



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL

2022

**MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS
OXIDATIVO EN LA PREVENCIÓN Y REVERSIÓN
DE LA OBESIDAD Y SUS COMORBILIDADES
ASOCIADAS**

MARGALIDA MONSERRAT MESQUIDA



Universitat
de les Illes Balears

ciberobn

Centro de Investigación Biomédica en Red
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición

Grupo CB12/03/30038

TESIS DOCTORAL 2022

Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos

MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PREVENCIÓN Y REVERSIÓN DE LA OBESIDAD Y SUS COMORBILIDADES ASOCIADAS

MARGALIDA MONSERRAT MESQUIDA

Director/a: Dr. Antoni Sureda Gomila
Director/a: Dr. Josep Antoni Tur Marí
Tutor/a: Dr. Antoni Sureda Gomila

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

La candidata a Doctora

Margalida Monserrat Mesquida

Con el beneplácito de los Directores

Dr. Antoni Sureda Gomila

Tutor de la Tesis Doctoral

Profesor Titular de Universidad

Área Bioquímica y Biología Molecular

Universitat de les Illes Balears

Dr. Josep Antoni Tur Marí

Catedrático de Universidad

Área de Fisiología

Universitat de les Illes Balears



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Antoni Sureda Gomila, de Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Marcadores de inflamación y estrés oxidativo en la prevención y reversión de la obesidad y sus comorbilidades asociadas*, presentada por Margalida Monserrat Mesquida para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma

Palma de Mallorca, 2 de Junio del 2022



Universitat
de les Illes Balears

Dr. Josep Antoni Tur Marí, de Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título *Marcadores de inflamación y estrés oxidativo en la prevención y reversión de la obesidad y sus comorbilidades asociadas*, presentada por Margalida Monserrat Mesquida para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma

Palma de Mallorca, 2 de Junio del 2022

Als meus pares, als meus padrins i a en Baltasar

*"Res a la vida ha de ser temut, només comprés.
Ara és el moment de comprendre més per témer menys".*
Marie Curie.

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el Grupo de Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo (NUCOX), integrado en el Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud de la Universitat de les Illes Balears (UIB), en el Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) y en el Institut d'Investigació Sanitària de les Illes Balears (IDISBA).

Se enmarca en el Programa de Doctorado en Nutrición y Ciencias de los Alimentos (RD99/2011) de la UIB y ha sido gracias a proyectos de investigación otorgados por diversas entidades: Agencia Estatal de Investigación Biomédica del Gobierno de España, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) a través del Fondo de Investigación para la Salud (FIS), cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Proyectos 11/01791, 14/00636, 17/01827 y 20/00456, Red Predimed-RETIC RD06/0045/1004 y CIBEROBN CB12/30/30038), Subvención de apoyo grupos de investigación (GC 35/2011) y la red NutRedox (COST Action CA16112) por el Programa de Cooperación Europea en Ciencia y Tecnología.

La investigación que ha dado lugar a estos resultados ha sido gracias al contrato de trabajo de investigadora predoctoral 2018-2022 por el CIBEROBN.



AGRAÏMENTS

Una vegada acabada la carrera de bioquímica, tenia molt clar que volia fer, ser professora a un Institut. Per aquest motiu, vaig realitzar el Màster en Formació al Professorat a la UIB. Però mentre feia el treball de fi de màster em va sortir l'oportunitat de tenir un contracte de 4 anys per a realitzar la Tesis Doctoral, va ser en aquell moment quan vaig creure que era una bona ocasió per aprofundir els meus coneixements. Vaig pensar que aquest tren només passa una vegada a la vida i que era el moment d'agafar-ho. I ara, que ja he fet aquest camí, estic molt contenta de la meva decisió.

En primer lloc vull agrair als meus directors de tesis, els doctors Antoni Sureda i Josep Antoni Tur per a donar-me la possibilitat de fer el doctorat amb ells, per a facilitar-me els mitjans per dur-la a terme i per aconsellar-me amb els seus coneixements. Gràcies per motivar-me sempre amb un "endavant", per les vostres bones paraules sempre que ho he necessitat i per acompanyar-me durant aquests 4 anys.

També vull agrair al doctors Antoni Pons per ajudar-me amb els seus coneixements d'enzimologia, a la doctora Maria del Mar Bibiloni per explicar-me l'estadística quan ho he hagut de menester i al doctor Miguel David Ferrer pel seu suport.

A la doctora Silvia Tejada per donar-me l'oportunitat d'impartir classes als estudiants de la UIB i també, per estar disposta en tot moment a donar-me una mà i aconsellar-me.

Als meus companys de laboratori, na Maria Magdalena, la meva amiga incondicional, que en poc temps t'has convertit amb una de les meves confidents. Milions de gràcies per estar al meu costat sempre, saps que aquesta tesis també forma part de la teva. Gràcies per treballar colze a colze tots els dies, superant juntes els obstacles que ens anàvem trobant per treure la feina endavant. Mai oblidaré tots els moments i emocions viscudes, tant les alegries com les llàgrimes, compartint preocupacions, somnis i il·lusions.

A na Clara, tots els moments viscuts durant els dos darrers anys s'han fet inoblidables, sempre recordaré els llonguets al bar d'en Tomeu, gràcies per sempre ser-hi i recolzar-

me, que aquesta amistat que hem format no acabi mai, has estat un suport molt important els dies bons i no tant bons, gràcies per sempre està disposada a escoltar-me i donar-me consell. A n'Antònia per alegrar-me el dematins amb el seus "Bon dia" i donar-me una mà sempre que ha fet falta. A en Xavi pels cafès al bar d'en Tomeu i per ajudar-me amb els càlculs quan ho he necessitat. A n'Edu per ensenyar-me les tècniques de laboratori quan vaig començar el doctorat i na Carla per deixar-me el relleu del laboratori.

A les meves companyes dietistes, Cris, Alicia i Sofy, per acompanyar-me a Barcelona i a Tarragona, per ajudar-me amb les mostres PPLUS. Especialment a na Cris, per explicar-me i ensenyar-me la logística del excels i les mostres biològiques al principi de la tesis. A les "Chicas FLIPAN", Catalina, Manu i Cristina per aclarir-me els dubtes que m'han anat sorgint amb les bases de dades. A na Silvia, Jèssica, Marina, Laura, Sandra i Patri per a recollir les dades antropomètriques dels pacients que he utilitzat durant el meu doctorat.

A l'equip d'infermeria, especialment a n'Emma i en David, moltes gràcies per a recollir totes les mostres biològiques durant tots aquests anys. Perquè la vostra feina és imprescindible, ja que sense mostres no hi ha experiments.

Als companys de despatxet que han anat passant durant els 4 anys de doctorat, Agustí, Esteban i Dani, per a compartir l'espai del laboratori 2 i tantes hores junts. Especialment a na Melania, per totes les xerrades tant necessàries mentre compartíem cotxe i per després seguir-te preocupant per la meva tesis. També a na Lida, Auba, Laura i Maria, que en un moment o l'altre ens hem hagut de coordinar per compartir els aparells del laboratori. No me vull oblidar de na Marina, gràcies per les xerrades al despatxet i per l'ajuda amb el Chemi-doc, d'en Toni, gràcies pel teu bon rotllo amb el teus "fluye" i la teva motivació diària, i d'en Pere, el vilafranquer que cada dia m'ha fet sentir més a prop de Felanitx amb els seus aires de poble.

A en Manu, per recolzar-me durant les meves pràctiques del curs d'experimentació animal, per a llevar-me la por i ensenyar-me a manipular correctament les rates.

Als grup d'ecologia i botànics, Amanda, Maria, Marcelo i Pere, per fer més agradables les hores compartides al laboratori.

Als conserges, Aina, Macià, Andreu i Joan, per ajudar-me amb la recepció i l'enviament de paquets, tant de material com de mostres biològiques.

Als tècnics de laboratori, Pep Miquel, Xisco, Guillem, Àngel, Tolo, Manu, Javi i Joan Miquel, per tenir sempre el material apunt i donar-me una mà sempre que m'ha fet falta.

Als companys d'Erasmus, Giuseppe, Francesca, Giorgia, Alessandro i Can, per aprendre a treballar amb persones d'altres universitats i per practicar l'anglès, especialment a na Federica per ensenyar-me la tècnica del Western Blot.

Als meus amics del grau de Bioquímica per alegrar-se dels meus èxits, especialment a na Mar Pasqual, que durant els meu primer any de tesis va ser investigadora col·laboradora del grup i em va ajudar activament a fer l'inventari de totes les mostres biològiques.

Als alumnes col·laboradors, TFGs i TFM's per donar-me una mà en tot el que han pogut.

Al personal de manteniment i neteja del edifici Guillem Colom per mantenir les instal·lacions dia a dia, especialment a na María, per alegrar-me els dematins amb les xerrades tan engrescadores al despatxet.

A les meves amigues i companyes de pis dels meus primers anys de doctorat, Joana i Marta, per viure amb mi el meu dia a dia. A les meves amigues, Bàrbara, Cata i Mariona per preocupar-vos i enviar-me missatges, sempre en positiu. A la resta d'amics i amigues per animar-me amb el doctorat.

A la meva família política des de fa quasi 9 anys, César, Francisca, Pedro, César, Aina i *abuela* Ana, per encoratjar-me en fer aquest camí en el moment que ho havia de decidir i a dia d'avui seguir animant-me.

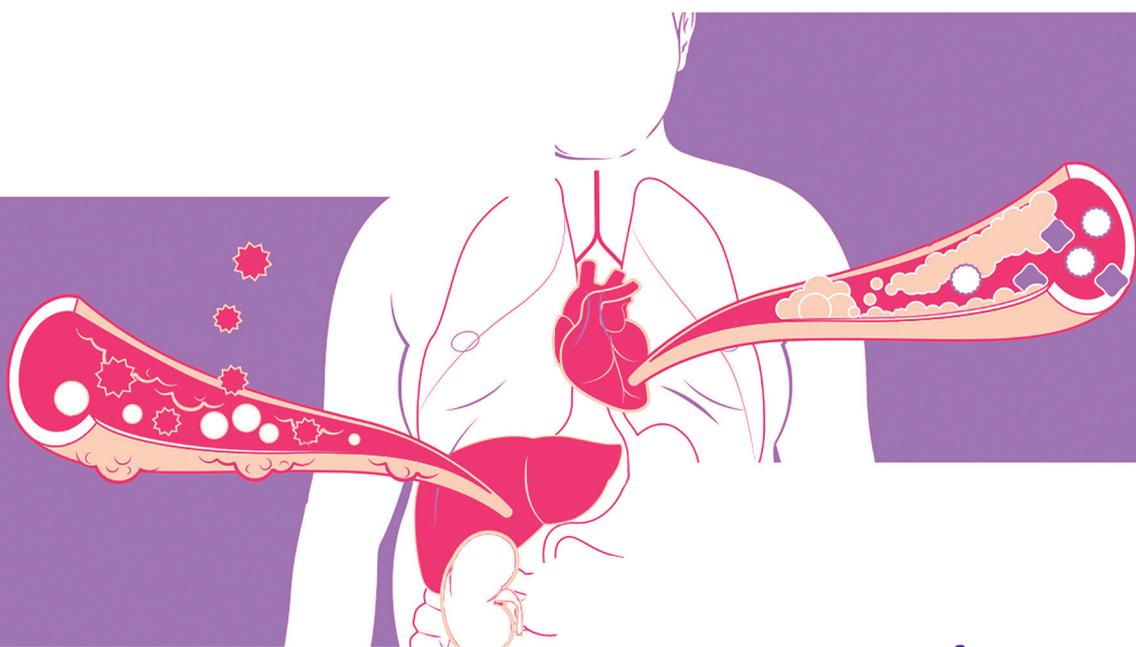
Als meus tios i cosins, pel seu suport i confiança, per preocupar-se i animar-me sempre. Especialment a la meva cosina Francina, la meva germana gran, gràcies per explicar-me les teves experiències durant el teu doctorat, les quals m’han encoratjat en el meu dia a dia. També al tio Sebastià per haver fet el disseny i la impressió de la tesis amb tanta cura i originalitat.

Als meus padrins, per setmana rere setmana, estar pendent de mi, tant en els moments bons com els no tant bons. Tot i que, el padrí Jaume ens ha deixat durant el meu doctorat, el segueix tenint molt present, gràcies pels vostres “Estudia, Margalida” de després dels dinars dels diumenges. A la padrina Margalida, tot i que no hi ha estat, sé que hagués estat molt orgullosa de veure’m arribar fins aquí. A la padrina Francisca per a transmetre’m la vostra energia positiva i la vostra empenta i el padrí Pere per ensenyar-me tota la vostra saviesa i bondat.

A mon pare, Toni, i a ma mare, Bel, els pilars de la meva vida, per aconsellar-me i donar-me suport sempre en les meves decisions i per animar-me a seguir endavant amb la meva carrera professional. Me sent molt orgullosa de tenir-vos perquè gràcies a vosaltres he après a ser qui som, a fer les coses el millor que sé i donar el millor a les persones que m’envolten. Gràcies per la confiança que heu depositat amb mi i tot el que m’heu ajudat sempre, fent tot el que estava a les vostres mans, i més, per jo. Estaré eternament agraïda.

Vull agrair d’una forma més personal al meu pare i a en César, per participar activament al projecte FLIPAN, per fer l’esforç perquè la meva tesis hagi tengut fruit.

I com no podia faltar, vull agrair d’una manera molt especial, al meu company de vida, en Baltasar, gràcies per la teva paciència, per aguantar-me en els moments més difícils, pel teu optimisme i la teva manera de veure les coses, per llevar-li importància al que em sembla un problema enorme. Per animar-me a diari, per donar la passa de viure junts durant el meu darrer any de tesis i per donar-me la mà en aquest camí. Sense el teu suport no hagués arribat fins aquí.



ÍNDICE

ÍNDICE

PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL.....	V
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN/RESUM/ABSTRACT	XV
INTRODUCCIÓN	1
1. EL SOBREPESO Y LA OBESIDAD	3
1.1 Definiciones.....	3
1.2 Epidemiología	6
1.3 Etiología.....	9
1.4 Comorbilidades	11
2. EL SÍNDROME METABÓLICO.....	12
2.1 Definición.....	12
2.2 Epidemiología	13
2.3 Etiología.....	14
2.4 Características patológicas.....	15
3. ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO.....	17
3.1 Definición.....	17
3.2 Epidemiología	18
3.3 Etiología.....	19
3.4 Diagnóstico.....	20
3.5 Estrategias terapéuticas.....	21
4. ESTRÉS OXIDATIVO.....	22
4.1 Especies reactivas de oxígeno	22
4.2 Efectos de las especies reactivas.....	23
4.3 Mecanismos de defensa antioxidante.....	25
4.4 Relación entre especies reactivas y síndrome metabólico.....	27
5. REPUESTA INFLAMATORIA.....	28
5.1 La respuesta inflamatoria aguda	29
5.2 La respuesta inflamatoria crónica.....	30
5.3 Resolución de la inflamación.....	31
5.4 Mediadores de inflamación	31
5.5 Relación entre inflamación y síndrome metabólico.....	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	35
1. HIPÓTESIS	37
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo general.....	37
2.2 Objetivos específicos	37
MÉTODOS.....	39
1. EL ESTUDIO PREDIMED-PLUS.....	41
1.1 Diseño y objetivos del estudio PREDIMED-PLUS.....	41
1.2 Características de los participantes del estudio	42
1.3 Comité de Ética y consentimiento informado	46
1.4 Estrategias de intervención en cada grupo.....	46
1.5 Recogida de información	47
2. EL ESTUDIO FLIPAN	48
2.1 Diseño y objetivos del estudio FLIPAN	48
2.2 Características de los participantes del estudio	50
2.3 Comité de Ética y consentimiento informado	53
2.4 Estrategias de intervención en cada grupo.....	54

2.5 Recogida de información	56
3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	58
4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.....	60
4.1 Biomarcadores de estrés oxidativo	60
4.2 Biomarcadores de inflamación.....	62
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
RESULTADOS	65
ARTÍCULO I.....	67
Metabolic Syndrome is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State.....	67
ARTÍCULO II.....	83
Peripheral Blood Mononuclear Cells Oxidative Stress and Plasma Inflammatory Biomarkers in Adults with Normal Weight, Overweight and Obesity.....	83
ARTÍCULO III.....	97
Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.....	97
ARTÍCULO IV.....	115
Effects of 2-year nutritional and lifestyle intervention on oxidative and inflammatory status in old adults at high cardiovascular risk	115
ARTÍCULO V.....	141
Improvement of Intrahepatic Fat Content (IFC) after 6 months of lifestyle intervention is related to a better oxidative stress and inflammatory status	141
ARTÍCULO VI.....	159
Increased adherence to the Mediterranean diet after lifestyle intervention improves oxidative and inflammatory status in patients with non-alcoholic fatty liver disease.....	159
RECAPITULACIÓN.....	189
1. POBLACIÓN CON SMET Y SIN SMET	191
1.1 Estrés oxidativo y estado pro-inflamatorio de la población con SMet vs. Sin SMet	192
2. POBLACIÓN CON SOBREPESO Y OBESIDAD	194
2.1 Parámetros antropométricos y hematológicos de la población con sobrepeso y obesidad.....	194
2.2 Biomarcadores antioxidantes y inflamatorios de la población con sobrepeso y obesidad	195
2.3 Efectos de la intervención en el estilo de vida en la población con sobrepeso y obesidad después de 2 años de seguimiento.....	197
3. POBLACIÓN CON EHGNA (PREVENCIÓN Y REVERSIÓN).....	200
3.1 Características de la población que padece la EHGNA	200
3.2 Biomarcadores no invasivos útiles para diagnosticar la EHGNA.....	200
3.3 Mejora del contenido de grasa intrahepática después de 6 meses de intervención en el estilo de vida	203
3.4 Efectos de la adherencia a la dieta mediterránea después de 6 meses de intervención en la población con EHGNA	206
CONCLUSIONES.....	211
BIBLIOGRAFÍA.....	215



PUBLICACIONES DE LA TESIS DOCTORAL

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Capó X, Bouzas C, Mateos D, Pons A, Tur JA, Sureda A. **Metabolic Syndrome is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State.**

Antioxidants (Basel). 2020 Mar 12;9(3):236.

DOI: 10.3390/antiox9030236; PMID: 32178436; PMCID: PMC7139344.

Factor de impacto (2020): 6,313

60/295 Biochemistry & Molecular Biology, Q1

11/143 Food Science & Technology, Q1

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, Capó X, Mateos D, Ugarriza L, Tur JA, Sureda A. **Peripheral Blood Mononuclear Cells Oxidative Stress and Plasma Inflammatory Biomarkers in Adults with Normal Weight, Overweight and Obesity.**

Antioxidants (Basel). 2021 May 20;10(5):813.

DOI: 10.3390/antiox10050813; PMID: 34065281; PMCID: PMC8161114.

Factor de impacto (2020): 6,313

60/295 Biochemistry & Molecular Biology, Q1

11/143 Food Science & Technology, Q1

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Abbate M, Montemayor S, Mascaró CM, Casares M, Tejada S, Abete I, Zulet MA, Tur JA, Martínez JA, Sureda A. **Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease.**

Antioxidants (Basel). 2020 Aug 16;9(8):759.

DOI: 10.3390/antiox9080759; PMID: 32824349; PMCID: PMC7463614.

Factor de impacto (2020): 6,313

60/295 Biochemistry & Molecular Biology, Q1

11/143 Food Science & Technology, Q1

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, García S, Mateos D, Gómez C, Gámez JM, Poulsen HE, Tur JA, Sureda A. **Effects of 2-year nutritional and lifestyle intervention on oxidative and inflammatory status in old adults at high cardiovascular risk.**

(Submitted article)

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, Montemayor S, Mascaró CM, Casares M, Llopart I, Gámez JM, Tejada S, Martínez JA, Tur JA, Sureda A. **Improvement of Intrahepatic Fat Content (IFC) after 6 months of lifestyle intervention is related to a better oxidative stress and inflammatory status.**

(Submitted article)

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, Montemayor S, Mascaró CM, Casares M, Llopart I, Ugarriza L, Martínez JA, Tur JA, Sureda A. **Increased adherence to the Mediterranean diet after lifestyle intervention improves oxidative and inflammatory status in patients with non-alcoholic fatty liver disease.**

(Submitted article)



ABREVIATURAS

8-OHdG	8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
8-oxodG	8-oxo-7m8-dihidro-2'-desoxiguanosina
8-oxoGuo	8-oxo-7,8-dihydroguanosina
AASLD	<i>American Association for the Study of Liver Diseases</i>
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
ALT	Alanina aminotransferasa
Apo	Apoproteínas
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
AST	Aspartato aminotransferasa
AUC	Área bajo la curva
CAT	Catalasa
CD	Dieta convencional
CK-18	Citoqueratina 18
CST	<i>Chester Step Test</i>
CuZnSOD	Cobre-zinc-superóxido dismutasa
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
EcSOD	Superóxido dismutasa extracelular
ECV	Enfermedad cerebrovascular
EGIR	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
ENT	Enfermedades no transmisibles
FGF21	Factor de crecimiento de fibroblastos 21
FLIPAN	Prevención y Reversión de la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico en pacientes Obesos con Síndrome Metabólico, mediante Dieta Mediterránea y Actividad Física
FMI	<i>Fat Mass Index</i>
GBD	<i>Global Burden of Disease</i>
GGT	Gamma-glutamilttransferasa
GPx	Glutación peroxidasa

GRd	Glutati3n reductasa
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado o disulfuro de glutati3n
HbA1c	Hemoglobina glicosilada A1c
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (Lipoprote3nas de alta densidad)
HUSE	Hospital Universitari Son Espases
ICC	3ndice cintura/cadera
ICT	3ndice cintura/talla
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFC	<i>Intrahepatic Fat Content</i> (Contenido graso intrahep3tico)
IL-1β	Interleuquina 1 β
IL-10	Interleuquina 10
IL-2	Interleuquina 2
IL-6	Interleuquina 6
IMC	3ndice de Masa Corporal
IMG	3ndice de Masa Grasa
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
ISCD	Sociedad Internacional de Densitometr3a Cl3nica
ISRCT	<i>International Estandar Randomized Controlled Trial</i>
JIS	<i>Joint Interim Statement</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (Lipoprote3nas de baja densidad)
LPS	Lipopolisac3rido
MAPK	Prote3nas quinasas activadas por mit3genos
MD-HMF	Dieta mediterr3nea con alta frecuencia de ingestas
MD-PA	Actividad f3sica y dieta mediterr3nea
MDA	Malondialdeh3do
MedDiet	Dieta Mediterr3nea
MnSOD	Super3xido dismutasa de manganeso
MPC-1	Prote3na quimioatrayente de monocitos 1
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adeninda dinucle3tido fosfato

NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	<i>Natural Killers</i>
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAD	Presión Arterial Diastólica
PAS	Presión Arterial Sistólica
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Proteína C reactiva
PDFF	<i>Proton Density Fat Fraction</i>
PREDIMED	PREvención con Dieta Mediterránea
PUFAS	Ácidos grasos poliinsaturados
REDOX	Regulación del estado redactor y oxidante
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNOS	Especies reactivas de nitrógeno
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	<i>Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SEM	Error estándar
SMet	Síndrome Metabólico
SOD	Superóxido dismutasa
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TG	Triglicéridos
TLR	<i>Toll like receptors</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor α</i> (Factor de Necrosis Tumoral α)
UIB	Universitat de les Illes Balears
UNAV	Universidad de Navarra
VLDL	<i>Very-low-density lipoprotein</i> (Lipoproteínas de muy baja densidad)
WHtR	<i>Waist-to-height ratio</i> (Relación cintura-altura)
XOD	Xantina oxidasa



RESUMEN
RESUM / ABSTRACT



Universitat
de les Illes Balears

MARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA PREVENCIÓN Y REVERSIÓN DE LA OBESIDAD Y SUS COMORBILIDADES ASOCIADAS

Tesis doctoral, Margalida Monserrat Mesquida, Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo, Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud, Universitat de les Illes Balears, IDISBA y CIBEROBN, Palma.

RESUMEN

La obesidad y el sobrepeso se consideran el mayor problema de salud pública en todo el mundo. Estos trastornos se caracterizan por un desequilibrio en el estado oxidativo/antioxidante y un estado inflamatorio subclínico de bajo grado acompañado de un alto riesgo de desarrollar diabetes, complicaciones arterioscleróticas y enfermedades cardiovasculares. El síndrome metabólico (SMet) engloba un conjunto de factores de riesgo cardiovascular que incluyen obesidad, resistencia a la insulina, niveles altos de triglicéridos, niveles bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad e hipertensión. La prevalencia del SMet, junto con la de la obesidad y el sobrepeso, se han visto incrementadas en los últimos años, debido al alto grado de sedentarismo y de la ingesta de dietas hipercalóricas de la población en general. La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es la enfermedad hepática crónica más común en las sociedades occidentales. Se caracteriza por la acumulación excesiva de lípidos, especialmente de triglicéridos en los hepatocitos del parénquima hepático, y en consecuencia, está fuertemente relacionado con el sobrepeso, la obesidad y la resistencia a la insulina.

El estrés oxidativo es un factor importante involucrado en la EHGNA, el SMet y la obesidad, que deriva de un desequilibrio entre los agentes prooxidantes y antioxidantes. El proceso inflamatorio es una respuesta fisiológica que permite al organismo recuperar las condiciones normales, eliminando o inhibiendo al agente causante de una infección y/o daño celular, restaurando la funcionalidad del tejido u órgano afectado.

