherty, “Omega-3 Fatty Acids and PPARgamma in Cancer,” *PPAR Res.*, vol. 2008, p. 358052, 2008.
- [563] D. Esser, S. J. van Dijk, E. Oosterink, S. Lopez, M. Müller, and L. A. Afman, “High fat challenges with different fatty acids affect distinct atherogenic gene expression pathways in immune cells from lean and obese subjects,” *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 59, no. 8, pp. 1563–1572, Aug. 2015.
- [564] H. E. Xu *et al.*, “Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors,” *Mol. Cell*, vol. 3, no. 3, pp. 397–403, Mar. 1999.
- [565] L. M. Sanderson *et al.*, “Effect of synthetic dietary triglycerides: a novel research paradigm for nutrigenomics,” *PloS One*, vol. 3, no. 2, p. e1681, Feb. 2008.
- [566] U. J. Jung, C. Torrejon, C. L. Chang, H. Hamai, T. S. Worgall, and R. J. Deckelbaum, “Fatty acids regulate endothelial lipase and inflammatory markers in macrophages and in mouse aorta: a role for PPAR $\gamma$ ,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 32, no. 12, pp. 2929–2937, Dec. 2012.
- [567] L. Lichtenstein *et al.*, “Angptl4 protects against severe proinflammatory effects of saturated fat by inhibiting fatty acid uptake into mesenteric lymph node macrophages,” *Cell Metab.*, vol. 12, no. 6, pp. 580–592, Dec. 2010.
- [568] M. Van Eck, R. Zimmermann, P. H. Groot, R. Zechner, and T. J. Van Berkel, “Role of macrophage-derived lipoprotein lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. E53–E62, 2000.
- [569] V. R. Babaev, S. Fazio, L. A. Gleaves, K. J. Carter, C. F. Semenkovich, and M. F. Linton, “Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in vivo,” *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 12, pp. 1697–1705, Jun. 1999.
- [570] M. Fernández-Borja, D. Bellido, E. Vilella, G. Olivecrona, and S. Vilaró, “Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts: evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway,” *J. Lipid Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 464–481, Mar. 1996.
- [571] J. Heeren, A. Niemeier, M. Merkel, and U. Beisiegel, “Endothelial-derived lipoprotein

- lipase is bound to postprandial triglyceride-rich lipoproteins and mediates their hepatic clearance in vivo,” *J. Mol. Med. Berl. Ger.*, vol. 80, no. 9, pp. 576–584, Sep. 2002.
- [572] E. Makoveichuk, S. Castel, S. Vilaró, and G. Olivecrona, “Lipoprotein lipase-dependent binding and uptake of low density lipoproteins by THP-1 monocytes and macrophages: possible involvement of lipid rafts,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1686, no. 1–2, pp. 37–49, Nov. 2004.
- [573] V. Sukonina, A. Lookene, T. Olivecrona, and G. Olivecrona, “Angiopietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 46, pp. 17450–17455, Nov. 2006.
- [574] S. K. Nilsson *et al.*, “Triacylglycerol-rich lipoproteins protect lipoprotein lipase from inactivation by ANGPTL3 and ANGPTL4,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, vol. 1821, no. 10, pp. 1370–1378, 2012.
- [575] G. Bengtsson and T. Olivecrona, “Lipoprotein lipase. Mechanism of product inhibition,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 106, no. 2, pp. 557–562, May 1980.
- [576] S. Kersten *et al.*, “Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 6, pp. 969–974, Jun. 2009.
- [577] A. Georgiadi *et al.*, “Overexpression of angiopietin-like protein 4 protects against atherosclerosis development,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1529–1537, 2013.
- [578] M. Brands, H. P. Sauerwein, M. T. Ackermans, S. Kersten, and M. J. Serlie, “Omega-3 long-chain fatty acids strongly induce angiopietin-like 4 in humans,” *J Lipid Res*, vol. 54, no. 3, pp. 615–621, 2013.
- [579] S. É. Michaud and G. Renier, “Direct Regulatory Effect of Fatty Acids on Macrophage Lipoprotein Lipase,” *Diabetes*, vol. 50, no. 3, pp. 660–666, 2001.
- [580] H. Staiger *et al.*, “Muscle-derived angiopietin-like protein 4 is induced by fatty acids via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta and is of metabolic relevance in humans,” *Diabetes*, vol. 58, no. 3, pp. 579–589, Mar. 2009.
- [581] E. Bravo *et al.*, “Comparison of the hepatic uptake and processing of cholesterol from chylomicrons of different fatty acid composition in the rat in vivo,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1258, no. 3, pp. 328–336, Oct. 1995.
- [582] R. C. Maranhão *et al.*, “Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease,” *Atherosclerosis*, vol. 126, no. 1, pp. 15–25, Sep. 1996.
- [583] P. Diard, M. I. Malewiak, D. Lagrange, and S. Griglio, “Hepatic lipase may act as a ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes,”

*Biochem. J.*, vol. 299 ( Pt 3), pp. 889–894, May 1994.