El objetivo general de esta tesis es poner de manifiesto el estado prooxidante y proinflamatorio en pacientes con SMet y EHGNA y evaluar los efectos sobre los marcadores de inflamación y estrés oxidativo de una intervención nutricional basada en la MedDiet dirigida a la prevención y reversión de las comorbilidades asociadas a la obesidad y el sobrepeso.

Los resultados reflejan que los pacientes con SMet presentan situación de mayor grado de estrés oxidativo y un estado pro-inflamatorio con respecto al grupo control sin SMet. Los sujetos con SMet tienen menores niveles de enzimas antioxidantes, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), y niveles más elevados de enzima prooxidante mieloperoxidasa (MPO) que los sujetos sin SMet. En consonancia, los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) fueron más altos en pacientes con SMet, asimismo, el estado proinflamatorio de estos pacientes se pone de manifiesto con la presencia de citoquinas inflamatorias, como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

Al comparar la población con normopeso, sobrepeso y obesidad, los resultados reflejan diferencias a medida que aumenta el Índice de Masa Corporal (IMC) de los sujetos. La glucemia, la trigliceridemia, la obesidad abdominal y la relación cintura-altura (*waist-to-height ratio*, WHtR), son más altos en pacientes obesos, mientras que estos presenten niveles de colesterol HDL más bajo. Los participantes con sobrepeso y obesidad presentan un aumento progresivo en los leucocitos circulantes y en el grado de estrés oxidativo, ya que las actividades de todas las enzimas antioxidantes en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMCs), así como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumentan progresivamente con el IMC. Este aumento también se refleja en las citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF α) en plasma.

Después de 2 años de intervención de los pacientes del estudio PREDIMED-PLUS, se observó una mayor reducción de la obesidad abdominal, la presión arterial y los niveles de triglicéridos en el grupo intervención. Además, se demostró una mejora del estrés oxidativo y los marcadores proinflamatorios con una reducción significativa de los niveles de MPO, xantina oxidasa (XOD), MDA, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP1) y un aumento de los polifenoles en plasma. También, se encontró una

disminución en la producción de ROS en PBMCs y los niveles de neutrófilos después de la activación de zymosan y lipopolisacárido en el grupo intervención con respecto al grupo control. Por lo que, la intervención con MedDiet hipocalórica podría ser útil para mejorar el estrés oxidativo y el estado proinflamatorio y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares en pacientes con SMet.

En relación con el contenido graso intrahepático en pacientes con EHGNA tras su valoración por Resonancia Magnética Nuclear (RMN), los participantes con un contenido graso intrahepático mayor presentan niveles más altos en plasma de MDA, CAT, SOD, IL-6, citoqueratina 18 (CK-18), irisina, pero niveles más bajos de resolvina D1, y ningún cambio en el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21). Estos marcadores pueden ser útiles para la práctica clínica. En concordancia, los marcadores bioquímicos (glucemia, hemoglobina glicosilada, triglicéridos) empeoraron progresivamente según el contenido graso intrahepático, así como los niveles de presión arterial sistólica y diastólica. Después de 6 meses de intervención en el estilo de vida de los pacientes con EHGNA, los principales resultados reflejan una reducción del contenido graso intrahepático, el cual se relaciona con una mejora en el estado pro/antioxidante y proinflamatorio (concretamente de los niveles plasmáticos de CAT, irisina y CK-18) y una mejora de la capacidad aeróbica, independientemente del tipo de intervención seguida. Además, una mayor adherencia a la MedDiet se relaciona con una mayor mejora en contenido graso intrahepático, capacidad cardiorespiratoria, estrés prooxidativo y estado proinflamatorio en pacientes con EHGNA tras 6 meses de intervención nutricional basada en MedDiet.

En conclusión, la presente tesis doctoral ha puesto de manifiesto como pacientes con sobrepeso/obesidad y con MetS presentan un estado prooxidante y proinflamatorio más elevado respecto a pacientes con normopeso y sin MetS. De forma similar, se ha observado el mismo patrón en pacientes con EHGNA cuando se comparan con pacientes sin la patología, así como un incremento del nivel de estrés oxidativo y estado proinflamatorio a medida que se incrementa el grado de esteatosis. Además, una intervención nutricional basada en el patrón de dieta mediterránea hipocalórica mejora los indicadores de este estado prooxidante y proinflamatorio tanto en los pacientes con MetS como con EHGNA.



Universitat
de les Illes Balears

MARCADORS D'INFLAMACIÓ I ESTRÈS OXIDATIU PER A LA PREVENCIÓ I REVERSIÓ DE L'OBESITAT I LES SEVES COMMORBILITATS ASSOCIADES

Tesis doctoral, Margalida Monserrat Mesquida, Grup de Recerca en Nutrició Comunitària i Estrès Oxidatiu, Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, IDISBA i CIBEROBN, Palma.

RESUM

L'obesitat i el sobrepès es consideren el problema de salut pública més gran de tot el món. Aquests trastorns es caracteritzen per un desequilibri a l'estat oxidatiu/antioxidant i un estat inflamatori subclínic de baix grau acompanyat d'un alt risc de desenvolupar diabetis, complicacions arterioscleròtiques i malalties cardiovasculars. La síndrome metabòlica (SMet) engloba un conjunt de factors de risc cardiovascular que inclouen obesitat, resistència a la insulina, nivells alts de triglicèrids, nivells baixos de colesterol unit a lipoproteïnes d'alta densitat i hipertensió. La prevalença del SMet, juntament amb la de l'obesitat i el sobrepès, s'han vist incrementades els darrers anys, a causa de l'alt grau de sedentarisme i de la ingesta de dietes hipercalòriques de la població en general. La malaltia del fetge gras no alcohòlic (MFGNA) és la malaltia hepàtica crònica més comú a les societats occidentals. Es caracteritza per l'acumulació excessiva de lípids, especialment de triglicèrids als hepatòcits del parènquima hepàtic, i en conseqüència, està fortament relacionada amb el sobrepès, l'obesitat i la resistència a la insulina.

L'estrès oxidatiu és un factor important involucrat amb la MFGNA, el SMet i l'obesitat, que deriva d'un desequilibri entre els agents prooxidants i els antioxidants. El procés inflamatori és una resposta fisiològica que permet recuperar les condicions normals a l'organisme, eliminant o inhibint l'agent causant d'una infecció i/o dany cel·lular, restaurant la funcionalitat del teixit o òrgan afectat.

L'objectiu general d'aquesta tesi és posar de manifest l'estat prooxidant i proinflamatori en pacients amb SMet i MFGNA i avaluar-ne els efectes sobre els marcadors d'inflamació i estrès oxidatiu d'una intervenció nutricional basada en la MedDiet adreçada a la prevenció i la reversió de les comorbilitats associades a l'obesitat i el sobrepès.

Els resultats reflecteixen que els pacients amb SMet presenten situació de major grau d'estrès oxidatiu i un estat proinflamatori respecte al grup control sense SMet. Els subjectes amb SMet tenen menors nivells d'enzims antioxidants, catalasa (CAT) i superòxid dismutasa (SOD), i nivells més elevats d'enzim prooxidant mieloperoxidasa (MPO) que els subjectes sense SMet. En consonància, els nivells plasmàtics de malondialdehid (MDA) van ser més alts en pacients amb SMet, així mateix, l'estat proinflamatori d'aquests pacients es posa de manifest amb la presència de citocines inflamatòries, com la interleuquina-6 (IL-6) i el factor de necrosi tumoral alfa ($TNF\alpha$).

En comparar la població amb normopes, excés de pes i obesitat, els resultats reflecteixen diferències a mesura que augmenta l'Índex de Massa Corporal (IMC) dels subjectes. La glucèmia, la trigliceridèmia, l'obesitat abdominal i la relació cintura-altura (*waist-to-height ratio*, WHtR), són més alts en pacients obesos, mentre que aquests presenten nivells de colesterol HDL més baix. Els participants amb sobrepès i obesitat presenten un augment progressiu en els leucòcits circulants i en el grau d'estrès oxidatiu, ja que les activitats de tots els enzims antioxidants a les cèl·lules mononuclears de la sang perifèrica (PBMCs), així com la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS), augmenten progressivament amb l'IMC. Aquest augment també es reflecteix a les citocines proinflamatòries (IL-6 i $TNF\alpha$) en plasma.

Després de 2 anys d'intervenció dels pacients de l'estudi PREDIMED-PLUS, es va observar una reducció més gran de l'obesitat abdominal, la pressió arterial i els nivells de triglicèrids en el grup intervenció. A més, es va demostrar una millora de l'estrès oxidatiu i els marcadors proinflamatoris amb una reducció significativa dels nivells de MPO, xantina oxidasa (XOD), MDA, proteïna quimioatrayent de monòcits-1 (MCP1) i un augment dels polifenols en plasma. També, es va trobar una disminució en la producció de ROS a PBMCs i els nivells de neutròfils després de l'activació de zymosan i

lipopolisacàrid en el grup intervenció respecte al grup control. Per això, la intervenció amb MedDiet hipocalòrica podria ser útil per millorar l'estrès oxidatiu i l'estat proinflamatori i reduir el risc de malalties cardiovasculars en pacients amb SMet.

En relació amb el contingut gras intrahepàtic en pacients amb EHGNA després de la seva valoració per Ressonància Magnètica Nuclear (RMN), els participants amb un contingut gras intrahepàtic més gran presenten nivells més alts en plasma de MDA, CAT, SOD, IL-6, citoqueratina 18 (CK-18), irisina, però nivells més baixos de resolvina D1, i cap canvi en el factor de creixement de fibroblasts 21 (FGF21). Aquests marcadors poden ser útils per a la pràctica clínica. En concordança, els marcadors bioquímics (glucèmia, hemoglobina glicosilada, triglicèrids) van empitjorar progressivament segons el contingut gras intrahepàtic, així com els nivells de pressió arterial sistòlica i diastòlica. Després de 6 mesos d'intervenció en l'estil de vida dels pacients amb EHGNA, els principals resultats reflecteixen una reducció del contingut gras intrahepàtic, el qual es relaciona amb una millora en l'estat pro/antioxidant i proinflamatori (concretament dels nivells plasmàtics de CAT, irisina i CK-18) i una millora de la capacitat aeròbica, independentment del tipus d'intervenció seguida. A més, una major adherència a la MedDiet es relaciona amb una millora millor en contingut gras intrahepàtic, capacitat cardiorespiratòria, estrès prooxidatiu i estat proinflamatori en pacients amb EHGNA després de 6 mesos d'intervenció nutricional basada en MedDiet.

En conclusió, aquesta tesi doctoral ha posat de manifest com a pacients amb sobrepès/obesitat i amb MetS presenten un estat prooxidant i proinflamatori més elevat respecte a pacients amb normopes i sense MetS. De manera similar, s'ha observat el mateix patró en pacients amb EHGNA quan es comparen amb pacients sense patologia, així com un increment del nivell d'estrès oxidatiu i estat proinflamatori a mesura que s'incrementa el grau d'esteatosi. A més, una intervenció nutricional basada en el patró de dieta mediterrània hipocalòrica millora els indicadors d'aquest estat prooxidant i proinflamatori tant als pacients amb MetS com a EHGNA.



Universitat
de les Illes Balears

MARKERS OF INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN THE PREVENTION AND REVERSAL OF OBESITY AND ITS ASSOCIATED COMORBIDITIES

PhD Thesis, Margalida Monserrat Mesquida, Research Group on Community Nutrition and Oxidative Stress, Department of Fundamental Biology and Health Science, University of the Balearic Islands, IDISBA and CIBEROBN, Palma.

ABSTRACT

Obesity and overweight are considered the biggest public health problem in the world. These disorders are characterized by an imbalance in oxidative/antioxidant status and a subclinical low-grade inflammatory state accompanied by a high risk of developing diabetes, arteriosclerotic complications, and cardiovascular disease. Metabolic syndrome (MetS) encompasses a set of cardiovascular risk factors that include obesity, insulin resistance, high triglyceride levels, low high-density lipoprotein cholesterol levels, and hypertension. The prevalence of MetS, together with that of obesity and overweight, have increased in recent years, due to the high degree of sedentary lifestyle and the intake of hypercaloric diets in the general population. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disease in Western societies. It is characterized by the excessive accumulation of lipids, especially triglycerides, in the hepatocytes of the liver parenchyma, and consequently, it is strongly related to overweight, obesity, and insulin resistance.

Oxidative stress is an important factor involved in NAFLD, MetS and obesity, which derives from an imbalance between prooxidant and antioxidant agents. The inflammatory process is a physiological response that allows the body to recover normal conditions, eliminating or inhibiting the agent causing an infection and/or cell damage, restoring the functionality of the affected tissue or organ.

The general objective of this thesis is to reveal the prooxidant and proinflammatory state in patients with MetS and NAFLD and to evaluate the effects on markers of inflammation and oxidative stress of a nutritional intervention based on the MedDiet aimed at the prevention and reversal of comorbidities associated with obesity and overweight.

The results reflect that patients with MetS present a situation of higher degree of oxidative stress and a pro-inflammatory state with respect to the control group without MetS. Subjects with MetS have lower levels of antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), and higher levels of the prooxidant enzyme myeloperoxidase (MPO) than subjects without MetS. Accordingly, plasma levels of malondialdehyde (MDA) were higher in patients with MetS, likewise, the proinflammatory state of these patients is evidenced by the presence of inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α).

When comparing the population with normal weight, overweight and obesity, the results reflect differences as the Body Mass Index (BMI) of the subjects increases. Glycemia, triglyceridemia, abdominal obesity, and waist-to-height ratio (WHtR) are higher in obese patients, while these have lower HDL cholesterol levels. Overweight and obese participants present a progressive increase in circulating leukocytes and in the degree of oxidative stress, as the activities of all antioxidant enzymes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as well as the production of reactive species of oxygen (ROS), increase progressively with BMI. This increase is also reflected in proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF α) in plasma.

After 2 years of intervention in the PREDIMED-PLUS study patients, a greater reduction in abdominal obesity, blood pressure, and triglyceride levels was observed in the intervention group. Furthermore, an improvement in oxidative stress and proinflammatory markers was demonstrated with a significant reduction in the levels of MPO, xanthine oxidase (XOD), MDA, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), and an increase in plasma polyphenols. Also, a decrease in ROS production in PBMCs and neutrophil levels was found after zymosan and lipopolysaccharide activation in the

intervention group compared to the control group. Therefore, intervention with a hypocaloric MedDiet could be useful to improve oxidative stress and the proinflammatory state and reduce the risk of cardiovascular diseases in patients with MetS.

In relation to intrahepatic fat content in patients with NAFLD after assessment by Nuclear Magnetic Resonance (MRI), participants with higher intrahepatic fat content have higher plasma levels of MDA, CAT, SOD, IL-6, cytokeratin 18 (CK-18), irisin, but lower levels of resolvin D1, and no change in fibroblast growth factor 21 (FGF21). These markers may be useful in clinical practice. In agreement, biochemical markers (glycemia, glycosylated hemoglobin, triglycerides) progressively worsened according to intrahepatic fat content, as well as systolic and diastolic blood pressure levels. After 6 months of intervention in the lifestyle of patients with NAFLD, the main results reflect a reduction in intrahepatic fat content, which is related to an improvement in the pro/antioxidant and proinflammatory state (specifically plasma levels of CAT, irisin and CK-18) and an improvement in aerobic capacity, regardless of the type of intervention followed. In addition, greater adherence to the MedDiet is related to greater improvement in intrahepatic fat content, cardiorespiratory fitness, prooxidative stress, and proinflammatory status in patients with NAFLD after 6 months of MedDiet-based nutritional intervention.

In conclusion, this doctoral thesis has shown how overweight/obese patients with MetS have a higher pro-oxidant and pro-inflammatory state compared to patients with normal weight and without MetS. Similarly, the same pattern has been observed in patients with NAFLD when compared to patients without the pathology, as well as an increase in the level of oxidative stress and proinflammatory state as the degree of steatosis increases. In addition, a nutritional intervention based on the hypocaloric Mediterranean diet pattern improves the indicators of this pro-oxidant and pro-inflammatory state in both MetS and NAFLD patients.



INTRODUCCIÓN

1. EL SOBREPESO Y LA OBESIDAD

La obesidad entendida como una acumulación excesiva de grasa se considera una clara amenaza para la salud pública en todo el mundo y, junto con el sobrepeso, constituye uno de los principales factores que promueven las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) [1] y el mayor problema de salud crónica en adultos, adolescentes y niños [2]. La obesidad se asocia además con un aumento del estrés oxidativo y del estado pro-inflamatorio [3]. La patogenia de este trastorno se caracteriza por la existencia de un desequilibrio en el estado oxidativo/antioxidante y un estado inflamatorio subclínico de bajo grado que da lugar a un mayor riesgo de complicaciones ateroscleróticas y diabéticas [4]. Varios estudios han observado que los pacientes con sobrepeso y obesidad tiene una significativa correlación positiva entre el Índice de Masa Corporal (IMC) y los biomarcadores de estrés oxidativo [5,6].

1.1 DEFINICIONES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede perjudicar la salud. En el caso de los adultos, considera sobrepeso cuando el IMC es igual o superior a 25, mientras que considera obesidad cuando el IMC es igual o superior a 30 [7]. Según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO), la obesidad se define por un porcentaje de masa grasa superior al 25% en hombres y al 33% en mujeres [8].

ESTADO NUTRICIONAL

El estado nutricional depende del grado en que las necesidades fisiológicas, bioquímicas y metabólicas de nutrientes estén cubiertas por la ingesta de los alimentos que componen la dieta. La evaluación del estado nutricional incluye: historia clínica, historia dietética, parámetros antropométricos y composición corporal, y datos bioquímicos [9]. Existen diferentes métodos para determinar la composición corporal: (a) métodos directos, basados en la disección de cadáveres; (b) métodos indirectos, basados en la relación de variables entre los que encontramos la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética nuclear (RMN), la absorciometría dual de rayos X y la plestimografía; y (c) métodos doblemente indirectos destacando la antropometría y la impedancia bioeléctrica, que utilizan ecuaciones derivadas del método indirecto [10].

No existe un consenso claro para una clasificación del estado nutricional siguiendo los métodos descritos anteriormente.

Según el IMC, sí hay un consenso para categorizar el estado nutricional. El IMC informa de si el peso y la talla corporal mantienen una relación adecuada, ya que se calcula dividiendo el peso por el cuadrado de la talla, y se expresa en kg/m^2 [7]. Aunque el IMC no distingue entre masa muscular y masa grasa, es la referencia estándar universal para determinar el peso corporal normal. En la **Tabla 1** aparecen los criterios, que han establecido la OMS, guías Europeas y la SEEDO, para clasificar el estado nutricional de los adultos (mayores de 18 años) a partir del IMC:

Tabla 1: Clasificación del estado nutricional en adultos de acuerdo al IMC.

Puntos de corte IMC (kg/m^2)	OMS 2021 [11]	Guías Europeas 2019 [12]	SEEDO 2016 [8]
< 16,5	Severamente bajo de peso	-	-
< 18,5	Bajo peso	Bajo peso	Peso insuficiente
18,5 – 24,9	Normopeso	Normopeso	Normopeso
25,0 – 26,9	Sobrepeso	Sobrepeso	Sobrepeso grado I
27,0 – 29,9			Sobrepeso grado II
30,0 – 34,9	Obesidad clase I	Obesidad clase I	Obesidad leve o clase I
35,0 – 39,9	Obesidad clase II	Obesidad clase II	Obesidad moderada o clase II
$\geq 40,0$	Obesidad clase III	Obesidad clase III	Obesidad grave, mórbida o clase III

El IMC se considera un buen estimador de la grasa corporal y más preciso que las mediciones de pliegues cutáneos. Sin embargo, el uso del IMC tiene ciertas limitaciones, ya que no informa de la distribución de la grasa corporal, no diferencia entre masa magra y masa grasa ni tampoco diferencia entre mujeres y hombres, aunque la distribución de la grasa es significativamente diferente entre géneros [13,14]. Otra medida para diagnosticar la obesidad es el índice de masa grasa (IMG) (*fat mass index*, FMI, en inglés) que se calcula dividiendo la grasa corporal total por la altura al cuadrado. La Sociedad Internacional de Densitometría Clínica (ISCD) ha propuesto el uso del IMG como método alternativo para definir las categorías de grasa corporal [15]. El IMC tiene menor sensibilidad para el diagnóstico de la obesidad que el IMG, ya que el IMC no

diferencia entre masa grasa y masa magra. En cambio, el IMG tiene la ventaja de proporcionar una única medida de grasa e indicar la ubicación específica de la grasa en lugar de la cantidad de grasa, lo cual es relevante para la desregulación metabólica. Sin embargo, no se han encontrado diferencias relevantes en la prevalencia de dislipidemia, diabetes, hipertensión y síndrome metabólico (SMet) entre el IMC y los estados de obesidad categorizados por IMG [16]. Por este motivo, se requieren más investigaciones sobre el IMG y el síndrome metabólico [16].

DISTRIBUCIÓN DE LA GRASA CORPORAL

Además de conocer el grado de obesidad de un sujeto, resulta de interés poder identificar la distribución del tejido adiposo, dado que el aumento de la grasa visceral que se observa en la obesidad de predominio central tiene un valor predictivo de alteraciones metabólicas y enfermedad cardiovascular.

El **perímetro de la cintura** tiene gran importancia como indicador de riesgo cardiovascular, y se interpretan como valores de alto riesgo perímetros de circunferencia iguales o superiores a 88 cm en las mujeres y a 102 cm en los hombres [12,17]. Sin embargo, aunque el perímetro de la cintura se utiliza como índice de la distribución grasa y del riesgo cardiovascular asociado, hay que tener en cuenta que no contempla otros factores como la complexión física del sujeto. Además, no existe un consenso uniforme sobre el punto anatómico de referencia de medida, recomendándose incluso que se tome a la altura del borde superior de la cresta ilíaca; si bien no sería recomendado a la altura del ombligo, ya que en este caso puede variar en función de lo caído que esté el abdomen.

Con la medida del perímetro de la cintura y de la cadera, se puede calcular el **índice cintura/cadera** (ICC= cintura en cm/ cadera en cm), un índice que informa de la grasa visceral. Se pueden distinguir 3 tipos diferentes de obesidad, teniendo en cuenta esta relación [18]:

1. Obesidad androide: mayor concentración de grasa en el abdomen y en la parte alta del cuerpo, más frecuente en hombres. Es la de mayor riesgo para las enfermedades cardiovasculares y metabólicas, por ejemplo, hipertensión, hiperinsulinemia, diabetes y accidentes cardiovasculares [19].
2. Obesidad ginoide o ginecoide: acumulación de grasa en las caderas, glúteos y muslos, más común en mujeres. Está asociada a más riesgo de varices y complicaciones articulares en miembros inferiores.
3. Obesidad de distribución homogénea: la acumulación de grasa se produce sin predominio zonal.

Se considera obesidad androide cuando este cociente es $>1,0$ en los hombres y $>0,9$ en las mujeres, y ginecoide cuando este cociente es $<1,0$ en los hombres y $<0,9$ en las mujeres [20]. Sin embargo, al no ser independiente del grado de obesidad, y por la mayor variabilidad de la mujer, en la práctica clínica el ICC ha sido sustituido por el perímetro de la cintura.

Con la medida del perímetro de cintura y la talla, se calcula el **índice cintura/talla** (ICT= cintura en cm/estatura en cm), el cual es un índice interesante porque informa de la grasa abdominal pero, en este caso, estandarizada por la estatura. Un ICT igual o superior a 0,5 es un buen predictor del riesgo cardiovascular y presenta una fuerte asociación con otros componentes del SMet, como por ejemplo elevadas concentraciones de triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre, así como con hipertensión arterial. Este índice sobretodo se usa, sobre todo, para diagnosticar la obesidad infantil [21].

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

Estimaciones recientes de la OMS a nivel mundial informan de que desde 1975 la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo. En 2016, más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. Alrededor del 39% de la población adulta mundial tenían sobrepeso (un 39% de los hombres y un 40% de las mujeres), mientras que un 13% de los adultos eran obesos (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) [7]. Según la Oficina Estadística de la Unión Europea (Eurostat), en 2019 el 52,7% de la población adulta (18 años o más) tenían sobrepeso [22]. La

obesidad no es solo un problema para los adultos, en 2016, 41 millones de niños menores de cinco años y más de 340 millones de niños y adolescentes, de entre 5 a 19 años, padecían obesidad o sobrepeso [7,23,24]. La prevalencia del sobrepeso y la obesidad en niños y adolescentes ha aumentado de forma alarmante, del 4% en 1975 a más del 18% en 2016, similar en ambos sexos. En 2016 un 18% de niñas y un 19% de niños padecían sobrepeso. Respecto a la obesidad, en 2016 eran 124 millones (un 6% de las niñas y un % de los niños), mientras que en 1975 había menos de un 1% de niños y adolescentes de 5 a 19 años con obesidad [7].

De acuerdo con los datos más recientes, en la **Figura 1** se representa la prevalencia de obesidad en los distintos países del mundo en el año 2021. Se puede observar como América y Europa son las regiones con mayor prevalencia de obesidad. Concretamente, Estados Unidos y México son los dos países con mayor prevalencia en la región americana. Por el contrario, las regiones del pacífico oeste y el sud-este asiático son las que registran las prevalencias más bajas. Específicamente, en España, en el año 2021 el porcentaje de adultos obesos es del 23,80% [25].

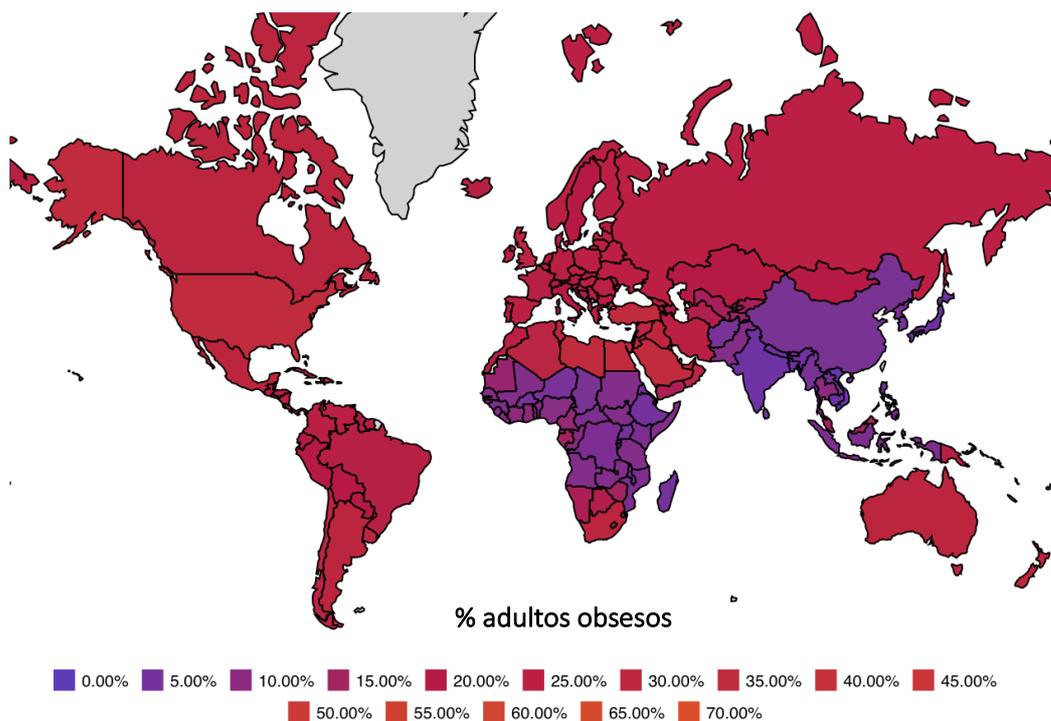


Figura 1: Porcentaje de adultos obesos por país en 2021. Adaptado de *Obesity Rates By Country 2021*[25] .

De acuerdo con el informe de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), en la **Figura 2** se refleja una proyección de la prevalencia de la obesidad para el año 2030 en diferentes países. Se observa un aumento constante de las tasas de obesidad y se espera que los niveles de obesidad sean altos en los Estados Unidos, México e Inglaterra, donde un 47%, 39% y 35% de la población, respectivamente, se prevé que sea obesa en 2030. Por contrario, se espera que el aumento sea más débil en Italia y Corea con tasas de obesidad en 13% y 9% en 2030, respectivamente. Se prevé que la obesidad en Francia casi igualará a la de España, con un 21% en 2030. Mientras que en Corea y Suiza, se prevé que aumente a un ritmo más rápido donde las tasas han sido históricamente bajas [26].

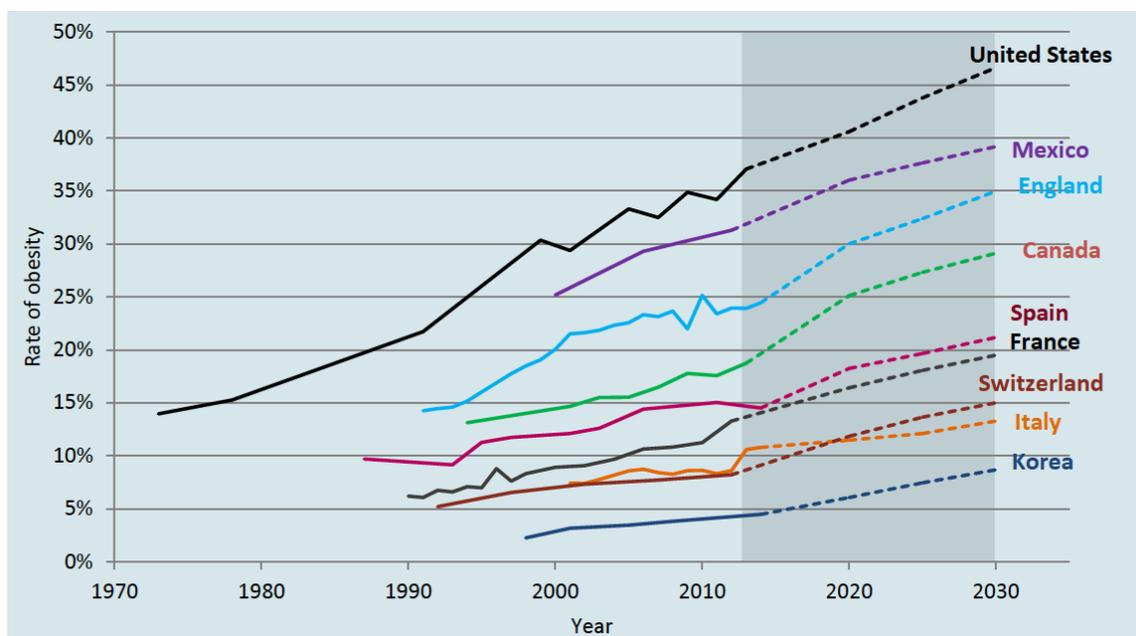


Figura 2: Proyección de las tasas de obesidad (IMC > 30 kg/m²) en adultos por países para el año 2030. Adaptado de *Obesity Update 2017* de la OCDE [26].

De acuerdo a los resultados del estudio DORICA [27], se estima la prevalencia en un 15,5% de la obesidad en la población adulta española entre 25 y 64 años, con una prevalencia más elevada en mujeres que en hombres, un 17,5% y un 13,2% respectivamente. En la **Figura 3** se muestra la distribución de la prevalencia de obesidad en España en porcentaje por áreas geográficas y sexo, donde se evidencia una mayor proporción de obesos en las regiones Noroeste, Murcia Sur y Canarias [28].

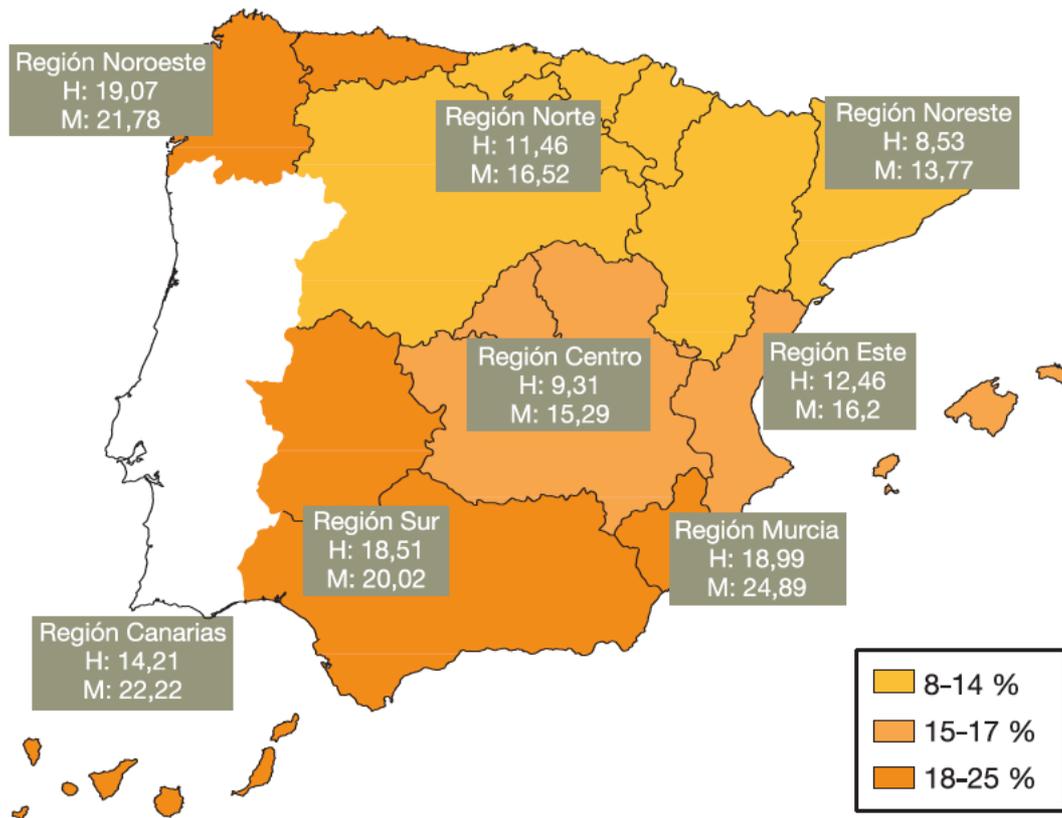


Figura 3: Distribución de la prevalencia de obesidad (%) por áreas geográficas y sexo. Estudio DORICA. Adaptado de Rubio et al. (2007). [29]

1.3 ETIOLOGÍA

Las causas de la obesidad son complejas y multifactoriales [30]. El desarrollo de la obesidad se describe como un desequilibrio energético debido a una ingesta calórica excesiva y/o un gasto calórico insuficiente o inadecuado, provocando una acumulación de grasa y un exceso de peso corporal [31]. Sin embargo, la regulación del balance energético y las reservas energéticas están influenciadas por interacciones complejas entre factores biológicos (como genéticos o epigenéticos), sociales, conductuales y ambientales (como el estrés crónico) [32,33]. La obesidad es el resultado de la relación entre la fisiología y el comportamiento del individuo y su entorno social (**Figura 4**) [34].

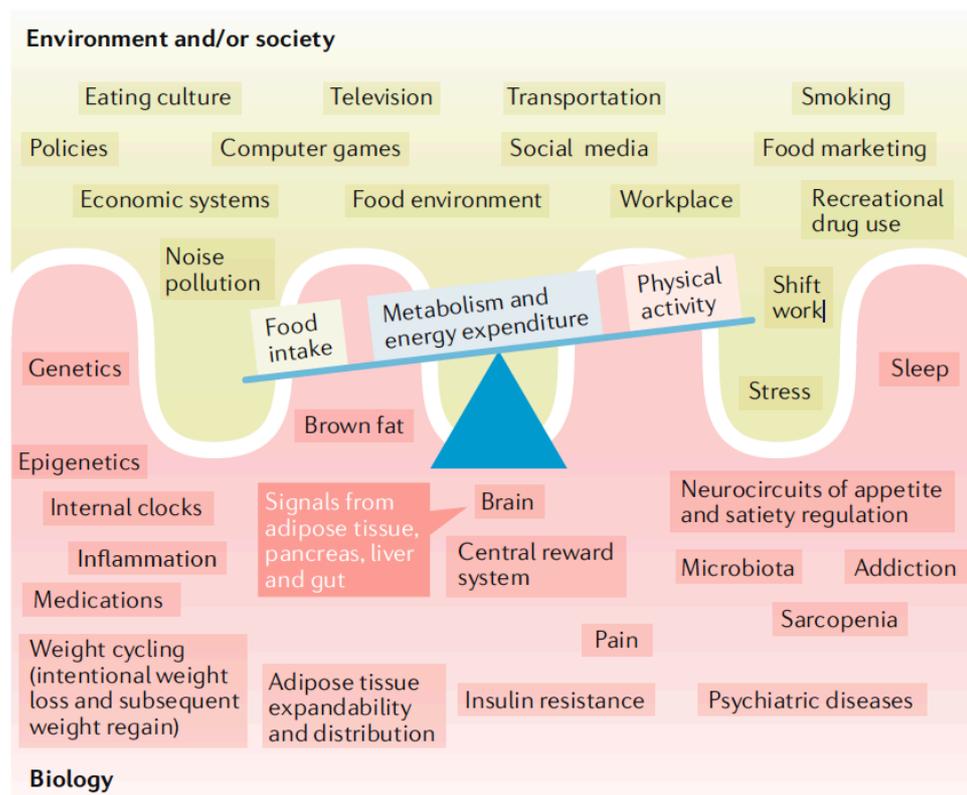


Figura 4: Factores biológicos, ambientales y sociales complejos que contribuyen a la obesidad. Adaptado de Blüher (2019) [34].

A nivel mundial, según la OMS, ha habido una mayor ingesta de alimentos densos en energía con alto contenido de grasas y azúcares, acompañado de una disminución de la actividad física debido al aumento del sedentarismo de muchas formas de trabajo, modos de transporte cambiantes y la creciente urbanización [7]. Además, la falta de políticas de apoyo en sectores como la salud, la agricultura, el transporte, el medio ambiente, el procesamiento de alimentos, la distribución, la comercialización y la educación causan cambios en los patrones de actividad física y dietética de la población [7].

Un estudio de la OCDE ha estimado que los hombres dedican 720 minutos al día a comportamientos sedentarios (incluyendo trabajo y viajes motorizados), mientras que las mujeres destinan 620 minutos a estas mismas actividades. Además, este mismo estudio, encontró que los hombres y mujeres pasan entre 80 y 150 minutos al día, respectivamente, realizando de actividad física (deporte, actividad física doméstica, viajes activos y actividad física ocupacional) [35].

1.4 COMORBILIDADES

Según la OMS, las comorbilidades de la obesidad incluyen: enfermedad coronaria, hipertensión y accidente cerebrovascular, ciertos tipos de cáncer, diabetes mellitus no insulino dependiente o de tipo 2 (DMT2), enfermedad de la vesicular biliar, dislipemia, osteoartritis y gota, y enfermedades pulmonares, incluida la apnea del sueño [36].

De acuerdo con las guías Europeas para el manejo de la obesidad del año 2019 [12], en la **Figura 5** se ilustran las comorbilidades más relevantes.

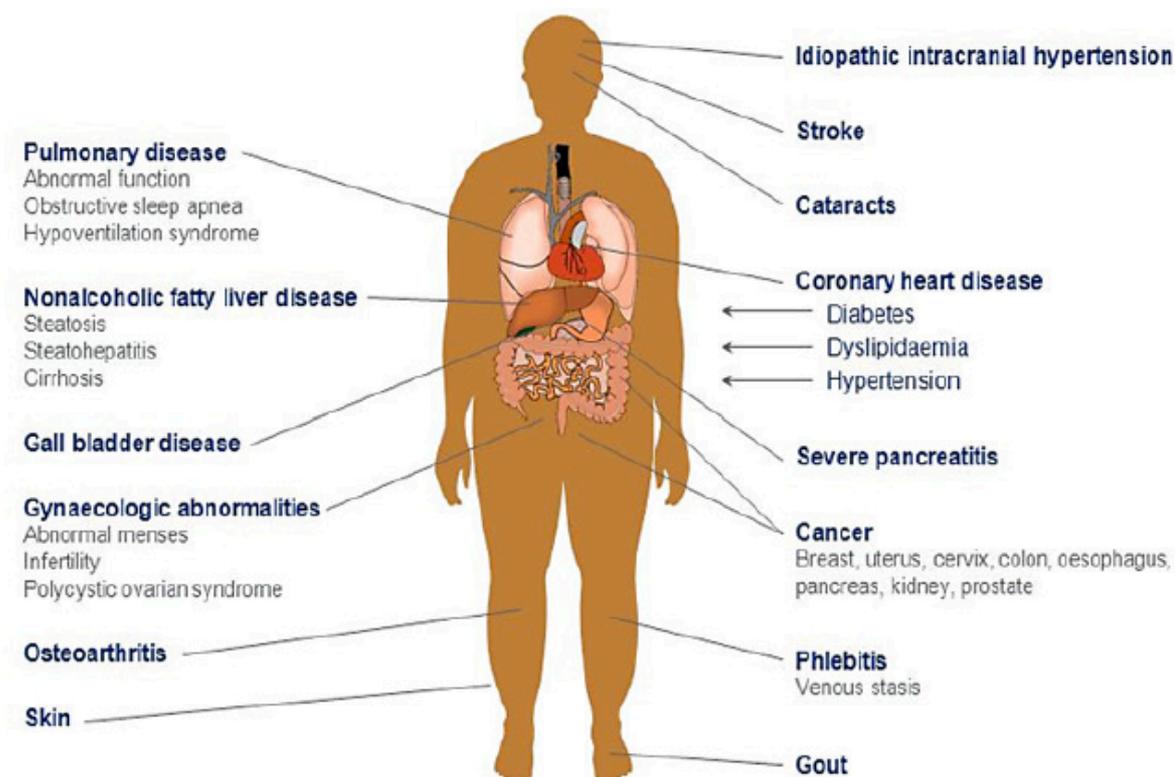


Figura 5. La obesidad y sus múltiples comorbilidades que afectan a muchos sistemas, órganos y tejidos. Modificada de Durrer Schutz et al 2019 [12].

De estas comorbilidades se puede destacar las enfermedades respiratorias (asma, hipoxemia, apnea obstructiva del sueño, síndrome de hipoventilación de la obesidad), enfermedades de hígado graso no alcohólico (esteatosis, esteatohepatitis, cirrosis), enfermedades del tracto genitourinario (irregularidad menstrual, infertilidad, síndrome de ovario poliquístico), enfermedades coronarias (diabetes, dislipemia, hipertensión), cánceres (mama, útero, cuello uterino, colon, esófago, páncreas, riñón, próstata), flebitis (estasis venosa) y otras enfermedades (enfermedad de la vesícula biliar,

osteoartritis, infecciones de la piel, hipertensión intracraneal idiopática, accidente cerebrovascular, cataratas, pancreatitis, gota).

Los problemas de salud asociados al sobrepeso y la obesidad están relacionados con una mayor morbi-mortalidad. Varios estudios y meta-análisis han encontrado importantes asociaciones entre el IMC y la mortalidad [37–39], incluido un riesgo significativo de mayor enfermedad cardiovascular [40]. Según la *Global Burden of Disease* (GBD) en 2015, los años de vida perdidos entre hombres obesos de 60 a 79 años oscilaba de 0-8 años, mientras que en los hombres más jóvenes de 20 a 39 años, éstos aumentaban a 5-9 años. Se observaron resultados similares en las mujeres. Estas estimaciones muestran el efecto del exceso de peso corporal sobre enfermedades cardiovasculares y DMT2 [41].

2. EL SÍNDROME METABÓLICO

El SMet se caracteriza por una acumulación de adiposidad visceral, alto riesgo de desarrollar diabetes, enfermedades cardiovasculares y incluso mortalidad [42]. La prevalencia del SMet se ha visto incrementada en los últimos años debido al alto grado de sedentarismo de la población en general, provocando que se haya convertido en uno de los principales problemas de salud pública [43]. Además, la prevalencia del SMet es más alta en mujeres que en hombres, especialmente mayores de 65 años. Sus causas están relacionadas con cambios inducidos por la menopausia, con tendencia a aumentar la adiposidad abdominal y desarrollar resistencia a la insulina y dislipemia debido a la deficiencia de estrógenos [44,45].

2.1 DEFINICIÓN

El SMet se define como un conjunto de factores de riesgo cardiovasculares que incluyen obesidad, resistencia a la insulina, niveles altos de triglicéridos, niveles bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (*high-density lipoprotein*, HDL) e hipertensión [46].

Diferentes organizaciones mundiales como la OMS [47], la EGIR (*European Group for the Study of Insulin Resistance*) [48], IDF (*International Diabetes Federation*) [49] y JIS (*Joint Interim Statement*, Declaración conjunta entre la IDF y el *American Heart*

Association/National Heart, Lung and Blood Institute) [50] han desarrollado sus propios criterios para definir el SMet. En la **Tabla 2** se detallan los umbrales propuestos por las diferentes organizaciones.

Tabla 2: Criterios establecidos por las diferentes asociaciones para definir y diagnosticar el SMet.

	OMS 1998 [47]	EGIR 1999 [48]	IDF 2006 [49]	JIS 2009 [50]
Obesidad abdominal	Índice cintura/cadera: H: > 0,90 M: > 0,85	Cintura: H: ≥ 94 cm M: ≥ 80 cm	Cintura según etnia (Europa): H: ≥ 94 cm M: ≥ 80 cm	Cintura según etnia (Europa): H: ≥ 102 cm M: ≥ 88 cm
IMC	>30 kg/m ²	-	> 30 kg/m ²	-
Glucosa	≥ 110 mg/dL	≥ 110 mg/dL	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL
PAS/PAD	≥ 140/90 mmHg	≥ 140/90 mmHg	≥ 130/85 mmHg	≥ 130/85 mmHg
HDL-c	H: <35 mg/dL M: <39 mg/dL	<39 mg/dL	H: <40 mg/dL M: <50 mg/dL	H: <40 mg/dL M: <50 mg/dL
TG	≥ 150 mg/dL	≥ 175 mg/dL	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL

Abreviaturas: IMC: Índice de Masa Corporal; PAS/PAD: Presión Arterial Sistólica/ Presión Arterial Diastólica; HDL-c: Colesterol HDL; TG: Triglicéridos en sangre (trigliceridemia); H: Hombres; M: Mujeres.

Todos los criterios descritos anteriormente necesitan dos o más condiciones para el diagnóstico del síndrome metabólico, excepto el descrito por la JIS 2009 que necesita tres o más.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA

El componente más frecuente que se ha observado del SMet es la obesidad abdominal. Además, el SMet junto con la dislipemia, la hiperglucemia y la hipertensión componen un importante desafío para la salud pública [2]. La prevalencia de SMet en los países desarrollados ha aumentado hasta un 20-25% en la población adulta, y su incidencia sigue aumentando con el tiempo [51–54]. En España, la prevalencia de SMet está afectando aproximadamente al 22,7% de la población, alcanzando proporciones epidémicas, teniendo en cuenta que su incidencia aumenta con la edad [51]. Además, el SMet aumenta el riesgo de aparición de DMT2, enfermedades cardiovasculares, y otras enfermedades crónicas como la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), cáncer, enfermedades neurodegenerativas, aterosclerosis, el riesgo de trastornos reproductivos, lipídicos y circulatorios y todas las causadas de mortalidad también aumentan [55–58].

En Japón, en un estudio de cohorte prospectivo, se ha informado una tasa de prevalencia de SMet del 43,6% en hombres y 28,9% en mujeres [59]. Sin embargo, en China hay mayor prevalencia de SMet en mujeres, tanto rurales como urbanas, que en hombres [60,61]. La prevalencia de SMet en los países de Oriente Medio tiene una disparidad sexual similar a la de Estados Unidos, con una prevalencia del 32,1% al 42,7% en mujeres y del 20,7% al 37,2% en hombres [62,63]. Curiosamente, los estudios realizados en la Unión Europea, muestran una prevalencia de SMet con poca disparidad de sexo, aunque los hombres suelen presentar una prevalencia ligeramente mayor [64,65].

2.3 ETIOLOGÍA

En las últimas décadas, se han llevado a cabo múltiples líneas de investigación sobre el SMet, aunque la etiología no está clara. No obstante, se postula que la obesidad (especialmente la obesidad abdominal) y la resistencia a la insulina inducida por el estrés oxidativo y los estados proinflamatorios, juegan un papel clave e intervienen significativamente en el desarrollo del SMet [53,66].

Se conocen una serie de factores que aumentan el riesgo de padecer SMet como la resistencia a la insulina, la obesidad abdominal, la inflamación crónica, el estrés oxidativo, las disfunciones en el tejido adiposo, alteraciones de la microbiota, la interrupción de los ritmos circadianos, la predisposición genética, el envejecimiento, la inactividad física y la alimentación insana [50,53,66]. Estos riesgos empiezan cada vez más en la niñez y la adolescencia y están asociados con una alta probabilidad de futuras enfermedades crónicas en la edad adulta, por este motivo, se deben hacer esfuerzos para reconocer este riesgo metabólico [67].

2.4 CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS

DISLIPEMIA

Existe un vínculo bien establecido entre la dislipemia y la aterosclerosis. La dislipemia aterogénica se caracteriza por un aumento de los triglicéridos circulantes y un descenso del colesterol HDL. La dislipemia aterogénica y el exceso de colesterol unido a la lipoproteínas de baja densidad (*low-density lipoprotein*, LDL) son los dos principales trastornos lipídicos que aparecen en el paciente hipertenso [68].

Se puede diagnosticar a los pacientes con dislipemia aterogénica y con alto riesgo cardiovascular a partir de la concentración de triglicéridos y de colesterol HDL circulantes [69]. De hecho, los triglicéridos son un marcador subrogado de las lipoproteínas ricas en triglicéridos y de sus remanentes [70]. Las lipoproteínas remanentes derivan de la lipólisis de las lipoproteínas de muy baja densidad (*very-low-density lipoprotein*, VLDL) y de los quilomicrones, que contienen apoproteínas (apo)B y apoB48, respectivamente [71]. Se ha comprobado que cifras elevadas de colesterol unido a lipoproteínas remanentes está directamente relacionado con el riesgo de recurrencia de accidentes coronarios graves en pacientes con infarto de miocardio o ictus previo [72]. Del mismo modo, sujetos con sobrepeso u obesidad con niveles altos de triglicéridos y de colesterol remanente, pero no de LDL, se asocian con alto riesgo cardiovascular [73].

HIPERTENSIÓN

La hipertensión, conocida como tensión arterial alta, se define como un trastorno en el que los vasos sanguíneos se ven sometidos a una tensión persistentemente elevada. Es un trastorno grave que incrementa de manera significativa el riesgo de sufrir cardiopatías, encefalopatías, nefropatías y otras enfermedades vasculares [74]. De acuerdo con las guías para el manejo de la hipertensión, la patología se define cuando se presentan valores de Presión Arterial Sistólica (PAS) ≥ 140 mm/Hg y/o valores de Presión Arterial Diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg [75]. Sin embargo, el *American Heart Association/American College of Cardiology* (AHA/ACC) establecieron nuevas pautas de hipertensión con niveles de tensión arterial de PAS ≥ 140 mm/Hg y PAD ≥ 80 mm/Hg [76]. Entre los factores de riesgo modificables destacan la dieta (exceso de sal y grasas

saturadas e ingesta insuficiente de frutas y verduras), la inactividad física, el consumo de tabaco y alcohol y el sobrepeso o la obesidad.