- [584] J. Nordenström, G. Neeser, T. Olivecrona, and J. Wahren, “Effect of medium- and long-chain triglyceride infusion on lipoprotein and hepatic lipase in healthy subjects,” *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 21, no. 6, pp. 580–585, Dec. 1991.
- [585] H. Ge, G. Yang, L. Huang, D. L. Motola, T. Pourbahrami, and C. Li, “Oligomerization and regulated proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 3, pp. 2038–2045, Jan. 2004.
- [586] E. Makoveichuk *et al.*, “Inactivation of lipoprotein lipase occurs on the surface of THP-1 macrophages where oligomers of angiopoietin-like protein 4 are formed,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 425, no. 2, pp. 138–143, 2012.

# ANEXO

## **RESUMEN EJECUTIVO**

### **INTRODUCCION:**

La obesidad es considerada en la actualidad una enfermedad inflamatoria crónica de bajo grado, relacionada con un desorden en el metabolismo postprandial de los lípidos que, a largo plazo, acaba generando otras complicaciones como resistencia a la insulina, hiperglicemia e hipertensión. Es por ello que las personas obesas tienen mayor riesgo de desarrollar ECV. El contenido graso de los alimentos ha demostrado ser una pieza clave en la determinación de una salud óptima en el individuo debido a su capacidad para influir sobre los factores de riesgo CV y de estar implicado directamente en el proceso aterosclerótico. Las intervenciones dietéticas han sido identificadas como una herramienta importante de prevención primaria y tratamientos secundarios. La adherencia a la dieta Mediterránea ha demostrado aportar beneficios cardioprotectores principalmente gracias a su elevada concentración de MUFA proporcionados por el aceite de oliva, su fuente de grasa mayoritaria. En la actualidad, podemos encontrar en la literatura científica estudios sobre las propiedades cardioprotectoras proporcionadas por dietas ricas en grasas insaturadas y de su capacidad para reducir la aterosclerosis. Sin embargo, pocos trabajos han sido realizados con la participación de personas obesas. En este contexto, proponemos que un desayuno tipo mediterráneo enriquecido en MUFA sería capaz de contribuir a mejorar el perfil lipídico postprandial y la respuesta inflamatoria presente en los sujetos obesos participantes del estudio, así como a reducir la formación de células espumosas durante las primeras fases del desarrollo de la aterosclerosis, con respecto a un desayuno de tipo occidental.

### **HIPÓTESIS:**

En este contexto, proponemos la hipótesis de que un desayuno tipo mediterráneo enriquecido en MUFA contribuye a mejorar el perfil lipídico postprandial y la respuesta inflamatoria presente en los sujetos obesos participantes del estudio, así como a reducir la formación de células espumosas durante las primeras fases del desarrollo de la aterosclerosis, con respecto a un desayuno de tipo occidental.

## **OBJETIVOS:**

1. Valorar la influencia de una carga lipídica sobre el metabolismo lipídico postprandial e inflamación vascular en adultos obesos frente a controles normopesos.
2. Determinar los efectos diferenciales de un desayuno de tipo mediterráneo frente a un desayuno de tipo occidental sobre el metabolismo lipídico postprandial en adultos obesos.
3. Determinar los efectos diferenciales de un desayuno de tipo mediterráneo frente a un desayuno de tipo occidental sobre la síntesis de marcadores de inflamación en sujetos obesos con respecto a sujetos normopesos.
4. Estudiar el efecto de las lipoproteína ricas en triglicéridos postprandiales aisladas de adultos obesos sobre la formación de células espumosas.
5. Analizar la capacidad del componente lipídico de las lipoproteínas ricas en triglicéridos para modular la actividad de la LPL en macrófagos.