DIABETES MELLITUS TIPO 2

La DMT2 es una enfermedad crónica, denominada anteriormente diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta. Se produce cuando el organismo no es capaz de utilizar eficazmente la insulina que produce debido a que las células no responden de manera adecuada a la insulina, es decir, se produce una resistencia a la insulina. Según la OMS la mayoría de los diabéticos que tienen el tipo 2, se debe en gran medida al exceso de peso y a la falta de actividad física [77].

A continuación, en la **Tabla 3** se detallan los criterios establecidos para diagnosticar DMT2 que has desarrollado la OMS, la *International Diabetes Federation* (IDF) y la *American Diabetes Association* (ADA).

Tabla 3: Criterios para diagnosticar diabetes mellitus tipo 2

		OMS-IDF (2006-2011) [78,79]	ADA (2020) [80]
	HbA1c	≥ 6.5%	≥ 6.5%
Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2)	Glucemia en ayunas	≥ 126 mg/mL	≥ 126 mg/mL
	Glucemia 2 horas*	≥ 200 mg/dL	≥ 200 mg/dL
	Glucemia al azar#	-	≥ 200 mg/dL
	Síntomas DMT2	-	sí

Abreviaturas: OMS: Organización Mundial de la Salud; IDF: *International Diabetes Federation*; ADA: *American Diabetes Association*; HbA1c: hemoglobina glicosilada.

*Glucemia medida durante un test de tolerancia oral a la glucosa, transcurridas dos horas desde el suministro de la carga glucémica. #Glucemia medida aleatoriamente en cualquier momento del día.

Las estrategias que según la OMS previenen la DMT2 o retrasan su aparición son la dieta saludable, la actividad física regular, el mantenimiento de un peso corporal normal y evitar el consumo de tabaco [77].

3. ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO

La EHGNA es la enfermedad hepática crónica más común en las sociedades occidentales, afectando hasta al 25% de la población [81]. Se postula como una enfermedad grave y un problema clínico creciente con una prevalencia del 90% entre individuos obesos [81]. La prevalencia de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la forma más progresiva de EHGNA, varía aproximadamente del 25-70% entre los pacientes obesos [82].

3.1 DEFINICIÓN

La EHGNA es un trastorno caracterizado por la acumulación excesiva de lípidos, especialmente de triglicéridos en los hepatocitos del parénquima hepático, y en consecuencia, está fuertemente relacionado con el sobrepeso, la obesidad y la resistencia a la insulina [83]. La EHGNA se acompaña de un amplio espectro de síntomas clínicos y manifestaciones patológicas apenas distinguibles de las observadas en pacientes alcohólicos [83]. En la **Figura 6** se ilustra la progresión de la EHGNA, si no se trata adecuadamente, puede progresar a EHNA y cirrosis o incluso carcinoma hepático [84].

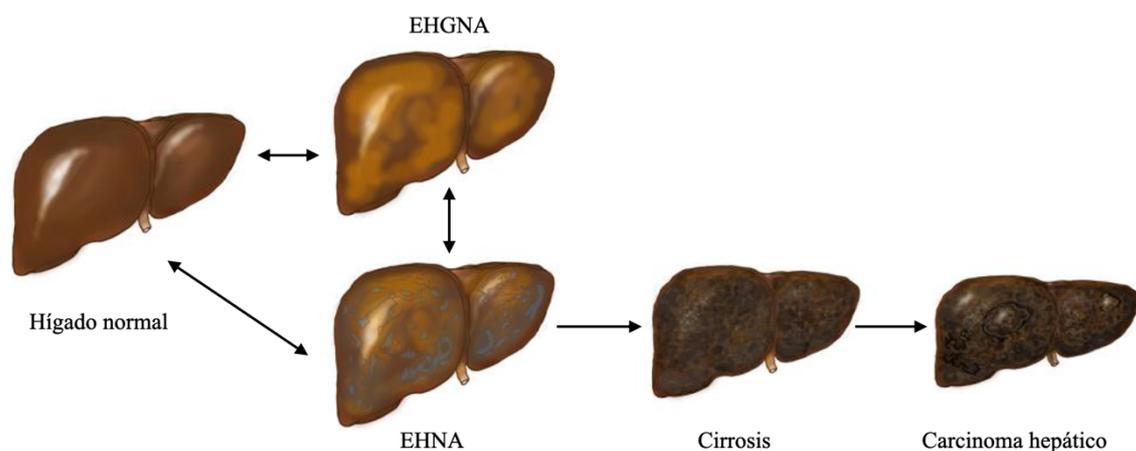


Figura 6. Representación esquemática de la progresión del hígado graso no alcohólico (EHGNA). EHNA: esteatohepatitis no alcohólica. Modificada de Sureda et al [85].

La acumulación de triglicéridos en el hígado puede deberse a varias causas, entre ellas se puede destacar un aumento de los ácidos grasos libres circulantes desde el tejido adiposo debido a la lipólisis, un aumento de los ácidos grasos de la dieta, una lipogénesis hepática elevada, una reducción de exportación de VLDL y una disminución de la β -

oxidación [86]. La acumulación de ácidos grasos en el hígado provoca algunos cambios en la histología general del hígado y en los hepatocitos, que incluyen hinchamiento de los hepatocitos y procesos apoptóticos, el aumento del aspartato aminotransferasa (AST), depósito de colágeno y fibrosis hepática [87]. Todos estos cambios en el hígado y en los hepatocitos causan lipotoxicidad celular, aumentando el estrés oxidativo asociado con la disfunción mitocondrial, liberándose citoquinas proinflamatorias y provocando la infiltración y activación de células inmunitarias [86].

Se ha evidenciado que la resistencia a la insulina juega un papel central en la progresión de la EHGNA [88]. La función principal de la insulina, en una situación no patológica, es la regulación en el hígado de numerosas funciones celulares como el crecimiento celular, la estimulación de la captación y el almacenamiento de glucosa y la modulación del equilibrio energético y la expresión génica. Así, la insulina modula el metabolismo de los lípidos, promueve la lipogénesis, inhibe la oxidación de los ácidos grasos, aumenta la captación de ácidos grasos y la secreción de VLDL. En cambio, cuando los tejidos se vuelven resistentes a la acción de la insulina, la lipólisis de los triglicéridos aumenta y la degradación de estos triglicéridos provoca un aumento de los ácidos grasos no esterificados en plasma, lo que a su vez, provoca un aumento de la acumulación de ácidos grasos en el hígado [89].

3.2 EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de EHGNA ha aumentado de forma progresiva en los últimos veinte años [90]. Algunos estudios muestran que aproximadamente el 20-30% de la población general padece EHGNA, siendo este porcentaje menor en los países asiáticos donde la prevalencia de esta patología ronda el 15% de la población. Se ha observado que la EHGNA afecta a todos los rangos de edad, desde niños hasta ancianos. En niños la prevalencia es menor que en adultos y ronda el 3%, siendo este porcentaje mayor (22.5-52,8%) en el caso de los niños obesos [91,92]. Se ha observado que el 30% de los pacientes con esteatosis simple progresan a EHNA, y alrededor del 20-25% de estos pacientes con EHNA desarrollan cirrosis, y de éstos, el 30-40% de los pacientes con cirrosis mueren por causas relacionadas con el hígado en 10 años [93].

Entre el 2016 y el 2030, se espera un crecimiento modesto en el total de casos de EHGNA si la obesidad y la DMT2 se estabilizan en el futuro. Sin embargo, la prevalencia de EHNA se prevé que aumentará entre un 15% y un 56%, mientras que la enfermedad hepática avanzada y la mortalidad hepática se duplicarán como resultado del aumento de la población y del envejecimiento [94]. Los resultados de este análisis demuestran una gran carga de enfermedades asociadas al EHGNA y EHNA, junto con la pandemia mundial de la obesidad. La OMS ha pedido esfuerzos para detener el aumento de la obesidad y la diabetes a nivel mundial, para perseguir un desarrollo sostenible, y una reducción en un tercio de la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles para el 2030 mediante la prevención y el tratamiento [94].

3.3 ETIOLOGÍA

La EHGNA, como se ha dicho anteriormente, no está directamente asociada con la edad, ya que puede afectar a personas más jóvenes de 40 años [95]. Esta enfermedad podría ser un factor de riesgo adicional de enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica, endocrinopatías (incluida la DMT2 y la disfunción del tejido adiposo) y osteoporosis [96–99]. La EHGNA es una enfermedad sin signos o síntomas bien definidos, y éstos incluyen un hígado agrandado o hepatomegalia, fatiga crónica, dolor en la parte superior derecha del abdomen y un ligero aumento en las transaminasas circulantes [100].

Aunque clásicamente, los factores de riesgo asociados al EHGNA eran mujeres, edad avanzada, DMT2, obesidad, hiperlipidemia e hipertransaminasemia [101,102], se han detectado otros factores de riesgo asociados con la EHGNA que se describen en la

Tabla 4.

Tabla 4: Factores de riesgo asociados con la EHGNA. Modificada de Sureda et al. [85]

Resistencia a la insulina	Obesidad Dislipemia Hipertensión Diabetes Mellitus tipo 2 Estilo de vida sedentario
Fármacos	Estrógenos Corticosteroides Ácido valproico Medicamentos antirretrovirales Aminodarona Metotrexato Tamoxifeno
Enfermedades metabólicas	Enfermedad de Wilson Hipobetalipoproteinemia Abetalipoproteinemia Lipodistrofias Síndrome de Weber-Christian Enfermedad de Andersen
Infecciones	Infección crónica por virus de la hepatitis C Virus de inmunodeficiencia humana Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Alteraciones de la anatomía del intestino	Cirugía para la obesidad Resección pancreático duodenal Intestino corto
Asociaciones emergentes	Apnea obstructiva del sueño Síndrome de Ovario poliquístico Hipogonadismo Hipopituitarismo Hipotiroidismo
Otras causas	Rápida pérdida de peso Exceso de carbohidratos

3.4 DIAGNÓSTICO

Hoy en día, el método más efectivo para diagnosticar EHGNA es a través de una biopsia de hígado, pero como es una enfermedad que aparece a largo plazo y la biopsia es un método invasivo, es complejo seguir a grandes grupos de personas a través de biopsias seriadas [103].

Otros métodos de diagnóstico incluyen una ecografía completa, que generalmente es la primera prueba cuando se sospecha una enfermedad hepática, la RMN, que permite un

buen diagnóstico y la elastografía, que es una forma mejorada de ultrasonido para medir la rigidez del hígado indicativo de fibrosis o cicatrización [104].

Por lo tanto, muchas personas que padecen EHGNA no son diagnosticadas hasta que la enfermedad ha progresado a una etapa más grave y avanzada. De hecho, en un número significativo de casos, el diagnóstico se realiza cuando ya existe una enfermedad hepática grave o cirrosis y el paciente puede requerir un trasplante de hígado [105]. Alrededor del 20-25% de los adultos con EHGNA desarrollan cirrosis a los 10 años y el 11,3% de los pacientes cirróticos con EHGNA desarrollan carcinoma hepatocelular a los 5 años [106].

3.5 ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

Hasta la fecha, no existen tratamientos farmacológicos efectivos contra EHGNA, por lo que los enfoques terapéuticos para luchar contra esta enfermedad son básicamente dietéticos y de modificaciones en el estilo de vida [106]. Los tratamientos farmacológicos hasta ahora recomendados por *la American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)* son vitamina E y pioglitazona en los pacientes con EHNA, pero no están exentos de efectos adversos [107]. Frente a ello, los tratamientos farmacológicos se centran en el ejercicio y las intervenciones nutricionales son la primera línea de terapia, que tienen como objetivo principal controlar el peso corporal, el síndrome metabólico y los factores de riesgo cardiometabólicos [108].

4. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo hace referencia a un estado fisiológico en el que se ha producido un desequilibrio entre la producción de especies reactivas, principalmente de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNOS), y la capacidad del cuerpo para contrarrestar sus niveles y sus efectos dañinos asociados [109]. Esta situación se origina por una excesiva producción de agentes oxidantes por encima de los valores fisiológicos normales o por una disminución en la capacidad de los sistemas antioxidantes para detoxificarlos [109]. Este cambio en el equilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes a favor de los oxidantes se denomina Estrés Oxidativo. La regulación del estado reductor y oxidante (REDOX) es fundamental para la viabilidad, activación, proliferación y función de las células y órganos [109]. Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos generalmente son efectivos para mitigar los efectos dañinos de los radicales libres. El estrés oxidativo provoca niveles intracelulares elevados de ROS que pueden causar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN y, si no se revierte, puede incluso causar muerte celular [110].

4.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Cada átomo de oxígeno tiene un electrón no apareado en su capa de valencia exterior y el oxígeno molecular tiene dos electrones no apareados. Por tanto, el oxígeno atómico es un radical libre y el oxígeno molecular es un bi-radical (libre). La reducción de oxígeno por la cadena de transporte de electrones mitocondrial, para producir agua, se considera un proceso relativamente seguro, sin embargo, la reducción del oxígeno puede generar intermedios reactivos [111].

Las células, en condiciones normales, metabolizan la mayor parte del oxígeno hasta agua, sin formación de intermediarios. Sin embargo, un pequeño porcentaje genera especies reactivas en condiciones normales, derivado de la adición sucesiva de electrones al oxígeno molecular. A continuación, en la **figura 7** se representa un esquema general de la producción de las ROS. El oxígeno molecular capta un electrón, el cual proviene de la cadena respiratoria mitocondrial [112], generando el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es el radical más abundante y común a nivel celular. El $O_2^{\cdot-}$ y la adición de otro electrón provoca la dismutación del anión superóxido, de forma espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), generando la

aparición de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) [113]. En presencia de metales de transición, como el hierro o el cobre, la reactividad el H_2O_2 aumenta, generándose el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), altamente reactivo.

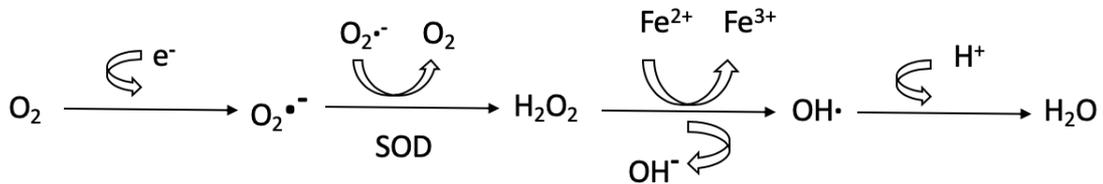


Figura 7: Representación esquemática de las reacciones de generación de los tres principales radicales libres de oxígeno: el ion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Elaboración propia.

4.2 EFECTOS DE LAS ESPECIES REACTIVAS

La sobreproducción de ROS puede iniciar procesos de peroxidación de lípidos dañando tanto la estructura como la función de la membrana, y puede ser responsable de la oxidación de proteínas clave para el metabolismo y la función celular, causando la oxidación de ácidos nucleicos [114,115]. Todas estas acciones pueden desencadenar procesos apoptóticos al afectar los mecanismo implicados en la regulación del ciclo de vida celular [116,117].

OXIDACIÓN DE BIOMOLÉCULAS POR ESPECIAS REACTIVAS

- **Peroxidación lipídica.** El proceso de peroxidación lipídica consiste en el ataque de radicales libres, especialmente por el $\text{OH}\cdot$, a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), presentes en las membranas celulares, especialmente el ácido araquidónico [118]. Los radicales lipídicos intermediarios son muy inestables y rápidamente reaccionan con otros compuestos, por este motivo para la determinación de la peroxidación lipídica se suele hacer a través de los productos finales de reacción, como el MDA, 4-hidroxinonal y cetoaldehidos [119]. El proceso de peroxidación lipídica puede dañar las proteínas de la propia membrana, alterando la permeabilidad y transferencia de metabolitos a través de las membranas.
- **Oxidación de proteínas.** Las proteínas son importantes dianas para los radicales libres debido a su compleja estructura y su elevado número de grupos

funcionales oxidables. La oxidación de las proteínas se puede medir determinando los niveles de carbonilos generados en la oxidación catalizada por metales, en la que se forman grupos carbonilo en las cadenas laterales. Las proteínas altamente carboniladas ejercen un impacto severo sobre la maquinaria celular, ya que tienden a acumularse en forma de agregados de elevado peso molecular resistentes a la degradación [120]. Esta oxidación produce la alteración de su configuración espacial con la consiguiente modificación de su función, induciendo una mayor susceptibilidad a sufrir proteólisis.

- **Oxidación de ADN.** Los radicales, especialmente el $\text{OH}\cdot$, se puede fijar con avidez a las bases del ADN, alterado su estructura provocando la rotura de las bases por hidroxilación. Estas lesiones en las bases del ADN, parece ser que se van acumulando con la edad y pasan a formar parte del envejecimiento del ser humano [121]. El producto más común de la oxidación del ADN es la 8-hidroxi-7,8-dihidro-2,-deoxiguanosina (8-OHdG), el cual se ha asociado con el desarrollo del cáncer y se ha demostrado que es un buen factor de pronóstico por todas las causas relacionadas con enfermedades cardiovasculares en pacientes con DMT2 [122]. Los niveles de 8-oxo-7m8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) se han investigado como prototipo de oxidación del ADN. Mientras que, el 8-oxo-7,8-dihydroguanosina (8-oxoGuo) proviene de la oxidación del ARN [123–125].

ESPECIES REACTIVAS COMO MENSAJEROS CELULARES

Las ROS han dejado de verse únicamente como causantes de oxidación de biomoléculas e inductoras de inactivación y disfunciones moleculares. Durante los últimos años, se ha descrito que las ROS son un componente imprescindible en numerosas funciones fisiológicas, como se puede destacar la regulación de las funciones controladas por concentración de oxígeno, regulación del tono vascular, la modulación de la respuesta antioxidante y la potenciación de la transducción de señales a partir de receptores de membrana [126–129]. Las ROS pueden actuar a través de un número importante de vías de transducción de señales y factores de transcripción, interaccionando con elementos señalizadores como tirosina quinasas, calcio, tirosina fosfatasa y fosfolipasas. Estas interacciones de las ROS con las proteínas quinasas y fosfatasa son de vital importancia

en los procesos reguladores porque las cascadas de fosforilación están implicadas en numerosos mecanismos de transmisión de señales extracelulares desde la membrana plasmática hasta el núcleo. Entre las vías de regulación destaca las vías de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκβ), del factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 (Nrf2), etc. Además, se han descrito una serie de agentes químicos que pueden servir de moléculas señalizadoras en respuesta al estrés oxidativo, el más importante parece ser el H₂O₂ por varios motivos: es relativamente estable, es un oxidante capaz de oxidar diferentes grupos químicos (sulfidrilos, hidroxilos, sulfóxidos, etc.), se produce constantemente en la cadena respiratoria y es una molécula capaz de atravesar algunas membranas biológicas, pero no todas [130].

4.3 MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

El sistema de defensa antioxidante del que dispone el organismo, compuesto por mecanismos endógenos, que pueden ser enzimáticos y no enzimáticos, tiene la función de evitar o neutralizar los efectos que causan un exceso de especies reactivas [131].

Dentro de los mecanismos endógenos destacan las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), SOD y glutatión reductasa (GRd) [132]. La catalasa, enzima homotetrámero ampliamente distribuido por toda la célula, cataliza la descomposición del H₂O₂ a H₂O, utilizando el hierro como cofactor, unido al centro activo de la enzima como parte de un grupo hemo, sin necesitar otro sustrato para llevar a cabo la reacción [133]. La CAT posee menor afinidad por la H₂O₂ que la GPx a bajas concentraciones, aunque comparte sustrato con la GPx [134]. La GPx es una enzima tetramérica que, al igual que la CAT, cataliza la reacción de H₂O₂ a H₂O, aunque también cataliza los hidroperóxidos (ROOH) a alcoholes (ROH). En este caso, el glutatión reducido (GSH) actúa como donador de electrones, siendo oxidado a disulfuro de glutatión (GSSG o glutatión oxidado) [135,136]. La GPx se han descrito como defensa antioxidante, ya que presenta cinco isoformas diferentes que catalizan la misma reacción, pero difieren en la especificidad de sustrato, es decir, que pueden reaccionar con diferentes hidroperóxidos y también se puede localizar en diferentes lugares de la célula: citosol, mitocondria, etc. La célula dispone de un mecanismo de regeneración de GSH a partir

de GSSG, debido a que la disponibilidad de GSH debe ser constante para su correcta función. La SOD constituye el primer escudo frente al $O_2^{\cdot-}$, como se ha descrito anteriormente, su función es la dismutación de este radical a H_2O_2 y oxígeno. La SOD presenta tres isoformas en los mamíferos, la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), localizada en la matriz mitocondrial y requiere de manganeso, la cobre-zinc-superóxido dismutasa (CuZnSOD), localizada en el citoplasma y el espacio intermembrana de la mitocondria, precisa de cobre-zinc como cofactor, y la superóxido dismutasa extracelular (ecSOD), que se encuentra en el espacio extracelular y también requiere cobre-zinc [137]. La GRd es la flavoenzima que cataliza la reducción de GSSG a GSH, utilizando el nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como cofactor [138].

Dentro de los mecanismos endógenos también están presentes las defensas antioxidantes no enzimáticas, como el glutatión y la tioredoxina. El glutatión es un tripéptido ampliamente distribuido en el organismo con múltiples funciones de defensa antioxidante celular como el mantenimiento del equilibrio REDOX, la reducción del estrés oxidativo, la mejora de la desintoxicación metabólica y la regulación de la función del sistema inmunitario [139]. La tioredoxina es una proteína que forma parte del sistema antioxidante clave en la defensa contra el estrés oxidativo a través de su actividad para catalizar la reducción de puentes disulfuro de proteínas, regulando el estado REDOX de las proteínas de grupos tioles para eliminar las ROS y RNOS con una velocidad rápida de reacción [140].

Además, existen mecanismos de defensa antioxidante exógenos como vitaminas y polifenoles. Entre las vitaminas destacan las vitaminas E y C. La vitamina E es un antioxidante liposoluble que protege las estructuras de membrana, sobre todo los PUFAS, modula la transducción de señales y evita la acumulación excesiva de ROS y RNS [141]. La vitamina E reacciona principalmente con radicales peroxilo deteniendo así las reacciones de autooxidación lipídica, formándose un radical de tocoferol que debe ser reciclado por otros antioxidantes tales como la vitamina C o el glutatión [142]. La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble que protege el cuerpo contra el daño causado por radicales libres y que actúa como agente reductor necesario para la síntesis de fibras de colágeno a través de la hidroxilación de prolina y lisina [143]. Los

polifenoles son los antioxidantes más abundantes presentes de forma natural en el reino vegetal con gran potencial antioxidante impidiendo la generación de más ROS y las reacciones de peroxidación lipídica [144]. Además, algunos polifenoles pueden quelar iones metálicos evitando así la formación de las ROS producidas por la reacción de Fenton [145].

4.4 RELACIÓN ENTRE ESPECIES REACTIVAS Y SÍNDROME METABÓLICO

El SMet se caracteriza por un aumento del estrés oxidativo y la inflamación. Aunque la patología del SMet es muy compleja y aún no se ha descrito por completo, se ha sugerido que un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes puede desempeñar un papel importante en su desarrollo [146]. Varios estudios han observado que los pacientes con SMet tienen menor actividad enzimática antioxidante en plasma y mayores niveles de marcadores de daño oxidativo, principalmente peroxidación lipídica, en comparación con pacientes sanos, lo que puede contribuir a provocar una situación de estrés oxidativo [147,148]. Este aumento del estrés oxidativo puede contribuir al SMet, favoreciendo la aparición de la inflamación, trombosis y aterosclerosis, alterando la función vascular y conduciendo a una enfermedad vascular [148,149].

El estrés oxidativo es una característica importante involucrada en la patogenia de la EHGNA. Dado que el hígado tiene una capacidad limitada para la acumulación de triglicéridos, la deposición de lípidos en condiciones de sobrealimentación, como en el caso de EHGNA, determina la acumulación de altos niveles de ácidos grasos, generalmente saturados, que se asocian con disfunción celular y lipotoxicidad [150]. La lipotoxicidad es la toxicidad celular que se observa cuando hay una acumulación de grasa anormal [151], en el caso de EHGNA la lipotoxicidad tiene lugar en los hepatocitos [86]. De hecho, el exceso de ácidos grasos induce altas tasas de oxidación, aumentando la producción de ROS en la cadena respiratoria mitocondrial, que puede causar daño celular y estrés oxidativo [152].

El estrés oxidativo en la obesidad puede ser causado por hiperglucemia, inflamación crónica, disfunción endotelial, deficiencias de vitaminas y minerales, función

mitocondrial alterada, niveles altos de lípidos tisulares, actividad para soportar un peso excesivo y tipo de dieta [153].

5. REPUESTA INFLAMATORIA

La respuesta inflamatoria es un proceso tisular formado por fenómenos moleculares, celulares y vasculares con la finalidad de defensa ante agresiones físicas, químicas o biológicas [154]. La respuesta inflamatoria está caracterizada por una migración de las células inmunitarias hacia el foco inflamatorio, provocando una dilatación de los vasos sanguíneos cercanos a este foco inflamatorio y un incremento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos cercanos al lugar de inflamación con el objetivo de facilitar la llegada de las células inmunitarias [155].

El objetivo de la respuesta inflamatoria es permitir que el organismo pueda recuperar las condiciones normales, eliminando o inhibiendo al agente causante de la infección o daño celular, restaurando la funcionalidad del tejido u órgano afectado [156].

La respuesta inflamatoria se divide en cinco etapas:

- 1) Liberación de mediadores:** La presencia de determinados estímulos conduce a la liberación o síntesis de los mediadores, los cuáles son péptidos, proteínas o lípidos sencillos, moléculas con estructura muy sencilla. Entre estos mediadores destacan citoquinas pro-inflamatorias, heparina, aminas (histamina o serotonina), el óxido nítrico y enzimas proteolíticas. Un segundo grupo importante de mediadores de inflamación son las sustancias sintetizadas a partir del ácido araquidónico que determina la producción de prostaglandinas y tromboxanos.
- 2) Efecto de los mediadores:** Estos mediadores producen alteraciones vasculares, así como la liberación de factores quimiotácticos, una vez liberados al torrente sanguíneo, favoreciendo la llegada de moléculas y células inmunitarias al foco inflamatorio [157].
- 3) Llegada de las moléculas y de las células inmunitarias al foco inflamatorio:** Los mediadores liberados como consecuencia de un agente adverso producirán dos efectos consecutivos. En la fase inicial, se producirán toda una serie de

alteraciones a nivel vascular que producirán la transvasación de los mediadores desde el torrente sanguíneo al foco inflamatorio (produciendo un edema). En la segunda fase, las alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos, facilitarán la llegada de las células inmunitarias como los basófilos, neutrófilos, macrófagos, linfocitos y eosinófilos, procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes al foco inflamatorio.

- 4) Regulación de la respuesta inflamatoria:** La respuesta inflamatoria esta asociada con una serie de mecanismos inhibidores que finalizan o equilibran el proceso. La respuesta inflamatoria puede resolverse mediante la síntesis de moléculas lipídicas (resolvinas, tromboxanos, leucotrienos) a partir de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 de los fosfolípidos de membrana, los cuáles son responsables de la resolución de la inflamación [157].
- 5) Reparación:** Los procesos de reparación de los tejidos dañados por agentes agresores o por la inflamación, conllevan la llegada a la zona de fibroblastos y la proliferación de células epiteliales y de vasos dentro de la herida [154].

La respuesta inflamatoria puede clasificarse en aguda e crónica, dependiendo de su duración

5.1 LA RESPUESTA INFLAMATORIA AGUDA

La respuesta inflamatoria aguda está provocada por una infección o daño tisular que conduce a una liberación de leucocitos y neutrófilos al foco de inflamación [154]. Esta respuesta está caracterizada para las infecciones, las cuales activan los receptores del sistema inmune innato como los *Toll like receptors* (TLR). Esta respuesta se lleva a cabo por los macrófagos presentes en el tejido dañado y los mastocitos, ambos tipos celulares liberan productos inflamatorios como citoquinas, eicosanoides, aminas vasoactivas y proteínas de fase aguda [156].

Los mediadores liberados por los macrófagos y los mastocitos tendrán efectos quimiotácticos favoreciendo una llegada masiva de leucocitos y neutrófilos. Los neutrófilos se activan al llegar al foco de la inflamación, ya sea por contacto con los patógenos o por las citoquinas liberadas por los macrófagos del tejido dañado. Los neutrófilos, una vez activados, secretan proteasas, enzimas prooxidantes (como la

mieloperoxidasa (MPO) y la NADPH oxidasa) y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno [158].

Los mediadores que se liberan como consecuencia de la respuesta inflamatoria aguda se agrupan en siete categorías en función de las propiedades bioquímicas: mediadores lipídicos, citoquinas, quimioquinas, péptidos vasoactivos, aminas vasoactivas, fragmentos del sistema del complemento y enzimas proteolíticas [159].

La respuesta inflamatoria aguda más habitual es la que finaliza con una resolución completa de ésta, regenerando el tejido y recuperando la funcionalidad de la zona afectada. Aunque no siempre es posible esta resolución completa y, puede que en algunos casos se forme un absceso o en otros se cura el tejido dañado con tejido conjuntivo cicatrizándose. Por otra parte, en el caso de que no se pueda resolver la inflamación ni reparar el tejido, la respuesta inflamatoria aguda evoluciona hacia una respuesta inflamatoria crónica [160].

5.2 LA RESPUESTA INFLAMATORIA CRÓNICA

La respuesta inflamatoria crónica se induce cuando los mecanismos inflamatorios agudos no logran eliminar la lesión tisular [161] y puede conducir a una serie de enfermedades, como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, DMT2, artritis reumatoide y cánceres [162]. Las principales características de la respuesta inflamatoria crónica son la presencia de elevadas concentraciones circulantes de mediadores proinflamatorios (factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), proteína C reactiva (PCR)) y la infiltración de macrófagos y linfocitos T citotóxicos en los tejidos. Cabe destacar que se diferencia de la respuesta inflamatoria aguda porque en ésta los neutrófilos son el primer tipo celular infiltrado [163]. La respuesta inflamatoria crónica puede estar asociadas a patologías como la esteatohepatitis, la cual aparece con la progresión de la EHGNA si ésta se prolonga en el tiempo y no se trata adecuadamente [84].

5.3 RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Para prevenir la progresión de una inflamación aguda a una inflamación crónica persistente, la respuesta inflamatoria debe finalizarse para evitar un daño tisular adicional. La resolución de la inflamación es un proceso bien gestionado que implica la producción de mediadores controlada. Estos mediadores de pro-resolución especializados son las resolvinas, protectinas y maresinas, los cuales son metabolitos bioactivos que estimulan respuestas innatas autolimitadas, mejoran la destrucción y eliminación microbiana innata y protegen los órganos [164].

Los leucocitos circulantes finalmente ya no detectan los gradientes de quimiocinas y no son reclutados hacia los sitios de la lesión. La desregulación de este proceso puede conducir a una inflamación crónica incontrolada [165].

Los procesos de resolución de la inflamación que permiten recuperar la homeostasis tisular incluyen: la reducción o el cese de la infiltración tisular por neutrófilos gastados, contrarregulación de quimiocinas y citocinas, transformación de macrófagos de células clásicamente activadas a células activadas alternativamente e inicio de la curación [166,167].

5.4 MEDIADORES DE INFLAMACIÓN

CITOQUINAS

La respuesta inflamatoria está mediada por un numeroso grupo de citoquinas, factores solubles secretados por las células inmunitarias y por los tejidos afectados. Las principales citoquinas determinadas en la presente Tesis Doctoral son:

- El $\text{TNF}\alpha$, sintetizado por macrófagos, monocitos, mastocitos, células *Natural Killers* (NK) y linfocitos T. El $\text{TNF}\alpha$, es capaz de inducir la síntesis de proteínas de fase aguda por parte del hígado y estimular la síntesis de IL-6, así como inducir la apoptosis [168]. Además, el $\text{TNF}\alpha$ es una citocina producida de forma crónica en el tejido adiposo, sus niveles se correlacionan con el grado de adiposidad y la resistencia a la insulina asociada a la obesidad [169].
- La IL-6, es producida de forma aguda principalmente por los fagocitos mononucleares, los linfocitos T y por las células musculares tras la realización de

un ejercicio agudo [170]. La IL-6 actúa como factor de crecimiento para los linfocitos B e induce su maduración. Además, la IL-6 tiene funciones anti-inflamatorias ya que induce la síntesis de interleucina 2 (IL-2) y de interleucina 10 (IL-10), y es capaz de inhibir la producción de $\text{TNF}\alpha$ [171].

- La Irisina, secretada por las células musculares después del ejercicio. Es un buen marcador de resistencia a la insulina y enfermedad metabólica, ya que ayuda a controlar la obesidad y mejora la homeostasis de la glucosa al actuar sobre las células del tejido adiposo blanco y aumenta el consumo total de energía [172]. En el tejido adiposo blanco sería causante de niveles elevados de irisina en personas obesas y con enfermedades metabólicas como la DM2, enfermedad cerebrovascular (ECV) y EHGNA [173].
- La IL-1 β , es sintetizada principalmente por los fagocitos mononucleares, fibroblastos y linfocitos T y B. Sus funciones principales son las de estimular la proliferación de linfocitos T y provocar liberación de histamina de los mastocitos [168].
- La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) tiene un papel vital en el proceso de inflamación, donde atrae o mejora la expresión de otros factores y células inflamatorias. Conduce al avance de muchos trastornos a través del mecanismo principal de migración e infiltración de células inflamatorias como monocitos/macrófagos y otras citoquinas hacia el sitio de inflamación [174].

OTROS INDICADORES DE INFLAMACIÓN

A parte de estas citoquinas, también se han determinado otros factores relacionados con la inflamación, que se describen a continuación:

- La MPO es una peroxidasa que contiene el grupo hemo expresada principalmente en neutrófilos que se libera durante el proceso de desgranulación, en presencia de un proceso inflamatorio [175]. Se ha demostrado que la MPO es un mediador local del daño tisular y la inflamación resultante en diversas enfermedades inflamatorias. Concretamente, es un biomarcador de estado pro-inflamatorio, puede ser un buen biomarcador no invasivo para distinguir la EHNA de la esteatosis simple [176,177].

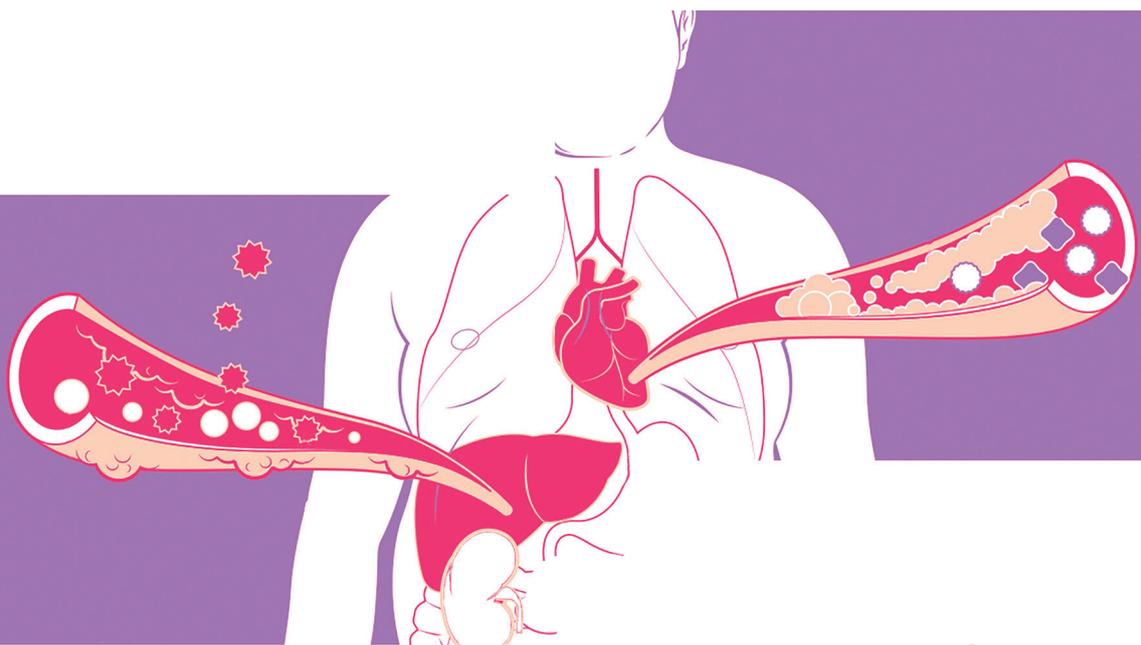
- La XOD es una enzima mayoritariamente hepática que cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y de esta a ácido úrico que se libera a la circulación cuando se produce daño hepático y puede considerarse un marcador de estado pro-inflamatorio [178].
- La Resolvina D1 es un mediador lipídico implicado en la restauración de la función celular normal tras la inflamación después de una lesión tisular, como la obesidad o la EHGNA. Los niveles de resolvina pueden estar relacionados con una pérdida de la capacidad de respuesta a la inflamación crónica subclínica, lo que favorecería la progresión de EHGNA [179].
- La citoqueratina 18 (CK-18) es una proteína de filamento intermedio inflamatorio de los hepatocitos, se libera a la circulación cuando se produce daño en los hepatocitos, lo que la convierte en un biomarcador de la progresión de la EHGNA y daño hepático [180].
- El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) es una proteína hepatoquina presente en los hepatocitos que participa en la regulación de numerosas vías metabólicas que gobiernan los niveles de glucosa y lípidos. Se ha señalado que el nivel de FGF21 en suero es un buen biomarcador para el diagnóstico de EHGNA y se asocia con inflamación, daño hepático y fibrosis [181].
- La PCR es una proteína inflamatoria aguda que aumenta con la presencia de inflamación o infección. La PCR se sintetiza principalmente en los hepatocitos hepáticos, pero también en las células del músculo liso, los macrófagos, las células endoteliales, los linfocitos y los adipocitos. La PCR juega un papel importante en los procesos inflamatorios y las respuestas frente a una infección, incluida la producción de citoquinas, en particular de la IL-6 y el TNF α [182].

5.5 RELACIÓN ENTRE INFLAMACIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO

Estudios anteriores han revelado una estrecha relación entre la obesidad y la activación del sistema inmunológico [183,184]. En este sentido, la obesidad está relacionada con un estado de inflamación crónica de bajo grado o subclínica, que a su vez, puede ser un papel causal en la generación de resistencia a la insulina, secreción defectuosa de insulina y alteración de otros aspectos de la homeostasis energética [184].

El mecanismo central subyacente a la fisiopatología de la resistencia a la insulina y el SMet es un estado crónico de inflamación [185,186]. El principal factor de riesgo responsable de la resistencia a la insulina y el vínculo fisiopatológico con el SMet es la adiposidad visceral, que está relacionada con una dieta con alto contenido de grasas saturadas, exceso de calorías y contenido de glucosa e inactividad física [187]. La producción de adipocitocinas que incluyen adiponectina, irisina, MCP-1, TNF α , IL-6 se encuentran desreguladas en el SMet debido a la situación de estrés oxidativo [188,189]. Además, los marcadores inflamatorios que permiten el seguimiento de la obesidad y el SMet incluyen la producción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6, que se producen principalmente por la infiltración de macrófagos inducida por la obesidad en el tejido adiposo [190]. Estos marcadores proinflamatorios se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina y las características del SMet [191].

Estudios han demostrado que las células mononucleares de sangre periférica (*peripheral blood mononuclear cells, PBMCs*) de sujetos con obesidad en etapa 2 producen significativamente menos IL-2 (necesaria para la generación de respuesta de linfocitos T) después de la estimulación con fitohemaglutinina que las PBMCs de sujetos no obesos [192]. Además, se ha observado un aumento de la producción de IL-6 y TNF- α en monocitos humanos incubado con glucosa [193] y, además, la glucosa redujo la producción de IL-2, IL-6 e IL-10 en PBMCs y, simultáneamente, inhibió la proliferación celular [194].



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes y el estado actual sobre el tema, se plantea la siguiente hipótesis: Puesto que las personas con sobrepeso o con un grado avanzado de EHGNA tendrán un mayor grado de estrés oxidativo y un estado proinflamatorio que las personas con normopeso, es necesaria una intervención intensiva sobre el estilo de vida dirigida a la pérdida de peso y siguiendo el patrón de Dieta Mediterránea (MedDiet) tradicional, como aproximación sostenible y eficaz a largo plazo para la prevención de la DMT2 y el EHGNA en personas con SMet y obesidad. En estos pacientes disminuirá el estado pro-inflamatorio asociado a la obesidad y el estrés oxidativo a consecuencia de dicha intervención.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es poner de manifiesto el estado prooxidante y proinflamatorio en pacientes con SMet y EHGNA y evaluar los efectos sobre los marcadores de inflamación y estrés oxidativo de una intervención nutricional basada en la MedDiet dirigida a la prevención y reversión de las comorbilidades asociadas a la obesidad y el sobrepeso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general se divide en su vez en los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el estrés oxidativo y los marcadores inflamatorios en plasma y PBMCs en adultos con SMet y sin SMet.
2. Identificar los biomarcadores plasmáticos de daño hepático, estrés oxidativo e inflamación que faciliten un diagnóstico precoz de la enfermedad y controlen su progresión.
3. Determinar el grado de estrés oxidativo y los biomarcadores inflamatorios en plasma y PBMCs de adultos con normopeso, sobrepeso y obesidad.

4. Analizar la relación entre la mejora del contenido de grasa intrahepática en pacientes con EHGNA y síndrome metabólico y biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación después de 6 meses de intervención en el estilo de vida.
5. Evaluar la asociación entre cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación y cambios de intervención en el estilo de vida tras 2 años de seguimiento en adultos españoles de mediana edad y mayores con alto riesgo de ECV.



MÉTODOS

1. EL ESTUDIO PREDIMED-PLUS

1.1 DISEÑO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO PREDIMED-PLUS

Una parte de la investigación de la presente Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del estudio PREDIMED-Plus. Este estudio surgió como una continuación de los resultados obtenidos en el estudio PREDIMED (PREvención con Dieta Mediterránea) un ensayo clínico nutricional para la prevención primaria de las ECV basado en una intervención nutricional [195]. El estudio PREDIMED-Plus es un ensayo clínico aleatorizado, multicéntrico y de grupos paralelos. La intervención se mantendrá durante 6 años, con un seguimiento medio de 8 años para eventos clínicos. Actualmente, está en curso desde el año 2014, y en él participan 23 nodos repartidos por toda la geografía nacional, que incluyen las siguientes comunidades autónomas: Andalucía, Castilla y León, Cataluña, Comunidad Foral de Navarra, Comunidad Valenciana, Comunidad de Madrid, Islas Baleares, Islas Canarias y País Vasco.

El objetivo general del estudio es comparar los efectos de dos estrategias dietéticas en la prevención primaria de ECV y mejora de las comorbilidades del SMet en adultos con sobrepeso y obesidad (que cumplen con los criterios de SMet). Se evaluará mediante una intervención intensiva sobre el estilo de vida (que combina MedDiet tradicional con restricción energética, promoción de la actividad física y tratamiento conductual) en comparación frente un grupo control (al que se le ofrece una intervención de atención habitual solo con MedDiet tradicional sin restricciones de energía y cualquier consejo para aumentar la actividad física). La dieta asignada al grupo control se ha mostrado previamente efectiva en el ensayo PREDIMED [196,197]. El estudio pretende proporcionar un tratamiento efectivo para reducir la morbi-mortalidad cardiovascular.

Los objetivos principales específicos de este proyecto incluyen:

1. La incidencia de enfermedades cardiovasculares, concretamente sobre el infarto de miocardio no mortal, el ictus no mortal y la muerte por causas cardiovasculares.
2. La pérdida de peso y su mantenimiento a largo plazo.

Los objetivos secundarios del estudio incluyen la reducción del perímetro de la cintura y de otras condiciones cardiovasculares (síndromes coronarios agudos, revascularización coronaria, insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial periférica, trombosis venosa, fibrilación articular), la disminución de la incidencia de DMT2 y sus complicaciones, así como del cáncer, de fracturas óseas, cálculos biliares, hiperuricemia y gota, enfermedades neurodegenerativas, trastornos psiquiátricos (depresión y trastornos de la conducta alimentaria) y una reducción de la mortalidad total. También se pretende evaluar resultados intermedios, como otros biomarcadores o la ingesta dietética.

Además de estos objetivos comunes a todos los nodos que participan en el proyecto, nuestro grupo tiene como uno de sus objetivos principales evaluar los efectos de la intervención nutricional sobre marcadores de estrés oxidativo e inflamación.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Los participantes seleccionados para este estudio son adultos, de edades comprendidas entre 55-75 años en el caso de varones y entre 60-75 años en el caso de mujeres, sin antecedentes documentados de ECV al inicio del estudio, con sobrepeso o obesidad (con un IMC entre 27,0 y 40,0 kg/m²) y que cumplan al menos 3 criterios de SMet de acuerdo con la definición actualizada en el año 2009 por el JIS (Declaración conjunta entre la IDF y el AHA/NHLBI) [50].

Por tanto, por una parte, los criterios de inclusión de los participantes en el estudio fueron los siguientes [198]:

- 1) Edad comprendida entre 55-75 años en hombres y entre 60-75 años en mujeres.
- 2) IMC comprendido entre 27,0 y 40,0 kg/m².
- 3) Cumplir al menos 3 criterios de SMet de acuerdo con el JIS [199]. Estos criterios son:
 - Obesidad abdominal: circunferencia de la cintura superior a 102 cm en los hombres y 88 cm en las mujeres.
 - Glucemia en ayunas superior o igual a 100 mg/dL o tratamiento farmacológico hipoglucemiante.

- PAS superior a 130 mmHg o PAD superior a 80 mmHg o tratamiento farmacológico antihipertensivo.
- Colesterol HDL inferior a 40 mg/dL en los hombres y 50 mg/dL en las mujeres o tratamiento farmacológico (ácido nicotínico).

Por otra parte, los voluntarios no fueron seleccionados si presentaron al menos uno de los siguientes criterios de exclusión [198]:

- Haber participado en el estudio precedente PREDIMED.
- Incapacidad o falta de voluntad para dar consentimiento informado por escrito o comunicarse con el personal del estudio o analfabetismo.
- Institucionalización del participante (que habite en residencias o centros de larga estancia).
- Historia documentada con ECV previa, incluyendo la angina de pecho, infarto de miocardio, procedimientos de revascularización coronaria, accidente cerebrovascular (ya sea isquémico o hemorrágico, incluidos los ataques isquémicos transitorios), enfermedad arterial periférica sintomática que haya requerido cirugía o que fuera auricular no controlada, insuficiencia cardiaca congestiva (Clase III o IV de la *New York Heart Association*), miocardiopatía hipertrófica, e historia de aneurisma aórtico $\geq 5,5$ cm de diámetro o cirugía de aneurisma de aorta.
- Cáncer activo o antecedentes de tumores malignos en los últimos 5 años (con excepción del cáncer de piel no melanoma).
- Imposibilidad de seguir la dieta recomendada (por razones religiosas, problemas de deglución, etc.) o incapacidad para realizar actividad física.
- Baja probabilidad predicha de cambiar los hábitos alimentarios de acuerdo a los estudios de Prochaska y DiClemente del modelo de estadios de cambio [200].
- La incapacidad para seguir las visitas programadas en la intervención (individuos institucionalizados, falta de autonomía, incapacidad para caminar, falta de un domicilio estable, planes de viaje, etc.).
- Haber sido incluido en otro programa de consejos para pérdida de peso (>5 kg) durante los 6 meses previos a la visita de selección.

- Historia de haber seguido una dieta de muy bajo valor calórico durante los 6 meses antes del inicio del estudio.
- Antecedentes de procedimientos quirúrgicos para bajar de peso o intención de someterse a cirugía bariátrica en los próximos 12 meses.
- Historia de resección del intestino delgado o grueso.
- Historia de enfermedad inflamatoria intestinal.
- Obesidad de origen endocrino conocido (con la excepción de hipotiroidismo tratado).
- Alergia a alimentos o componentes de la MedDiet.
- Inmunodeficiencia o estado VIH positivo.
- Cirrosis o insuficiencia hepática.
- Trastornos psiquiátricos graves: esquizofrenia, trastorno bipolar, trastornos de la conducta alimentaria, depresión con hospitalización en los últimos 6 meses.
- Toda condición severa de comorbilidad con menos de 24 meses de esperanza de vida.
- Consumo problemático de alcohol o síndrome dependencia alcohólica (o ingesta total diaria de alcohol >50g) o abuso de drogas en los últimos 6 meses.
- Historia del trasplante de órgano vital.
- Tratamiento concomitante con fármacos inmunosupresores o agentes citotóxicos.
- Tratamiento actual con corticosteroides sistémicos.
- Uso actual de medicación para la pérdida de peso.
- Participación simultánea en otro ensayo clínico aleatorizado.
- Los pacientes con una infección aguda o inflamación (por ejemplo, neumonía) se les permitirá participar en el estudio 3 meses después de su recuperación.
- Cualquier otra condición que pueda interferir con la realización del protocolo del estudio.

Si el candidato cumplía con los criterios de inclusión y era incluido en el estudio, se procedía a su aleatorización. Cada centro de reclutamiento asignó al azar a los participantes al grupo correspondiente (grupo de intervención intensiva o control) mediante el uso de una secuencia numérica aleatoria generado por ordenador y

asignada centralmente. El centro de coordinación fue el responsable del procedimiento de aleatorización de los participantes, y éstos fueron asignados al grupo de intervención de forma estratificada por centro, sexo y grupo de edad (<65, 65-70, >70 años). Matrimonios o parejas que compartían el mismo hogar fueron aleatorizados conjuntamente. En los casos específicos de parejas en las que el primer cónyuge fue reclutado previamente en un momento diferente, el último cónyuge que ingresó al estudio fue asignado directamente (no al azar) al mismo grupo de estudio que su pareja. Los participantes fueron aleatorizados en una proporción 1:1 a un grupo control o a un grupo de intervención intensiva sobre el estilo de vida. La **Figura 8** muestra el *Flow-Chart* de la inclusión de participantes en el estudio PREDIMED-plus.