## **RESULTADOS:**

1. La medición de los parámetros basales de los participantes del estudio confirmó que los sujetos obesos presentaban dislipidemia, así como niveles de glucosa e insulina significativamente superiores a los del grupo control, aunque no eran insulinoresistentes, ni presentaban hipertensión arterial. El consumo de los dos tipos de desayunos experimentales no alteró los niveles basales de colesterol total ni HDL-c durante el periodo postprandial analizado en ninguno de los dos grupos del estudio. En cambio, la concentración postprandial de TG sufrió un rápido incremento inmediatamente después de que los sujetos obesos consumieran las dos comidas, especialmente tras la ingesta del desayuno de tipo occidental. En ellos, la formación de nuevas partículas TRL también fue inmediata. Esta misma respuesta la experimentaron los individuos normopesos, aunque únicamente cuando consumieron el desayuno de tipo occidental. Estos resultados indican que el desayuno rico en MUFA favorece una respuesta lipídica postprandial más reducida en individuos obesos que las comidas ricas en SFA. Se observó que los individuos obesos tenían a su vez un retraso en el aclaramiento de las partículas TRL en comparación con los de peso normal, y que el consumo del desayuno rico en SFA requirió una síntesis significativamente mayor de insulina para que los sujetos obesos mantuvieran los niveles de glucosa. Por tanto, un consumo continuado de este tipo de comida podría contribuir a la resistencia a la insulina en los obesos. En cambio, en los individuos normopesos, el consumo del desayuno rico en MUFA demostró ayudar a que fueran más sensibles a la insulina y mostraran un perfil lipídico menos aterogénico.

2. El perfil inflamatorio basal del grupo obeso reveló un estado inflamatorio crónico al compararse con el de los individuos normopeso, ya que los niveles basales de leptina, Cp, PCR y MCP-1 detectados en ayunas en el grupo obeso fueron significativamente superiores, aunque no hubo importantes diferencias en los niveles de adiponectina, TNF- $\alpha$  ni IL-1 $\beta$  entre ambos. Demostrada la capacidad de los AG para activar/reducir la respuesta inflamatoria y para modular la liberación de los mediadores de inflamación en circulación, se evaluó la capacidad de la comida experimental rica en MUFA para reducir el estado inflamatorio crónico establecido en los pacientes obesos. El consumo del desayuno de tipo mediterráneo tuvo el efecto cardioprotector esperado en las personas con peso normal, al inducir una menor liberación postprandial de Cp y MCP-1 y un incremento de los niveles totales postprandiales de adiponectina; mientras que el consumo del desayuno de tipo occidental colaboró a que presentaran un peor perfil inflamatorio, debido principalmente a la reducción de los niveles de adiponectina en circulación. En el grupo de los obesos, en cambio, no observó una mejoría en la concentración postprandial de adiponectina, leptina y PCR con respecto a la basal tras el consumo del desayuno de tipo mediterráneo. Ello parece sugerir que sería necesaria una previa pérdida de peso para que los individuos obesos se vieran beneficiados de las propiedades anti-inflamatorias de una dieta rica en MUFA.

3. La caracterización de la composición de AG de las TRL aisladas en ayunas fue similar en los dos grupos, normopeso y obeso, mostrando el mismo perfil de aterogenicidad antes de comenzar los ensayos postprandiales. El consumo del aceite de oliva con el desayuno de tipo mediterráneo incrementó el contenido de MUFA en los TG de las nuevas TRL de ambos grupos experimentales, debido a una mayor incorporación de ácido oleico en las partículas principalmente. Por el contrario, la ingesta del desayuno de tipo occidental generó partículas más aterogénicas al incrementar su concentración de SFA. Se demostró, por tanto, que el perfil de AG de las nuevas partículas fue un reflejo de la composición lipídica de la fuente de grasa de la que procedían. No obstante, se observó una significativa incorporación de PUFA n-3 solo en las nuevas TRL aisladas de los sujetos normopeso después de consumir la comida de tipo occidental. Ello parecía sugerir que el consumo de una dieta rica en SFA por personas normopeso estimula la incorporación de PUFA endógenos en las nuevas TRL. La composición de AG de los FL extraídos de las partículas procedentes del grupo normopeso no se vio alterada por el contenido lipídico de las comidas experimentales con respecto al perfil de AG en ayunas, mientras que en el grupo obeso sí se reflejó de nuevo la composición lipídica del desayuno ingerido. Estos resultados podrían indicar que en caso de padecer obesidad, el contenido de grasa de la dieta adquiere aún más importancia sobre la composición de AG de las TRL y, en consecuencia, sobre su perfil aterogénico, que si se tiene un peso corporal normal.