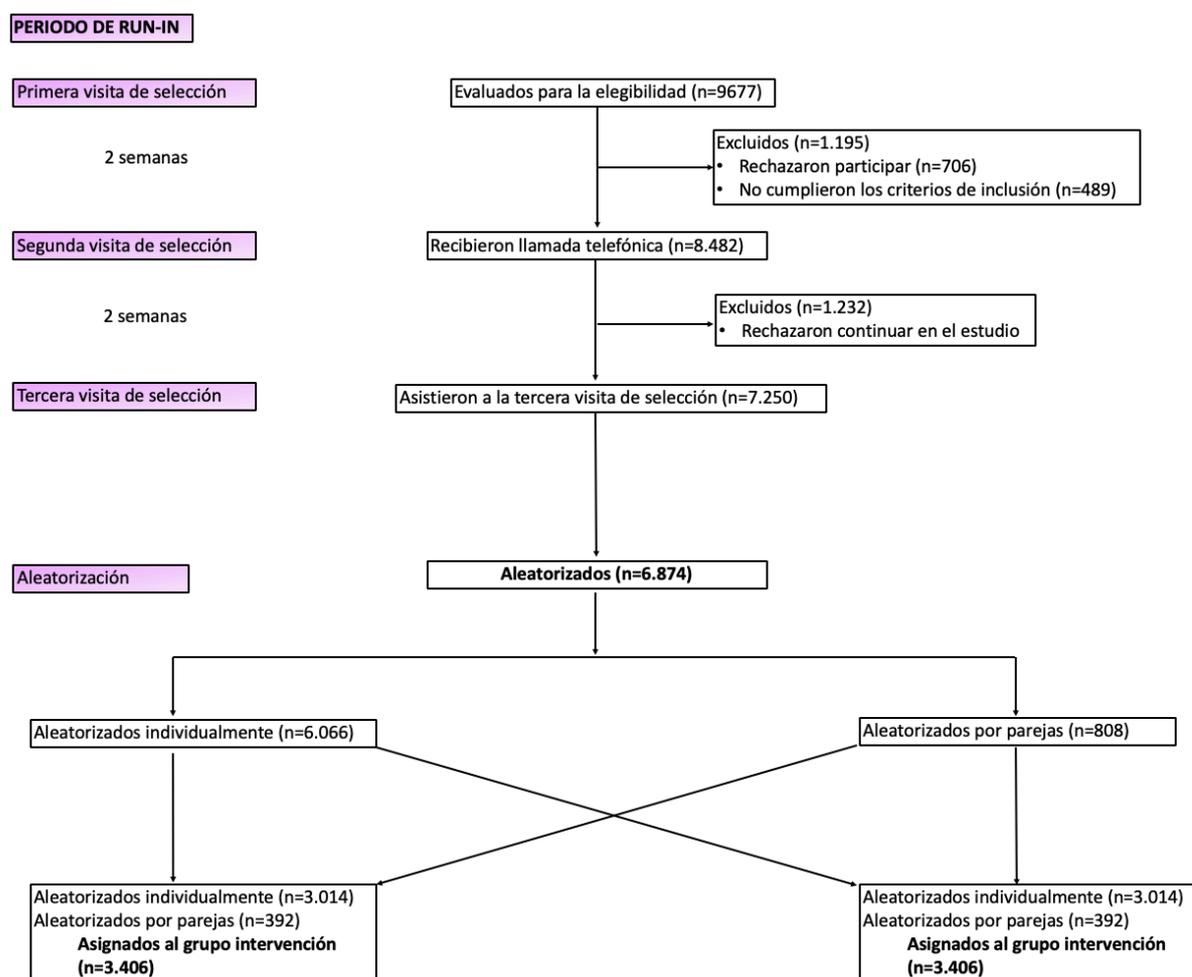


Figura 8. Flow-chart de la inclusión de participantes en el estudio PREDIMED-Plus. Fuente: Martínez-González *et al.* [198].

Finalmente, nuestro nodo reclutó a 270 participantes de los 381 entrevistados, que cumplían con los criterios de inclusión del estudio mencionados anteriormente.

1.3 COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los protocolos del estudio siguieron los estándares éticos de la Declaración de Helsinki y todos los procedimientos fueron aprobados por todas las instituciones involucradas.

Todos los participantes fueron informados del propósito y las implicaciones del estudio, libremente dieron su consentimiento para participar, mediante la firma del consentimiento informado. De este modo, se informó a los participantes de que su participación en este estudio es voluntaria, y como tal, pueden decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento informado en cualquier momento. También conocen el tipo de información que están cediendo y su potestad para decidir sobre el uso de estos datos.

El protocolo del estudio se registró en el año 2014 como *International Standard Randomized Controlled Trial* (ISRCT)) <https://www.isrctn.com/ISRCTN89898870> con el número 89898870. El Comité Ético de Investigación Clínica de las Islas Baleares lo aprobó el 26/02/2014 con ref. IB/PI/2251/14.

1.4 ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN EN CADA GRUPO

GRUPO DE INTERVENCIÓN INTENSIVA CON DIETA MEDITERRÁNEA HIPOCALÓRICA

La intervención realizada en este grupo se basó en tres pilares:

- 1º MedDiet tradicional con restricción energética
- 2º Promoción de la actividad física
- 3º Intervención cognitivo-conductual.

Los objetivos a alcanzar en esta intervención son los siguientes:

- 1) Conseguir una reducción del peso en torno al 10% de su peso inicial y entre el 5 y el 10% del perímetro de la cintura inicial en los primeros seis meses.
- 2) Mantener esta reducción de peso en el tiempo.

La MedDiet hipocalórica fue pautada por el personal dietista-nutricionista del grupo de investigación. Esta dieta debía cumplir con siguientes las premisas:

1: Lograr una reducción calórica en la ingesta diaria de energía del 30% de acuerdo a las ecuaciones del *Institute of Medicine* (IOM) [201], teniendo en cuenta el metabolismo basal de cada participante y su grado de actividad física. Suponiendo una reducción calórica entre 500 y 1000 kcal/día, lo que debería reducir el peso entre 0,5 y 1,0 kg/semana.

2: Aportar los requerimientos de micronutrientes, entre ellos 1000-1500 mg/día de calcio en las mujeres, entre 30-35g de fibra, no más de 300mg de colesterol y 6g de cloruro sódico al día.

3: Restringir la ingesta de grasas a partir de alimentos de origen animal. Prefiriendo las grasas de origen vegetal, como el aceite de oliva virgen extra y los frutos secos.

4: Aportar preferentemente las proteínas de origen vegetal y de forma secundaria las fuentes magras de origen animal (pescado o ave).

5: Facilitar la ingesta de hidratos de carbono con bajo índice glucémico provenientes de alimentos sólidos, poco procesados y ricos en fibra, como las verduras, las frutas y los cereales integrales, fuentes de vitaminas, minerales y fibra.

GRUPO CONTROL

Los participantes del grupo control recibieron consejos sobre cómo seguir la MedDiet con aceite de oliva virgen extra y frutos secos y también, recomendaciones generales sobre estilo de vida en el manejo del SMet en reuniones semestrales [198]. En este grupo control no se realizará ni la intervención de actividad física ni la intervención conductual.

1.5 RECOGIDA DE INFORMACIÓN

La **Tabla 5** muestra las principales actividades de toma de datos por visita del estudio PREDIMED-Plus.

Tabla 5: Recogida de datos en las visitas PREDIMED Plus. Fuente: tomado del protocolo del estudio, disponible en <https://www.predimedplus.com/proyecto>.

	EVALUACIÓN PREVIA			INICIO	6M	AÑO1	AÑO2	AÑO3	AÑO4	AÑO5	AÑO6	AÑO7	AÑO8
	S1	S2	S3										
1. CUESTIONARIO DE ELEGIBILIDAD	X												
2. REGISTRO DE ALIMENTOS (3 DIAS)	e		c										
3. MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4. CUESTIONARIO GENERAL				X									
5. 137-item FFQ			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6. CUESTIONARIO DIETA MEDITERRANEA (17/14-items)**				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7. CUESTIONARIOS DE ACTIVIDAD FÍSICA‡	e†		c†	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8. TEST DE LA SILLA (Evaluación actividad física)				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9. ACELEROMETRÍA			e	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10. CUESTIONARIO DE SEGUIMIENTO				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11. ELECTROCARDIOGRAMA	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12. MEDICIONES DE TENSIÓN ARTERIAL	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13. RECOGIDA DE MUESTRA DE SANGRE				X	X	X		X		X		X	X
14. RECOGIDA DE ORINA MATUTINA				X	X	X		X		X		X	X
15. RECOGIDA DE UÑAS				X	X	X		X		X		X	X
16. PRUEBAS COGNITIVO-NEUROPSICOLÓGICAS‡			X				X		X		X		X
17. CUESTIONARIOS CLÍNICO-PSICOPATOLÓGICOS€	e		X			X	X	X	X	X	X	X	X
18. CUESTIONARIOS DE CALIDAD DE VIDA*	e		X			X		X		X		X	

S: Visita de selección; FFQ: Cuestionario validado semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos; M: mes; e: Entrega; r: Recogida.

*Las mediciones antropométricas incluirán: peso, talla, circunferencia de la cintura y circunferencia de la cadera.

‡Cuestionario de actividad física en el tiempo libre de Minnesota en su versión reducida, y los cuestionarios PAR-Q, RAPA (RAPA1 y RAPA2) y el de preguntas de sedentarismo del NHS; †Cuestionario de Actividad Física en el tiempo libre de Minnesota largo.

**Se trata de cuestionarios breves de adhesión a Dieta Mediterránea. En el grupo control se utilizará el mismo cuestionario que se usó en PREDIMED (Schroeder et al, 2011) y que tiene 14 ítems. En el grupo de intervención intensiva se utilizará el cuestionario de Dieta Mediterránea hipocalórica (ver más abajo) que tiene 17 ítems.

‡Mini-Mental State Examination, test del reloj, fluencia verbal semántica y fonológica (animales + P), dígitos (batería WAIS-III) directos e inversos y test del trazo.

€Depresión de Beck BDI-II, escala multidimensional de locus de control sobre el peso y criterios diagnósticos TCA. *Cuestionario de salud SF-36.

En la presente Tesis Doctoral, se han utilizado los datos obtenidos mediante el cuestionario sociodemográfico, tales como el género y la edad. Además, también se han utilizado las medidas antropométricas tomadas por el personal dietista-nutricionista, tales como el peso, la altura, el perímetro de cintura, el perímetro de cadera, así como los datos de tensión arterial recogidos por el personal de enfermería.

2. EL ESTUDIO FLIPAN

2.1 DISEÑO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO FLIPAN

Otra parte de la investigación de la presente Tesis Doctoral se ha realizado en el marco del estudio FLIPAN (Prevención y Reversión de la Enfermedad del Hígado Graso No Alcohólico en pacientes Obesos con Síndrome Metabólico, mediante MedDiet y Actividad Física). El estudio FLIPAN es un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y multicéntrico, que incluye 155 pacientes con sobrepeso y obesidad que presentan al menos tres de las principales características del SMet y un diagnóstico de EHGNA por elastografía y RMN, que han firmado el consentimiento informado. El objetivo del estudio es evaluar el papel de la intervención dietética y de actividad física personalizada

en los cambios de los depósitos de grasa en el hígado y la progresión de EHGNA durante un período de seguimiento de 24 meses.

El proyecto propone una intervención nutricional personalizada basada en una MedDiet a medida, que introduce muchísimos componentes bioactivos antioxidantes y anti-inflamatorios que, junto con la promoción de la actividad física, pretende prevenir y revertir el hígado graso no alcohólico entre los pacientes con sobrepeso y obesos con síndrome metabólico. Esta intervención se comparará con otras dos estrategias dietéticas, la primera, que consisten en la dieta convencional propuesta por la AASLD, y la segunda, que se basa en la MedDiet dividida en siete ingestas al día.

El objetivo primario es evaluar si, y en qué medida, la intervención dietética y la actividad física personalizada mejora la EHGNA hasta el punto de conseguir su regresión o su prevención para etapas posteriores de la enfermedad en pacientes obesos con SMet. Al mismo tiempo, permita identificar nuevos biomarcadores posibles, no invasivos y de bajo coste, para el diagnóstico precoz de EHGNA y para controlar los cambios en los depósitos hepáticos.

Los objetivos secundarios incluyen evaluar los efectos de las intervenciones dietéticas con o sin actividad física personalizada sobre la composición corporal (peso, circunferencia de la cintura, grasa corporal, masa muscular, densidad mineral ósea), el estado físico, los test de la función hepática (como AST, alanina aminotransferasa (ALT), gamma-glutamilttransferasa (GGT), fosfatasa, albúmina, bilirrubina total, tiempo de protrombina, recuento de plaquetas), factores de riesgo asociados a la enfermedad hepática (obesidad abdominal, IMC, hipertensión, resistencia a la insulina, inflamación y estrés oxidativo), factores de riesgo y aparición y progresión a largo plazo de complicaciones cardiovasculares, calidad de vida, bienestar psicológico, calidad del sueño y costes del tratamiento (incluida una menor necesidad de medicamentos farmacológicos).

En la realización del estudio participaron dos centros:

- 1) El Departamento de Biología Fundamental y Ciencias de la Salud de la Facultad de Ciencias de la Universitat de les Illes Balears (UIB), Palma, España (IP: Prof. Josep A. Tur).
- 2) El Departamento de Ciencia y Fisiología de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Nutrición de la Universidad de Navarra (UNAV), Pamplona, España (IP: Prof. Alfredo Martínez).

Ambos centros participaron de igual manera con el reclutamiento de pacientes y la realización de todas las mediciones esperadas, la recopilación de datos, el análisis de datos, la redacción de informes y las publicaciones.

Desde el 26 de octubre de 2017 hasta el 29 de noviembre de 2019, se identificaron un total de 237 pacientes entre los pacientes que acuden a los centros de atención primaria asociados a las dos universidades y firmaron el consentimiento informado.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

Por una parte, los criterios de inclusión de los participantes en el estudio fueron los siguientes:

- 1) Edad comprendida entre 40 y 60 años.
- 2) Diagnóstico de EHGNA inicial por ecografía y posteriormente confirmado por elastografía y RMN.
- 3) $IMC \geq 27,0$ y $< 40,0$ kg/m^2 .
- 4) Reunir por lo menos 3 de los 5 criterios para el SMet (tal y como se describe en el consenso de la IDF [50]):
 - $IMC > 30$ kg/m^2 o aumento de la circunferencia de la cintura: ≥ 94 cm en los hombres y ≥ 80 cm en mujeres.
 - Niveles de triglicéridos ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) o tratamiento específico.
 - Reducción del colesterol HDL: <40 mg/dL (1,0 mmol/L) en los hombres y <50 mg/dL (1,29 mmol/L) en las mujeres o tratamiento específico.

- Aumento de la presión arterial: PAS \geq 130 o PAD \geq 85 mmHg o tratamiento de hipertensión previamente diagnosticado.
 - Aumento de la glucosa plasmática en ayunas \geq 100 mg/dL (5,6 mmol/L) o DMT2 previamente diagnosticada.
- 5) Consentimiento informado por escrito.

Por otra parte, los voluntarios no fueron elegidos si presentaron al menos uno de los siguientes criterios de exclusión:

- Incapacidad o falta de voluntad para dar un consentimiento informado o comunicarse con el personal del estudio.
- Historial documentado de enfermedad cardiovascular previa, incluyendo la angina de pecho, infarto de miocardio, procedimientos de revascularización coronaria, accidente cerebrovascular (ya sea isquémico o hemorrágico, incluidos los ataques isquémicos transitorios), enfermedad arterial periférica sintomática que requirió cirugía o fue diagnosticada con técnicas de imagen vascular, arritmia ventricular, fibrilación auricular incontrolada, insuficiencia cardíaca congestiva (Clase III o IV de la *New York Heart Association*), miocardiopatía hipertrófica, e historia de aneurisma aórtico \geq 5,5cm de diámetro o cirugía de aneurisma de aorta.
- Historial documentado de enfermedades hepáticas previas (distintas de EHGNA).
- Cáncer activo o una historia de malignidad en los últimos 5 años.
- Baja probabilidad pronosticada de cambiar los hábitos alimenticios de acuerdo con el Modelo de Etapas de Cambio [200].
- Falta de voluntad o incapacidad para cumplir con la intervención dietética y de actividad física durante todo el período del estudio.
- Incapacidad para cumplir las visitas programadas.
- Pérdida de peso (<5 kg) durante 6 meses antes de la visita.
- Procedimientos quirúrgicos previos para pérdida de peso o cirugía bariátrica programada en los próximos 12 meses.
- Uso de medicamentos para perder peso durante 6 meses antes de la visita.
- Antecedentes de resección intestinal, enfermedad inflamatoria intestinal.

- Obesidad asociada con enfermedad endocrina (excepto hipotiroidismo tratado).
- Alergia a alimentos o componentes dietéticos mediterráneos.
- Trastornos psiquiátricos graves (esquizofrenia, trastorno bipolar, trastornos de la alimentación o depresión con hospitalización en los últimos 6 meses) o puntuación del Test de Depresión de Beck > 30 [202].
- Condición grave con menos de 24 meses de esperanza de vida.
- Abuso crónico de drogas o alcohol (>21 y >14 unidades de alcohol por semana para hombres y mujeres, respectivamente, 1 unidad = 125mL de vino)
- Tratamiento con esteroides
- Embarazo

Después de una evaluación inicial de los parámetros clínicos (altura, peso corporal, circunferencia abdominal y presión arterial), historial médico previo, medicamentos previos y síntomas depresivos evaluados a través del Inventario de Depresión de Beck para excluir los síntomas depresivos que posiblemente podrían poner en peligro la adherencia a la dieta [203], 155 participantes dieron su consentimiento y cumplieron con los criterios de selección. Los pacientes fueron estratificados de acuerdo a lo siguiente:

- 1) Estado de NAFLD (1, 2 o 3)
- 2) Si tenían o no DMT2
- 3) Género (hombre, mujer)

A continuación, fueron asignados aleatoriamente a uno de los tres grupos de intervención durante el período de estudio (24 meses). Los tres grupos de intervención fueron los siguientes:

- Dieta convencional (CD), siguiendo las recomendaciones de AASLD [204].
- MedDiet con alta frecuencia de ingestas (MD-HMF)
- Actividad física y MedDiet (MD-PA)

El diagrama de flujo de la Figura 9 muestra el progreso a través de las fases del ensayo (inscripción, asignación de intervención, seguimiento y análisis de datos) hasta el sexto mes de seguimiento.

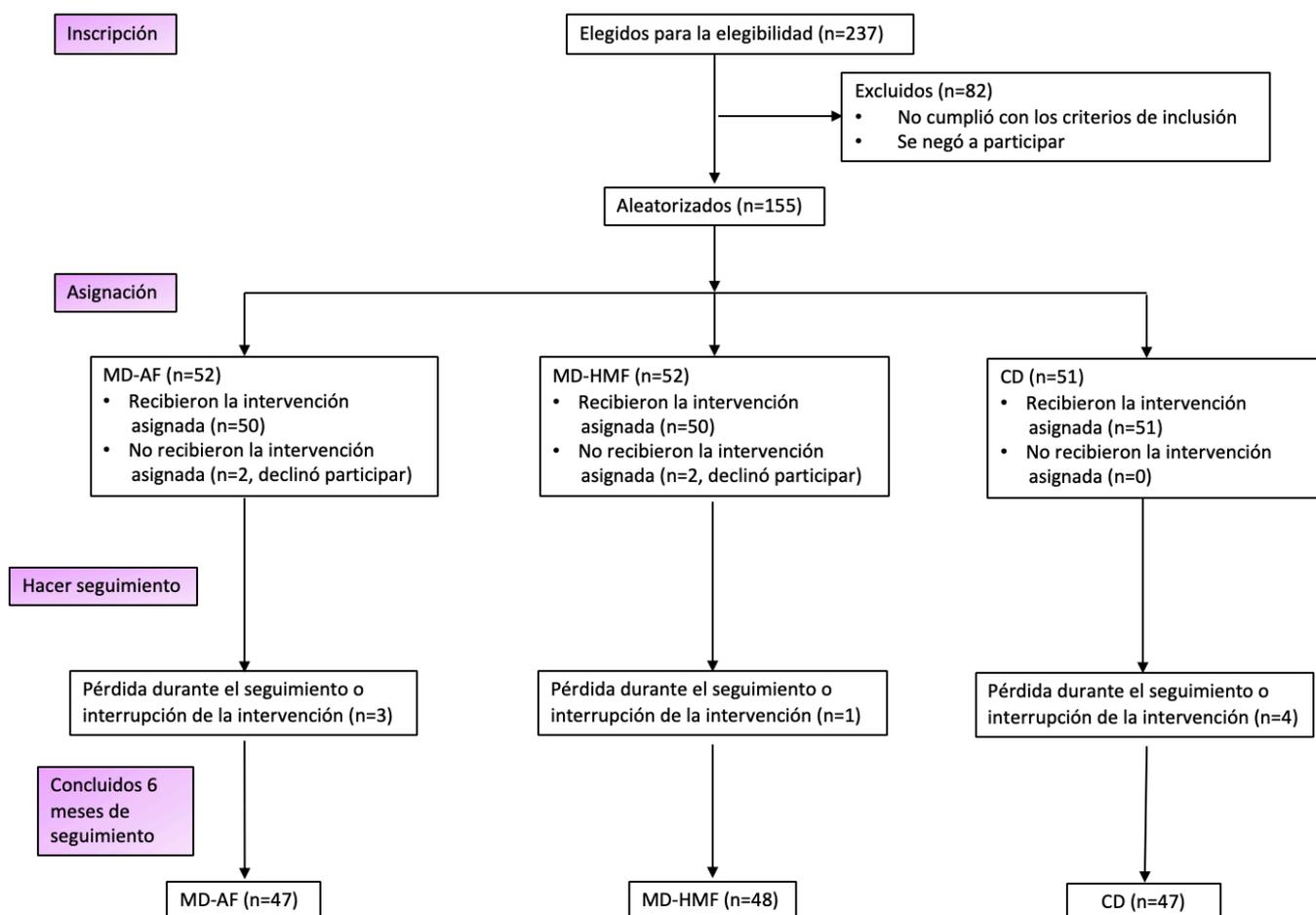


Figura 9. Flow-chart de la inclusión de participantes en el estudio FLIPAN. Fuente: Elaboración propia.

2.3 COMITÉ DE ÉTICA Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Los protocolos del estudio siguieron los estándares éticos de la Declaración de Helsinki y todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Illes Balears (ref. IB 2251/14 PI) y por el Comité Ético de la UNAV (ref. 054/2015mod2).

El ensayo se registró en ClinicalTrials.gov con el número de registro NCT04442620 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04442620>).

Todos los participantes fueron informados del propósito y las implicaciones del estudio y todos dieron su consentimiento por escrito para participar. Como se especifica en el formulario de consentimiento, la participación fue voluntaria y los participantes tenían derecho a retirarse del estudio en cualquier momento.

2.4 ESTRATEGIAS DE INTERVENCIÓN EN CADA GRUPO

INTERVENCIÓN DIETÉTICA

El **grupo de CD** seguirá las recomendaciones del AASLD que enfatiza la pérdida de peso ya sea por dieta hipocalórica sola o en conjunto con la actividad física. El AASLD recomienda una restricción de energía suficiente para perder 3-5% del peso corporal para mejorar la esteatosis, y 7-10% para mejorar la mayoría de las características histopatológicas de EHNA, incluida la fibrosis [204], siguiendo las pautas generales de la Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Y Departamento de Agricultura de los EE.UU. (Es decir, 20-35% de grasa, 10-35% de proteína, 45-65% de carbohidratos)[205].

Por lo tanto, se recomienda a los pacientes de este grupo que reduzcan su ingesta calórica en un 25-30% con una distribución de macronutrientes del 30% de grasa, 15% de proteínas y 55% de carbohidratos, y mantener una fibra adecuada (35 g/día) y colesterol (<250 mg/día) de ingesta.

El **grupo MD-HMF** se adherirá a una MedDiet basada en una distribución de macronutrientes de 30-35% de grasa (principalmente ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados procedentes de aceite de oliva virgen extra, nueces y alimentos que contienen omega-3), 25% de proteína (principalmente de origen vegetal) y 40-45% de carbohidratos (50-70% de la ingesta total de carbohidratos debe tener un índice glucémico bajo y rico en fibra). Dicha dieta se conoce como “dieta RESMENA”, diseñada para reducir la masa grasa y peso general, y mejorar el estrés oxidativo general en pacientes con SMet [206]. La dieta RESMENA enfatiza en proporcionar una alta Capacidad Antioxidante Total (TAC) y se enfoca en la distribución cronológica de las comidas, ya que factores como la frecuencia y distribución de las harinas pueden ayudar a reducir la sensación de hambre y mejorar el cumplimiento de un régimen dietético restringido de energía [207,208]. Concretamente, la ingesta calórica diaria total se distribuirá en siete comidas, siendo las comidas con mayor cantidad de calorías las que se consumirán durante la primera parte del día.

Por lo tanto, se recomienda a los pacientes de este grupo que reduzcan su ingesta calórica en un 25-30% con una distribución de macronutrientes de 30-35% de grasa, 25%

de proteínas y 40-45% de carbohidratos. Las grasas saludables y los alimentos con bajo índice glucémico son muy recomendables, junto con alimentos ricos en antioxidantes, a saber, frutas y verduras. Se aconseja a los pacientes que consuman 7 comidas al día, reduciendo gradualmente el contenido calórico en cada comida principal.

El **grupo MD-PA** también seguirá una MedDiet con restricción de energía, sin embargo, la frecuencia de las comidas será de 4 a 5 comidas al día, incluyendo meriendas. Específicamente, este grupo consumirá 35-40% del total de calorías procedentes de la grasa (8-10% de ácidos grasos saturados, >20% de ácidos grasos monoinsaturados, >10% de ácidos grasos poliinsaturados y <300mg/día de colesterol), aproximadamente el 20% de las calorías totales de las proteínas y el 40-45% o más de las calorías totales de los carbohidratos (índice glucémico bajo). El cloruro sódico no debe exceder 6g por día (2,4g de sodio) y la fibra dietética no debe ser menor de 30-35g/día.

Por lo tanto, se recomienda a los pacientes de este grupo que reduzcan su ingesta calórica en un 25-50%, con una distribución de macronutrientes de 35-40% de grasa, 20% de proteínas y 40-45% de carbohidratos. Se deberán consumir grasas saludables y alimentos de bajo índice glucémico ricos en fibra, junto con alimentos ricos en antioxidantes, a saber, frutas y verduras.

INTERVENCIÓN DE ACTIVIDAD FÍSICA

Sé recomendó actividad física a todos los grupos: a los pacientes de los grupos **CD** y **MD-HMF** se les aconsejó acumular un mínimo de 10.000 pasos al día (registrados mediante una aplicación móvil en sus teléfonos personales), tal y como recomienda la OMS en las guías de actividad física.

A los participantes en el grupo **MD-PA**, por otro lado, se les recomendó una sesión de entrenamiento de intervalos de 35 minutos tres veces a la semana, en la combinación de dos entrenamientos en el sitio dirigidos por un instructor y una sesión de entrenamiento remota prescrita por semana. Las sesiones de actividad física de 35 minutos consistieron en un calentamiento de 5 minutos, un entrenamiento de intervalos de 20 minutos y una respiración y estiramiento de 10 minutos. El entrenamiento de intervalos, incluyó cinco actividades de intensidad moderada destinadas a trabajar todos los grupos musculares.

Especialistas en actividad física del Departamento de Educación Física y Deporte de la UIB fueron los responsables del contenido de los entrenamientos tanto presenciales como a distancia y proporcionaron formación y apoyo a los miembros voluntarios del equipo de investigación que impartían las sesiones de entrenamiento interválico a los pacientes.

La actividad física aeróbica de intensidad moderada semanal propuesta fue equivalente a 10.000 pasos diarios en términos de gasto calórico (400kcal para una persona que pesa 70kg), sin embargo, la intensidad de cada ejercicio se ajustó a la condición física de cada sujeto.

2.5 RECOGIDA DE INFORMACIÓN

La **Tabla 6** muestra las principales actividades de toma de datos por visita del estudio FLIPAN.

Tabla 6: Recogida de datos en las visitas FLIPAN. Fuente: elaboración propia.

Número de visita	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Tiempo ¹	0m	5%	10%	6m	12m	24m
Datos basales ²	X					
Medidas antropométricas ³	X	X	X	X	X	X
Recordatorio dietético de 24 horas	X					
Criterios de inclusión y exclusión	X					
Aleatorización	X					
Tratamientos concomitantes	X	X	X	X	X	X
Eventos adversos	X	X	X	X	X	X
Electrocardiograma en reposo	X			X	X	X
Medidas de la presión arterial ⁴	X	X	X	X	X	X
Evaluación de la actividad física ⁵	X	X*	X*	X	X	X
Evaluación dietética ⁶	X	X+	X+	X	X	X
Determinaciones de sangre al laboratorio	X			X	X	X
Índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR)	X			X	X	X
Colección de orina de la mañana ⁷	X			X	X	X
Ultrasonografía	X			X	X	X
Evaluación de la fibrosis hepática ⁸	X			X	X	X
Resonancia magnética	X			X	X	X
Cuestionario de Beck	X			X	X	X
Cuestionarios de calidad de vida y psicológicos ⁹	X			X	X	X
Patrón de defecación y evaluación de heces ¹⁰	X			X	X	X

1.Tiempo: “m”= mes; “5%”=cuando el paciente logra una pérdida de peso del 5% con respecto al peso basal; “10%”= cuando el paciente logra una pérdida del 10% con respecto al peso basal.

2.Datos basales: consentimiento informado por escrito para la prueba de ADN, datos demográficos del paciente, altura, información sobre el estilo de vida, estado civil, educación, estado profesional, capacidad de procrear, antecedentes familiares, enfermedades previas y tratamientos previos.

3.Medidas antropométricas: peso corporal, circunferencia de cintura y cadera, IMC, circunferencia del cuello, test de bioimpedancia.

4.Medidas de presión arterial: el brazo con la presión arterial más alta se determina en la primera visita. Las mediciones posteriores de la presión arterial deben tomarse en el mismo brazo.

5.Evaluación de la actividad física: Registro de pasos semanal, cuestionario de Minnesota, batería de prueba de ajusta ALPHA, Vo2 máx. medido por la prueba de pasos de Chester. *Sólo recuento de pasos semanales.

6.Evaluación dietética: cuestionario de frecuencia de alimentos y bebidas (FFQ de 148 ítems, cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea, diario de alimentos de 72 horas. + Sólo el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea.

7.Recogida de orina matinal: albúmina, creatinina, relación albúmina/creatinina

8. Evaluación de la fibrosis hepática: determinada por medición de ondas de corte (UIB) o elastografía transitoria (UNAV).

9.Cuestionarios de calidad de vida y psicológicos: SF-36, STAI (*State-Trait Anxiety Inventory*), VAS (*Visceral Analog Scale*), cuestionario de saciedad y *Pittsburgh Sleep Quality Index*.

10.Patronos de defecación y evaluación de heces: cuestionario de patrón de defecación y la escala de heces de bristol, respectivamente.

En la presente tesis se han utilizado los datos obtenidos mediante las medidas antropométricas tomadas por el personal dietista-nutricionista, tales como el peso, la altura, el IMC, la circunferencia de cintura y cadera, y la presión arterial tomada por el personal de enfermería. Además, también han sido utilizados los datos de la evaluación de la actividad física como el VO₂máx medido por la prueba de pasos de Chester.

3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Las muestras de sangre y orina en ayunas han sido recogidas por el personal de enfermería. Estas muestras se han dividido en dos centros, el Hospital Universitario Son Espases (HUSE) y la UIB. El HUSE se ha encargado de hacer el análisis clínico de dichas muestras biológicas, de las cuáles se han utilizado en la presente tesis: colesterol total, HDL-c, triglicéridos (TG), glucemia, hemograma, urea, creatinina, PCR, hemoglobina glicosilada (HbA1c), entre otras.

Las muestras de sangre venosa de los participantes se recolectaron después de 12 horas de condiciones de ayuno en la vena antecubital en vacuntainers adecuados con EDTA como anticoagulante para los análisis hematológicos y la obtención de plasma y células inmunitarias, y sin coagulante para la bioquímica clínica y obtención de suero. Las muestras de orina se recolectaron después de 12 horas de ayuno nocturno, en la primera orina del día, en un recipiente esterilizado y se han medido en el Copenhagen University Hospital, con la colaboración del Profesor Henrik E. Poulsen.

La presente Tesis Doctoral corresponde al personal de laboratorio de la UIB que se ha encargado específicamente de procesar las muestras de sangre venosa y orina. Por una parte, en el caso del proyecto FLIPAN, se ha realizado la separación de plasma y suero a partir de dos tubos de sangre con EDTA como anticoagulante y dos tubos sin coagulante, respectivamente. Además, a partir de otros dos tubos de sangre con EDTA como anticoagulante se ha realizado la extracción de las PBMCs. Por lo que se refiere al proyecto PREDIMED-PLUS, se ha obtenido plasma, suero y PBMCs de la misma forma especificada anteriormente. También, se ha realizado la extracción de neutrófilos a partir de los mismos tubos de sangre de los cuáles se han obtenido las PBMCs. Paralelamente, en ambos estudios se han recibido muestras de orina de los participantes, que han sido alicuotadas y guardadas para posteriormente realizar las

determinaciones deseadas. Todas las muestras mencionadas anteriormente han sido almacenadas en ultracongeladores a -80°C , y se ha realizado un registro informático riguroso en las bases de datos correspondientes.

Al tratarse de dos proyectos nacionales, colaborativos con otras universidades del país, parte de las muestras obtenidas han sido enviadas a los diferentes nodos receptores. Las muestras recogidas y almacenadas en el laboratorio de la UIB, se han guardado con la finalidad de hacer determinaciones de marcadores de estrés oxidativo e inflamación, las cuáles se detallaran más adelante, ya que son el propósito de la presente Tesis Doctoral.

El plasma se obtuvo centrifugando los tubos de sangre entera fresca a $1700\times g$ durante 15 min a 18°C , almacenándolo en dos alícuotas. La fracción de PBMCs y neutrófilos se obtuvo a partir de 6 mL de sangre completa fresca siguiendo el protocolo de separación de glóbulos blancos [209] que se basa en una centrifugación en gradiente de densidad, utilizando 4 mL del reactivo Ficoll-Paque PLUS [210,211]. Concretamente, de cada participante, se guardan tres alícuotas de PBMCs y tres de neutrófilos. Una alícuota de cada se le añade Tripure[®] para aislar ARN y llevar a cabo las posteriores determinaciones de genes a través de la RT-PCR (*Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction*, en inglés), y la otra alícuota, de PBMCs y neutrófilos, se guarda con RIPA 1x para las posteriores determinaciones de *Western Blot*. La última alícuota se almacena directamente el precipitado sin ningún tipo de aditivo, para la posterior resuspensión con agua miliQ para realizar las determinaciones de: actividades enzimáticas y MDA a PBMCs y neutrófilos. Asimismo, se determina la producción de ROS de las PBMCs y neutrófilos, el mismo día de la extracción, estimulados con zymosan o con lipopolisacárido (LPS).

Todas muestras se guardan en los racks correspondientes de los ultracongeladores de -80°C siguiendo el registro informático hasta el momento del análisis.

4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

4.1 BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

En la presente Tesis Doctoral se han analizado diferentes biomarcadores de estrés oxidativo.

NIVELES DE PROTEÍNA

Los niveles de proteína enzimática antioxidante de CAT, MnSOD, GPx y GRd en PBMCs fueron determinados por análisis de *Western Blot*. En la Tabla 8 se detallan los anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por *Western Blot*.

Tabla 7: Anticuerpos primarios utilizados para la detección de proteínas por *Western Blot*.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Dilución	Casa comercial	Referencia	Especie de obtención
Actina	43	1:200	Santa Cruz	sc-8432	Mouse monoclonal
CAT	60	1:1000	Merck	219010	Rabbit polyclonal
GPx	26	1:200	Santa Cruz	sc-22146	Goat polyclonal
GRd	52	1:100	Santa Cruz	sc-133136	Mouse monoclonal
MnSOD	25	1:10000	Merck	574596	Sheep polyclonal

Los anticuerpos secundarios que se han usado contienen peroxidasas conjugadas contra su anticuerpo primario específico, concretamente para anti-CAT (ref. A0545) (1:5000), anti-MnSOD (ref. A3415) (1:5000), anti-GRd (ref. A9044) (1:5000) y anti-GPx (ref. A54520) (1:1000).

Las inmunotransferencias se revelaron mediante un kit de quimioluminiscencia mejorada (Reactivo del kit Immun-Star Western C, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) para visualizar las proteínas unidas a anticuerpos. Las señales se detectaron usando un

ChemiDoc XRS y fueron cuantificadas utilizando el programa de análisis de imágenes *Quantity One* (Bio-Rad).

La actina se utilizó como *housekeeping* para normalizar las bandas de *Western blot* para la carga de proteínas, ya que su expresión no se vio afectada por los tratamientos experimentales.

Además, también se midieron en plasma los niveles de MPO y XOD utilizando los Kits d'ELISA (Cusabio Technology Llc, Houston, TX, USA), siguiendo las pautas de su protocolo comercial.

ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Las actividades enzimáticas de la CAT en plasma y PBMCs se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Aebi basado en la descomposición de H₂O₂ [212]. La actividad de la SOD se midió en plasma y PBMCs por una adaptación del método de McCord y Fridovich [213]. La actividad de GRd fue medida en PBMCs por una adaptación del método espectrofotométrico de Goldberg y Spooner [214]. La actividad de GPx se determinó en PBMCs utilizando una modificación del método espectrofotométrico de Golgh y Gynzler [215]. La actividad enzimática de la MPO se midió en plasma por oxidación de guayacol, midiendo el compuesto de tetraguayacol resultante a 470nm [216]. Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron utilizando un Shimadzu Espectrofotómetro UV-2100 (Shimadzu Coporation, Kyoto, Japón) a 37°C.

MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO

El MDA se determinó como marcador de peroxidación lipídica en plasma, en PBMCs y en orina mediante el kit de ensayo colorimétrico específico (Sigma-Aldrich Merck, St. Louis, MO, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante, cuyo método se basa en sobre la reacción de MDA con un reactivo cromogénico generando un cromóforo estable que se mide a 596nm.

El contenido de polifenoles totales se determinó en muestras de plasma y orina mediante el método de Folin-Ciocalteu (27) en los sobrenadantes de muestras desproteinizadas con acetona fría (1:1,2) utilizando L-tirosina como patrón.

Los niveles de 8-oxodG y 8-oxoGuo se analizaron en muestras de orina mediante cromatografía líquida de ultra potencia junto con espectrometría de masas en tándem siguiendo los protocolos anteriormente descritos [123–125].

Los derivados de carbonilo de proteínas se midieron en plasma utilizando un *OxiSelect™ Protein Carbonyl Kit* de inmunotransferencia (Cell Biolabs, San José, CA, EE.UU). La concentración de proteína total se determinó por el método de Bradford [217] utilizando el reactivo Sigma-Aldrich Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

PRODUCCIÓN DE ROS

La producción de ROS se midió en PBMCs y neutrófilos después de la activación con LPS (100 µg/mL PBS) de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y Zymosan A (1mg/mL PBS) de *Scaccharmoyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich). La fluorescencia se registró a 37°C durante 60 minutos con el Lector de Florescencia de Miocroplaca FLx800 (Biotek Instruments, Inc.) mediante exposiciones puntuales de luz ultravioleta y se registraron lecturas de emisión cada minuto (60 lecturas en total). La concentración de ROS se calculó midiendo la fluorescencia de una curva estándar de concentración de ROS conocida después de su reacción con 2,7-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA), en las mismas condiciones que las muestras.

4.2 BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN

CITOCINAS

Los niveles de citocinas, TNF α e IL-6, se determinaron en el plasma de todos los participantes usando los kits ELISA individuales (Diaclone, Besancon Cedex, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de IL-1 β y de MCP-1 se midieron en plasma utilizando kits ELISA siguiendo las pautas de uso de suministros (RayBiotech, Peachtree Corners, GA, EE.UU.).

KITS DE IMMUNOENSAYOS

Los niveles de irisina se midieron en plasma utilizando un kit ELISA (*Cell Biolabs*, San Jose, CA, EE.UU.). La resolvin D1 se determinó en plasma utilizando un kit ELISA (*Cayman Chemical*, Ann Arbor, MI, EE.UU.). La IL-6 y el FGF21 se determinaron en plasma

utilizando kits ELISA individuales (*Elabscience*, Houston, TX, EE.UU.). Los niveles de CK-18 se estimaron mediante el ELISA M30 Apoptoense y se midieron en plasma siguiendo las instrucciones del fabricante (PEVIVA, en EE.UU., Canadá y Japón).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron con el programa informático *Statistical Package for Social Sciences* v. 27 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La normalidad de las variables cuantitativas se ha evaluado mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. En las variables con distribución normal, las diferencias entre las medias de dos o más grupos fueron evaluadas mediante el ANOVA de un factor, respectivamente. En las variables que no presentaban una distribución normal, las medianas fueron comparadas mediante el test de Kruskal-Wallis. La corrección de *Bonferroni* se utilizó como prueba *post-hoc* de comparación de medias. Los resultados se expresaron indicando la media \pm el error estándar (SEM). El nivel de significación aceptado en todas las pruebas estadísticas fue de $P < 0.05$. Los resultados de los biomarcadores fueron analizados por una curva de características operativa (ROC) y área bajo la curva (AUC), y por una regresión logística multivariada. Estos modelos fueron ajustados por posibles variables de confusión (por ejemplo, sexo, edad, IMC, consumo de tabaco y alcohol, etc.). También, se realizó la correlación de Pearson para analizar la correlación bivariada entre diferentes variables, por ejemplo contenido graso intrahepático (IFC, *Intrahepatic Fat Content*) y el VO_2 máx. Las variables dependientes e independientes se especifican en cada uno de los análisis del estudio, adjuntados en los manuscritos del capítulo de Resultados de la presente Tesis Doctoral. Finalmente, para los estudios longitudinales, se utilizó el Modelo Lineal Generalizado, para comprar los datos durante los 6 meses y los 2 años de seguimiento.



RESULTADOS

ARTÍCULO I

Metabolic Syndrome is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Capó X, Bouzas C, Mateos D, Pons A, Tur JA, Sureda A.

Antioxidants (Basel). 2020 Mar 12;9(3):236.

DOI: 10.3390/antiox9030236; PMID: 32178436; PMCID: PMC7139344.

Factor de impacto (2020): 6,313

60/295 Biochemistry & Molecular Biology, Q1

11/143 Food Science & Technology, Q1

ARTÍCULO II

Peripheral Blood Mononuclear Cells Oxidative Stress and Plasma Inflammatory Biomarkers in Adults with Normal Weight, Overweight and Obesity

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, Capó X, Mateos D, Ugarriza L, Tur JA, Sureda A.

Antioxidants (Basel). 2021 May 20;10(5):813.

DOI: 10.3390/antiox10050813. PMID: 34065281; PMCID: PMC8161114.

Factor de impacto (2020): 6,313

60/295 Biochemistry & Molecular Biology, Q1

11/143 Food Science & Technology, Q1

ARTÍCULO III

Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Status in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Abbate M, Montemayor S, Mascaró CM, Casares M, Tejada S, Abete I, Zulet MA, Tur JA, Martínez JA, Sureda A.

Antioxidants (Basel). 2020 Aug 16;9(8):759.

DOI: 10.3390/antiox9080759. PMID: 32824349; PMCID: PMC7463614.

Factor de impacto (2020): 6,313

60/295 Biochemistry & Molecular Biology, Q1

11/143 Food Science & Technology, Q1

ARTÍCULO IV

Effects of 2-year nutritional and lifestyle intervention on oxidative and inflammatory status in old adults at high cardiovascular risk

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, García S, Mateos D, Gómez C, Gámez JM, Poulsen HE, Tur JA, Sureda A

(Submitted article)

ARTÍCULO V

Improvement of Intrahepatic Fat Content (IFC) after 6 months of lifestyle intervention is related to a better oxidative stress and inflammatory status

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, Montemayor S, Mascaró CM, Casares M, Llompарт I, Gámez JM, Tejada S, Martínez JA, Tur JA, Sureda A.

(Submitted article)

ARTÍCULO VI

Increased adherence to the Mediterranean diet after lifestyle intervention improves oxidative and inflammatory status in patients with non-alcoholic fatty liver disease.

Monserrat-Mesquida M, Quetglas-Llabrés M, Bouzas C, Montemayor S, Mascaró CM, Casares M, Llompart I, Ugarriza L, Martínez JA, Tur JA, Sureda A.

(Submitted article)



RECAPITULACIÓN

El SMet es una preocupación creciente en los países desarrollados y en desarrollo directamente relacionada con las ECV, la mortalidad cardiovascular y la DMT2 [218]. Además, desde hace tiempo, la obesidad es considerada una clara amenaza para la salud pública a nivel mundial, junto con el sobrepeso y el SMet [1]. Ambas patologías han incrementado de forma progresiva en los últimos años debido al alto grado de sedentarismo y el abandono de los patrones dietéticos saludables tradicionales de la población en general [43]. La enfermedad hepática crónica más frecuente en las sociedades occidentales es la EHGNA, que afecta hasta al 25% de la población y se perfila como un problema clínico grave y creciente asociado al incremento de la obesidad y el SMet [81]. En este sentido, la EHGNA alcanza una prevalencia del 90% entre los individuos obesos, mientras que la prevalencia de la EHNA, la forma más avanzada e inflamatoria de la enfermedad, oscila aproximadamente entre el 25% y el 70% entre los pacientes obesos [81,82]. Hasta el momento, no existe un tratamiento farmacológico efectivo para la EHGNA. Así, el enfoque terapéutico para el manejo de EHGNA se centra en modificaciones en el estilo de vida, incluyendo una dieta saludable, actividad física regular y pérdida de peso moderada. Esta falta de tratamiento ha aumentado el interés en encontrar nuevos agentes terapéuticos que contribuyan a prevenir o retrasar la progresión de la EHGNA.

1. POBLACIÓN CON SMET Y SIN SMET

Al comparar las características entre los dos grupos de población (con y sin SMet) estratificados por sexo, se encontraron diferencias en relación a los parámetros antropométricos y el perfil bioquímico de la sangre. Concretamente, los participantes con SMet presentaron mayor peso corporal, IMC, obesidad abdominal, WHtR, niveles de glucosa y triglicéridos, y niveles más bajos de colesterol HDL. Estas alteraciones están asociadas con un estado nutricional desequilibrado (como por ejemplo, consumo alto de colesterol, carbohidratos simples, proteínas de origen animal y consumo bajo de fibra, proteínas vegetales, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados) y sedentarismo [219,220]. Además, se ha descrito que la hiperglucemia y la hiperlipidemia aumentan la producción de ROS y el daño oxidativo, contribuyendo al desarrollo de la resistencia a la insulina, la alteración de la disfunción endotelial y del metabolismo energético, así como la aparición de complicaciones vasculares [221,222].

La falta de diferencias entre los grupos respecto a la presión arterial sistólica y la presencia de valores diastólicos más bajos en el grupo con SMet podría deberse a que el 71% de las mujeres y el 80% de los hombres con SMet tomaban medicamentos antihipertensivos.

Con respecto a las células inmunes en sangre, se ha observado un mayor número de leucocitos, neutrófilos, monocitos y basófilos en pacientes con SMet en ambos sexos lo que puede estar relacionado con el estado proinflamatorio subclínico crónico asociado con este trastorno. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos que sugieren que la inflamación del tejido adiposo podría contribuir significativamente al aumento de la inflamación sistémica en personas con sobrepeso y obesidad, provocando la liberación de mediadores proinflamatorios y la movilización de células inmunitarias [223,224]. Más concretamente, se ha evidenciado que el número de neutrófilos, monocitos y linfocitos circulantes se correlacionan positivamente con el IMC, la grasa corporal y la resistencia a la insulina [225]. Además, la prevalencia de SMet y componentes de SMet aumenta el recuento de glóbulos blancos tanto en hombres como en mujeres, lo que puede ser útil como marcador de inflamación sistémica de bajo grado y riesgo de ECV [226,227].

1.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y ESTADO PRO-INFLAMATORIO DE LA POBLACIÓN CON SMET VS. SIN SMET

Los participantes con SMet, tanto hombres como mujeres, presentaron una situación de mayor grado de estrés oxidativo y un estado pro-inflamatorio con respecto al grupo sin SMet, lo que puede contribuir a la patogenia del SMet.

La existencia de un desequilibrio entre los mecanismos de defensa antioxidantes, como las actividades de las enzimas CAT y SOD, y la producción de ROS aumentan el riesgo de que se instaure una situación de estrés oxidativo. En este sentido, en varios trastornos relacionados con el estrés oxidativo, como la obesidad, el sobrepeso, la DMT2 y la resistencia a la insulina, una sobreproducción de ROS y/o una capacidad reducida para eliminar este exceso de ROS, se asocian con una reducción de las actividades de las enzimas antioxidantes plasmáticas, lo que conduce al daño oxidativo [228]. Los resultados de este estudio mostraron actividades más bajas de CAT y SOD en plasma en

los pacientes con SMet en comparación con los pacientes sin SMet. Por el contrario, la actividad de la enzima prooxidante MPO fue mayor en los sujetos con SMet en comparación con aquellos sin SMet. De forma similar, se ha observado también como individuos con SMet presentaban niveles de CAT y SOD menores en comparación con el grupo control, mientras a la vez evidenciaba niveles más elevados de MPO [188]. Además, también se ha descrito que la actividad plasmática de MPO aumenta progresivamente con la obesidad y SMet [229].

Asimismo, los niveles plasmáticos de MDA, un subproducto de la peroxidación de ácidos grasos insaturados [230], fueron más altos en pacientes con SMet. Estos hallazgos son consistentes con resultados previos [231] que muestran que los sujetos con un estado inflamatorio más alto también tienen niveles de MDA significativamente más elevados y actividades enzimáticas antioxidantes más bajas. Estos niveles más altos de MDA podrían derivar de las enzimas antioxidantes plasmáticas más bajas y de los leucocitos hiperactivados, que son la fuente principal de ROS en los trastornos inflamatorios como el SMet [232].

Los sujetos con SMet exhibieron un IMC y una obesidad abdominal significativamente más alta, lo que contribuye al aumento del estado inflamatorio en estos pacientes y, en consecuencia, niveles más altos de proteínas antioxidantes y actividades enzimáticas en las PBMCs [233]. Además, el estado proinflamatorio de estos pacientes se pone de manifiesto con la presencia en la circulación sistémica de citoquinas inflamatorias y mediadores quimioatrayentes, hecho que puede conducir a una sobreactivación de los leucocitos. Este estado de activación se ha asociado con un aumento de las actividades de la NADPH oxidasa y la MPO que pueden favorecer la insaturación del estrés oxidativo [234]. En conjunto, todo ello puede inducir la activación de las defensas antioxidantes de estas PBMCs como mecanismo de autodefensa frente a la producción del anión superóxido y otras especies reactivas derivadas de un aumento de la actividad metabólica asociada a los estímulos recibidos por la propia situación de SMet. Concretamente, los resultados de este estudio muestran una actividad significativamente mayor de CAT y GRd, así como mayores niveles de proteína en pacientes con SMet respecto al grupo control. Este aumento de las actividades y los niveles proteicos de las defensas antioxidantes en PBMCs inducida por la situación de

inflamación crónica de bajo grado y estrés oxidativo que generan estímulos continuados, puede provocar que estas células se encuentren en un estado preactivado [235].