4. Tras incubar los cultivos de macrófagos con las TRL en ayunas y las aisladas a las 2 y 4 horas de ingerir las comidas experimentales, la caracterización de los AG de los TG intracelulares reveló que, de acuerdo con trabajos previos, las partículas procedentes de la hora 4 del periodo postprandial de ambos grupos fueron las captadas por las células más eficientemente, ya que el contenido lipídico intracelular reflejaba la composición de AG de las partículas. Con las TRL aisladas en ayunas en los sujetos obesos sucedió algo similar, indicando que también colaboran con la formación de células espumosas, aunque de forma más discreta que las TRL-4h. También se estudió con las imágenes tomadas al microscopio de los lípidos intracelulares, el tamaño de las gotículas lipídicas formadas en el interior de las células según la composición de las TRL. Las TRL-4h procedentes de los sujetos normopesos derivadas del consumo del desayuno de tipo mediterráneo generaron células espumosas con una carga lipídica muy similar a las TRL-0h, mientras que las derivadas del consumo del desayuno de tipo occidental provocaron una mayor incorporación de lípidos por parte de los macrófagos. Las TRL-4h aisladas de los sujetos obesos, independientemente de cual fuera la fuente de grasa de la que derivasen, provocaron en ambos casos una exacerbada incorporación lipídica en los macrófagos. La caracterización de los AG intracelulares reveló que cuando los macrófagos se incubaron con las TRL derivadas de la ingesta del desayuno de tipo mediterráneo de los dos grupos, el contenido intracelular de SFA totales se redujo significativamente, pero no se incrementó la concentración de los MUFA; y la ingesta del desayuno de tipo occidental por el grupo obeso causó un importante incremento de los SFA intracelulares y redujo los MUFA, generando un perfil lipídico intracelular más aterogénico. Estos resultados indican que los alimentos ricos en SFA aumentan las propiedades aterogénicas de las TRL de las personas con obesidad, pero no en los individuos normopeso, mientras que el consumo de alimentos con alto contenido en MUFA mejoran el perfil lipídico intracelular solo de los individuos normopeso.

5. Las diferencias observadas en los lípidos intracelulares se relacionaron con las modificaciones en la expresión génica de los receptores de membrana. Se detectó que, coincidiendo con el momento en el cual las TRL aisladas del grupo normopeso son incorporadas más eficientemente y causan los mayores depósitos de lípidos intracelulares (4 horas tras la ingesta), los niveles de expresión de los receptores celulares son los más bajos. Además, el incremento intracelular de los MUFA tras la captación de las TRL aisladas después de consumir el desayuno de tipo mediterráneo provocó que se obtuvieran los menores niveles de ARNm de prácticamente todos los receptores celulares. De modo que el consumo del desayuno mediterráneo estaría proporcionando tanto a la población obesa como a la normopesa una actividad cardioprotectora al colaborar con la reducción de la formación

de células espumosas. En contra, se ha detectado el efecto perjudicial causado en las personas con obesidad cuando consumen el desayuno occidental, ya que éste parece potenciar la relación colaborativa LDLR-LRP1, además de inducir un incremento significativo de la expresión del receptor CD36 durante el periodo postprandial, no detectado en los sujetos normopeso, colaborando así a la formación de células espumosas.

6. El tratamiento de los cultivos de macrófagos con partículas CRLP compuestas por AG de distinto grado de saturación reveló que, a las 6 horas de incubación, momento en el que la LPL es más activa, fueron las CRLP-LLL las que causaron una mayor reducción de los niveles de actividad de LPL localizada en la superficie celular, y las CRLP-POP la menor. Estos resultados coinciden con la literatura científica, pues se ha establecido que los complejos formados entre ANGPTL4 y los AG son más fuertes con SFA, colaborando a mantener la actividad de LPL, y los más débiles con PUFA, reduciéndose por tanto su actividad. En cambio, a las 24 horas, la capacidad moduladora de la actividad catalítica de la enzima por parte de las diferentes partículas CRLP es muy similar, viéndose ésta reducida sin diferencias significativas entre los AG componentes de las partículas. Estos resultados coinciden con los niveles de actividad detectados en el medio de cultivo y en el espacio intracelular, siendo el control de la actividad de LPL en esta última fracción atribuido a la acción moduladora de los AG sobre PPARs, y no ANGPTL4. La cuantificación de la abundancia relativa de ARNm LPL y ANGPTL4 mostró que el contenido de PUFA y MUFA de las CRLP causó una importante reducción en los niveles de expresión de LPL y una sobreexpresión de ANGPTL4, siendo este efecto más acusado cuando los macrófagos fueron tratados con CRLP-LLL. Estos resultados apoyan la función protectora de MUFA y PUFA ante la formación de células espumosas, al contribuir a reducir la interacción entre TRL y los receptores celulares mediante la reducción de la actividad de la LPL. En cambio, el contenido de SFA en las CRLP parece ayudar a mantener la actividad de LPL de macrófagos, estimulando la acumulación de lípidos en el interior de las células.

## **CONCLUSIÓN:**

En general, los resultados obtenidos permiten concluir que el consumo de un desayuno de tipo mediterráneo ayuda a reducir la respuesta lipídica postprandial en las personas obesas, y contribuye a una menor formación de células espumosas mediante la reducción de los niveles de expresión de los receptores celulares, así como la actividad de la LPL. No obstante, para que la respuesta inflamatoria establecida en la obesidad se reduzca por la ingesta de una dieta rica en MUFA, sería necesario que éstos individuos perdieran previamente peso corporal.