Además, los resultados de este estudio también revelaron que los niveles en plasma de las citocinas IL-6 y el TNF α , utilizadas como marcadores de inflamación, exhibieron valores significativamente más altos en pacientes con SMet en comparación con pacientes sin SMet. Los niveles altos de TNF α y IL-6 están asociados con factores de riesgo de SMet como la obesidad, la resistencia a la insulina y la DMT2 [191,236]. Los altos niveles circulantes de TNF α y IL-6 observados en pacientes con SMet podrían derivar de la expansión del tejido adiposo con hipertrofia e hiperplasia de adipocitos, lo que lleva a la producción de citocinas (o adipocinas) proinflamatorias. En este sentido, se ha reportado una asociación entre la grasa visceral y la inflamación crónica de bajo grado [237]. En este sentido, en sujetos con SMet se han evidenciado niveles plasmáticos más altos de citoquinas inflamatorias como IL-6, TNF α , IL-1, IL-10 y MCP-1 en plasma [238], de forma similar a los resultados observados en el presente estudio.

2. POBLACIÓN CON SOBREPESO Y OBESIDAD

En el estudio centrado en evaluar las diferencias existentes entre tres grupos de población con normopeso, sobrepeso y obesidad, se han encontrado diferencias, como era de esperar, a medida que aumenta el IMC de los sujetos. Los principales hallazgos de este estudio son el aumento progresivo en el número de leucocitos circulantes y el grado de estrés oxidativo, así como en los biomarcadores proinflamatorios en PBMCs y plasma, en los participantes con sobrepeso y obesidad.

2.1 PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS Y HEMATOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN CON SOBREPESO Y OBESIDAD

Concretamente, los pacientes obesos mostraron un mayor peso corporal, IMC, obesidad abdominal, WHtR, mayores niveles de glucosa y triglicéridos, y menores niveles de HDL-colesterol que los pacientes con normopeso. Estos resultados concuerdan con estudios previos, que han evidenciado como un aumento en la grasa abdominal visceral se correlaciona proporcionalmente con un aumento en WHtR y el IMC en sobrepeso y

obesidad, y estos pacientes tienen un aumento importante en los factores de riesgo cardiometabólicos [3,239].

En los participantes obesos se observó un mayor número de leucocitos, neutrófilos, basófilos y monocitos circulantes en comparación con los de peso normal. Este aumento probablemente esté relacionado con el estado proinflamatorio asociado a este trastorno. Teniendo en cuenta el valor de la evidencia científica, estudios previos sugirieron que la movilización de células inmunes y la liberación de mediadores proinflamatorios pueden estar causados por la inflamación del tejido adiposo debido al sobrepeso y la obesidad [223,224]. En concreto, se ha evidenciado que el IMC, la grasa corporal y la resistencia a la insulina se correlacionan positivamente con el número de neutrófilos, monocitos y linfocitos circulantes [225]. En este sentido, se ha demostrado que los macrófagos no son el único tipo de células inmune que puede acumularse en el tejido adiposo de los obesos [240]. De hecho, también se han observado diferentes subpoblaciones de linfocitos y neutrófilos dentro del tejido adiposo, que pueden modificar el comportamiento de los macrófagos, favorecer la inflamación y promover la resistencia a la insulina [241,242].

2.2 BIOMARCADORES ANTIOXIDANTES Y INFLAMATORIOS DE LA POBLACIÓN CON SOBREPESO Y OBESIDAD

Los participantes obesos del presente estudio también mostraron niveles plasmáticos más altos de las citocinas proinflamatorias $TNF\alpha$ e IL-6 con respecto a los sujetos con peso normal. Las personas obesas presentan un estado inflamatorio de bajo grado de forma persistente que altera el metabolismo de los adipocitos y la expresión génica, aumentando la lipólisis y la liberación de mediadores, como $TNF\alpha$, IL-6, IL-1 β y MCP-1, que reclutan y activan macrófagos hacia un isotipo proinflamatorio M1 [240,243]. La concentración de $TNF\alpha$ e IL-6 está relacionada con la distribución y porcentaje de tejido adiposo, siendo mayor la producción del tejido adiposo visceral que del tejido adiposo subcutáneo [243]. Además, los pacientes de este estudio mostraron un aumento progresivo de la obesidad abdominal y WHtR que podría ser el responsable, junto con las células inmunitarias, de la liberación y el aumento de los niveles circulantes de ambas citocinas proinflamatorias. Los presentes resultados confirman que los participantes obesos tenían inflamación crónica debido a un aumento de las citoquinas inflamatorias

circulantes, este hecho pueden contribuir a movilizar y preactivar las células inmunitarias, principalmente neutrófilos y monocitos.

Además, también se encontraron niveles plasmáticos más altos de MDA en los sujetos obesos en comparación con los participantes con normo-peso y con sobrepeso. Estos resultados concuerdan con estudios previos, que describieron valores elevados de MDA en el plasma de sujetos obesos [6]. Este aumento derivaría del hecho que estos pacientes, al ser obesos, padecen un estado más pro-oxidante, lo que potencia la producción de ROS y la bajada de antioxidantes, y como consecuencia contribuye al aumento del daño oxidativo. Esta situación puede mejorar con la pérdida de peso [244].

Respecto a las PBMCs, en el presente estudio, se ha observado un aumento de las actividades y los niveles de proteína de las enzimas antioxidantes en las PBMCs de los sujetos con sobrepeso y obesos. Este aumento puede ser consecuencia de un estado de preactivación de las PBMCs, derivado de la inflamación crónica y del estrés oxidativo relacionado con la acumulación excesiva de grasa [245,246]. En este sentido, la activación de PBMCs con LPS como inmunomodulador sigue el mismo patrón de respuesta, aumentando en paralelo con el IMC y sugiriendo la existencia de un estado de preactivación de estas células. Aunque las PBMCs no son la principal fuente de mediadores proinflamatorios en la obesidad, se ha sugerido que el perfil de expresión génica de estas células puede reflejar la cantidad de grasa visceral y, en consecuencia, ser indicativo del estado inflamatorio en la obesidad [247,248]. Además, se ha demostrado que las PBMCs de participantes obesos exhiben un perfil secretor proinflamatorio más alto que los sujetos de peso normal, con mayor producción de TNF α e IL-2 y una menor producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 [247,249,250]. De hecho, la exposición de las PBMCs a H₂O₂ induce la expresión de los TLR 2 y 4 que activan vías de señalización proinflamatorias como la vía NF κ B [251]. Además del estrés oxidativo, la activación de estas vías proinflamatorias se ve incrementada por la mayor presencia de ácidos grasos en sujetos obesos y por la activación de la lipoproteinlipasa [251,252]. Así, la situación proinflamatoria y prooxidante de las PBMCs podría inducir el aumento observado en las enzimas antioxidantes para adaptarse y compensar la nueva situación exigente. Además, el hecho de que los marcadores de daño oxidativo en plasma estén elevados, refuerza la

idea de que hay una situación prooxidante y, por tanto, esta situación también puede contribuir a la activación de las defensas antioxidantes celulares para evitar el daño oxidativo [253,254].

El análisis de los resultados mediante las curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*) se ha llevado a cabo para evaluar la capacidad discriminativa de los diferentes parámetros determinados, es decir, la capacidad de diferenciar sujetos con sobrepeso y obesidad. Los resultados muestran que los niveles de SOD, GRd, CAT, IL-6 and TNF α de las PBMCs pueden ser buenos marcadores de IMC con una potencial utilidad en la práctica clínica.

2.3 EFECTOS DE LA INTERVENCIÓN EN EL ESTILO DE VIDA EN LA POBLACIÓN CON SOBREPESO Y OBESIDAD DESPUÉS DE 2 AÑOS DE SEGUIMIENTO

Después de 2 años de intervención en el estilo de vida siguiendo las pautas del estudio PREDIMED-PLUS, los resultados obtenidos en el nodo de la Universidad de les Illes Balears revelaron que los pacientes de los grupos control e intervención intensiva en el segundo año de seguimiento tenían mejores parámetros antropométricos con respecto al punto inicial.

Además, los pacientes del grupo intervención presentaron menor IMC, circunferencia de cintura y cadera, obesidad abdominal, PAS y PAD respecto al grupo control. Esta mejora se ha asociado con una mayor adherencia a la MedDiet, pero también con la prevención del aumento de peso y la obesidad abdominal [255]. Además, las personas con un nivel más bajo de actividad física y niveles más altos de IMC y de circunferencia de la cintura al comienzo de la intervención, tenían más probabilidades de mejorar la adherencia a la MedDiet [256]. En un estudio previo, también se observó que después de 1 año de seguimiento, los pacientes de edad avanzada con SMet y mayor riesgo de ECV evidenciaron una mejora significativa en las características del exceso de peso y SMet después de un aumento en el consumo de nueces [257]. La mejora de los parámetros antropométricos asociados a la intervención permite recuperar la capacidad antioxidante de estos pacientes y mejorar su estado oxidativo.

Los resultados de este estudio mostraron una mayor actividad de CAT en plasma después de 2 años de seguimiento en comparación con los valores basales. Por el

contrario, la actividad de la MPO y los niveles de XOD fueron menores en todos los sujetos después de 2 años de seguimiento, aunque para la XOD los cambios solo fueron significativos en el grupo de intervención. Se ha observado que los niveles de MPO y la XOD están aumentados en pacientes con obesidad y SMet. Estos valores elevados de MPO y XOD pueden derivar del estado proinflamatorio y el mayor grado de activación de las células inmunes que presentan los pacientes con SMet [188,229,258]. En concordancia con los resultados que se presentan, se ha informado una disminución en los niveles de XOD y MPO en pacientes después de una pérdida de peso y una intervención nutricional con MedDiet [259–261].

Los niveles plasmáticos de MDA fueron significativamente inferiores en los pacientes tras 2 años de seguimiento respecto a los valores basales. En este sentido, la mejora de los mecanismos de defensa antioxidante tras la intervención nutricional puede contribuir a un descenso significativo de los niveles de MDA. Además, este descenso también puede verse favorecido por el aumento de polifenoles circulantes, con capacidad antioxidante, asociado a una mejor adherencia a la MedDiet. En concordancia, se descubrió que los polifenoles derivados de la suplementación con mango promueven la liberación de citocinas proinflamatorias y las hormonas metabólicas en personas obesas después de seis semanas [262]. Además, se ha revelado que las personas con obesidad absorben menos polifenoles, presentado un menor valor de área bajo la curva después de la ingesta aguda en comparación con las personas delgadas [263].

En el presente estudio, la disminución en la producción de ROS en las PBMCs y los neutrófilos activados con zymosan y LPS observada después de 2 años de seguimiento, puede ser consecuencia de una reducción del estado proinflamatorio y prooxidante. Ya que se ha demostrado que las células inmunitarias circulantes en pacientes con SMet se encuentran en un estado de preactivación derivado del estado proinflamatorio de estos pacientes y que puede conducir a una producción excesiva de ROS [264]. En este sentido, se ha evidenciado una mayor producción de ROS en sujetos obesos y con sobrepeso que en sujetos con normopeso (Manuscrito II de la presente Tesis Doctoral). Además, la mayor concentración de ácidos grasos circulantes en la obesidad se ha correlacionado con una mayor producción de ROS por parte de los neutrófilos [265].

Al analizar los mediadores inflamatorios, los resultados mostraron una reducción general de los niveles de citocinas plasmáticas a los 2 años de seguimiento respecto a los valores basales, especialmente en el grupo de intervención. Esta respuesta está de acuerdo con estudios previos que informaron que una pérdida de peso se asocia con una reducción del grado de inflamación [266,267]. En el presente estudio, la IL-6 y el TNF α tienden a disminuir en ambos grupos tras 2 años de intervención, aunque solo de forma significativa en el caso del TNF α . Por lo contrario, los niveles de MCP-1 e IL-1 β solo disminuyeron estadísticamente en el grupo de intervención más intensiva. Diversos estudios han informado de una disminución de estas citocinas después de la pérdida de peso inducida por la dieta junto con una mejora los factores de riesgo cardiometabólicos [268,269]. La mejora del perfil inflamatorio en el grupo de intervención podría derivar de mejores parámetros antropométricos después de dos años de seguimiento y también de un mejor grado de activación de las células inmunitarias evidenciadas con una menor capacidad de producir ROS tras la estimulación.

En cuanto a los parámetros analizados en orina, se observó un descenso significativo de los niveles de 8oxodG en ambos grupos y de 8oxoGuo en el grupo de intervención, mientras que el resto de parámetros, MDA y polifenoles, se mantuvieron sin cambios tras el período de intervención. Tanto el 8-oxodG como el 8-oxoGuo se reconocen como marcadores valiosos del estrés oxidativo intracelular y se consideran factores pronóstico para todas las causas y la mortalidad relacionada con enfermedades cardiovasculares en pacientes con DMT2 [122]. Ambos marcadores de oxidación de ácidos nucleicos aumentan con la obesidad y la resistencia a la insulina y se ha observado que disminuyen después de la pérdida de peso [270,271]. Los niveles reducidos de ambos parámetros evidenciados tras 2 años de intervención en el estilo de vida, principalmente en el grupo con una intervención más intensiva, podrían reflejar un mejor estado oxidativo en estos pacientes.

3. POBLACIÓN CON EHGNA (PREVENCIÓN Y REVERSIÓN)

3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN QUE PADECE LA EHGNA

Todos los participantes que fueron entrevistados y aceptaron participar en el estudio, tanto los que finalmente entraron en el estudio FLIPAN como los que fueron excluidos por no tener EHGNA tras su valoración por RMN, fueron clasificados en tres grupos según el contenido graso intrahepático (*Intrahepatic Fat Content*, IFC). El primer grupo incluía pacientes sin evidencia de EHGNA (IFC 0), los cuáles habían dado consentimiento para usar sus datos y sus muestras biológicas como grupo control, el segundo grupo incluía pacientes con IFC1 de EHGNA y el tercero incluía pacientes con IFC 2-3. Las estimaciones con validación cruzada de la precisión diagnosticada de la RMN de acuerdo con el umbral de la fracción grasa de la densidad de protones del hígado (*Proton Density Fat Fraction*, PDFF) para clasificar la esteatosis hepática fueron: IFC 0 (<6,4%), IFC 1 (6,4-17,39%), IFC 2-3 (>17,4%) [272].

Los marcadores bioquímicos en sangre empeoran progresivamente según el contenido graso intrahepático, presentando valores más altos de glucemia, Hb1Ac, TG, AST y ALT y más bajos de HDL, así como los niveles alterados de la presión arterial sistólica y diastólica. Estos resultados concuerdan con estudios previos que evidenciaron aumentos significativos en las enzimas hepáticas específicas (ALT, GGT y la relación AST/ALT <1) y en Hb1Ac en pacientes con EHGNA en comparación con sujetos sanos [273–275]. También hay sugerencias de que la bilirrubina y la PCR podrían ser buenos biomarcadores para una buena predicción de EHGNA [275–277]. La ausencia de diferencias en los niveles de bilirrubina, GGT y PCR de este estudio podrían deberse a que todos los pacientes padecían SMet y no había pacientes sanos.

3.2 BIOMARCADORES NO INVASIVOS ÚTILES PARA DIAGNOSTICAR LA EHGNA

Los principales resultados de este estudio reflejan que el estrés oxidativo y los biomarcadores proinflamatorios están claramente relacionados con el contenido de grasa intrahepática, lo que puede ser útil para fines diagnósticos en la práctica clínica y para hacer un seguimiento con el tiempo de estos pacientes.

Los participantes con un contenido graso intrahepático mayor presentaron niveles más altos del MDA, como marcador de daño oxidativo, de actividades enzimáticas antioxidantes en plasma (CAT, SOD), de marcadores proinflamatorios (IL-6, CK-18) y de citoquinas (irisina), pero niveles más bajos de resolvína D1, y ningún cambio en la proteína de los hepatocitos, la FGF21.

Estudios previos mostraron aumentos en los niveles enzimáticos antioxidantes en muestras de suero y plasma [274] como un mecanismo adaptativo para hacer frente al aumento en la producción de ROS asociada a la EHGNA [278]. Esta mayor producción de ROS, principalmente deriva de la cadena respiratoria [279], y puede causar daño celular, activar células inflamatorias e inducir la producción de citoquinas [276,280]. La acumulación de lípidos en las células hepáticas también induce lipotoxicidad asociada con el estrés del retículo endoplásmico [281,282], lo que contribuye a la inducción de respuestas inflamatorias y al desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas como la EHGNA [283]. Los hallazgos actuales están de acuerdo con los resultados anteriores, que mostraron altos niveles de MDA en EHGNA y pacientes con hepatitis viral crónica [284].

Los niveles de MPO y XOD, como indicadores de un estado proinflamatorio y prooxidante, no evidenciaron diferencias significativas entre los contenidos grasos intrahepáticos de los participantes. Estudios previos sugirieron que la MPO podría ser un buen biomarcador no invasivo para distinguir la EHNA de la esteatosis [176,177]. La ausencia de diferencias puede deberse a que los participantes de este estudio tenían un IMC alto y un estado inflamatorio subclínico de bajo grado, pero no tenían inflamación adicional asociada con la esteatohepatitis. Por lo que sabemos, no hay estudios previos que analicen los niveles de XOD en plasma en humanos con EHGNA en comparación con sujetos sanos; sólo se ha encontrado un aumento de su actividad en el suero de ratas con EHGNA [285].

Los pacientes con un contenido graso intrahepático alto mostraron niveles más altos de la citocina proinflamatoria IL-6, lo que concuerda con estudios previos que evidenciaron un aumento progresivo de los niveles de IL-6 en pacientes con esteatosis y EHNA, así como en pacientes con síndrome metabólico [286–288].

Los resultados del estudio revelaron que la CK-18 aumentaba significativamente con la evolución de la esteatosis hepática. Estudios previos describen a la CK-18 como un marcador no invasivo, que podría permitir la identificación de pacientes con EHGNA y también se ha reportado una relación entre los niveles de CK-18 con la evolución de la EHGNA [180,289]. En relación a los niveles de irisina, como marcador de resistencia a la insulina o enfermedad metabólica, aumentaron en relación al aumento de contenido graso intrahepático. Resultados similares se observaron previamente, mostrando una asociación directa entre la concentración de irisina en plasma y el IMC en pacientes obesos y con NAFLD [172,290,291].

La resolvina D1 mostró niveles altos en los participantes con un contenido graso intrahepático alto. Estos niveles de resolvina se pueden relacionar con una pérdida de la capacidad de respuesta a la inflamación crónica subclínica, lo que favorecería la progresión de la EHGNA. Un análisis de regresión logística multivariada aplicada en este estudio mostró una asociación inversa entre los niveles de resolvina D1 y el contenido graso intrahepático, lo que demuestra que puede ser un buen predictor de contenido graso intrahepático. Los resultados actuales no evidenciaron ningún cambio en los niveles de FGF21 a medida que aumentaba el contenido graso intrahepático. Este hecho puede deberse a que todos los participantes eran obesos y tenían características de SMet; por lo que pueden tener niveles elevados en todos los grupos estudiados. Se ha observado que el aumento de los niveles circulantes de FGF21 en la sobrenutrición podrían deberse a la presencia de respuestas compensatorias de FGF21 al estrés metabólico [292]. Además, FGF21 tiene efectos antiinflamatorios y antifibróticos directos en el hígado que no están asociados con la resistencia a la insulina y la obesidad [293,294]. Así, la ausencia de diferencias en este marcador también podría deberse a que los pacientes solo presentan esteatosis hepática y no presentaban esteatohepatitis ni fibrosis, las cuáles implican inflamación.

Después de realizar el análisis estadístico, los resultados de la curva ROC y el área bajo la curva, así como la regresión logística multivariada, mostraron que los niveles plasmáticos de CAT, SOD, CK-18, irisina, IL-6 y MDA, así como la inversión de los niveles de resolvina D1, pueden ser buenos marcadores de contenido graso intrahepático, útiles en la práctica clínica.

3.3 MEJORA DEL CONTENIDO DE GRASA INTRAHEPÁTICA DESPUÉS DE 6 MESES DE INTERVENCIÓN EN EL ESTILO DE VIDA

Los participantes que cumplieron los criterios de inclusión y aceptaron participar en el estudio FLIPAN fueron clasificados en terciles de acuerdo con los cambios observados a los 6 meses en contenido graso intrahepático dividiéndolos en 3 grupos donde el tercil 1 correspondía al grupo que peor respuesta ha tenido a la intervención realizada, mientras que en el tercil 3 se agruparon los participantes que más habían mejorado el contenido graso intrahepático. Los principales resultados de ese estudio reflejan que una reducción del contenido graso intrahepático a los 6 meses de una intervención en el estilo de vida, se relaciona con un mejor estado oxidativo e inflamatorio y una mejora de la capacidad aeróbica, independientemente del tipo de intervención seguida.

En la situación basal de estos pacientes al inicio del estudio, además de padecer EHGNA diagnosticada por RMN, presentaban los parámetros bioquímicos fuera de los valores de referencia, los cuales están descritos en el artículo IV de la presente Tesis Doctoral. La reducción de peso y IMC en los sujetos del tercil 3 en comparación con el tercil 1 es asocia con la mejora del contenido graso intrahepático. Estudios previos sugirieron que el IMC o la reducción de peso no son esenciales para disminuir el contenido de grasa hepática o restaurar la función hepática normal; sin embargo, las guías internacionales actuales establecen que el objetivo principal de la terapia nutricional en EHGNA es reducir la ingesta de energía para lograr una reducción del 7-10% en el peso corporal [295–297]. Hay evidencia científica de que una terapia nutricional óptima, para los pacientes con EHGNA, podría ser un período inicial de dieta muy baja en calorías de varias semanas caracterizada por una fórmula rica en proteínas, fibra soluble y baja en carbohidratos, seguida de un programa estructurado de reintroducción de alimentos que implementan los patrones dietéticos mediterráneos [58].

Los participantes con una mayor reversión en los niveles de contenido graso intrahepático mostraron menores niveles de triglicéridos, ALT y GGT después de 6 meses de intervención con respecto a los niveles basales. Una de las características de EHGNA es la aparición de resistencia a la insulina que conduce a un aumento en las concentraciones de glucosa plasmática y una producción excesiva de VLDL ricas en triglicéridos que induce hipertrigliceridemia [298,299]. La ALT es una enzima hepática,

comúnmente utilizada como marcador específico de inflamación hepática y daño hepatocelular, y ampliamente utilizada como marcador de presencia de EGHNA, asimismo de presentar una buena correlación con el contenido de grasa en el hígado [300,301]. Los hallazgos actuales están de acuerdo con los resultados anteriores, que mostraron niveles elevados de triglicéridos, ALT y GGT en pacientes con EGHNA con contenido graso intrahepático ≥ 2 en comparación con pacientes con contenido graso intrahepático de 0 y 1 (Artículo IV). Esta mejora también se observó en un estudio de intervención dietética basado en la MedDiet, en el que los pacientes redujeron su peso en un 7%, junto con una mejora significativa en el IMC, la circunferencia de la cintura, AST, ALT, GGT y TG tras el período de intervención [302].

Uno de los resultados relevantes del presente estudio es la relación directa entre la mejora en la capacidad aeróbica (VO_2 máx) y la mejora del contenido graso intrahepático indicando la importancia de la actividad física en la reserva de la acumulación de grasa en el hígado. Se ha evidenciado que la prueba de los pasos Chester (*Chester Step Test*, CST) es una solución válida, fácil y económica para evaluar el VO_2 máx. en personas con hipertensión [303]. Se ha demostrado que aumentar la actividad física y evitar un estilo de vida sedentario ejerce un impacto beneficioso sobre la EHGNA al mejorar la lesión hepática, la grasa hepática y las características histológicas de la EHGNA [304]. Sin embargo, se ha evidenciado que aunque los pacientes con EHGNA son conscientes de la necesidad de realizar actividad física, la mayoría describe tener problemas para realizar su práctica habitual, como falta de recursos y educación, así como molestias físicas durante el ejercicio o limitaciones de tiempo [305]. Por todos estos motivos, es necesario motivar y trabajar mucho con los pacientes con EHGNA para que hagan ejercicio físico y no lo abandonen.

Los participantes del tercil 3 mostraron una reducción en las actividades de los antioxidantes enzimáticos CAT y SOD después de 6 meses de intervención. Datos previos sugieren que la producción excesiva de ROS y la inflamación son factores clave en la patogénesis de EGHNA y están directamente relacionados con la muerte celular hepática y la apoptosis [306]. Estos resultados indican una reducción en el grado de estrés oxidativo y señalan la importancia de la mejora del contenido graso intrahepático, ya que una vida sana contribuye a un mejor estado de estrés oxidativo. Está descrito

que las actividades de los antioxidantes enzimáticos son altas en los pacientes con EHGNA temprana y avanzada en comparación con los controles, como consecuencia de un estado más prooxidante en estos pacientes [274]. Las alteraciones en el metabolismo de los lípidos conducen a la acumulación de lípidos en el hígado, lo que conduce a una sobreproducción de ROS dentro de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. La reducción de la actividad de las enzimas antioxidantes no está relacionada con cambios en los marcadores de daño oxidativo, lo que podría indicar que la activación de las defensas antioxidantes en estos pacientes permite mantener el daño oxidativo bajo control.

Además, los resultados de este estudio no evidenciaron diferencias significativas en los niveles de MPO y XOD, los cuáles son biomarcadores de estado prooxidativo. En el caso de la MPO, dado que esta enzima se libera principalmente por los neutrófilos, esta falta de cambios podría estar relacionada con el hecho de que el número de estas células no cambió después de 6 meses de intervención [307]. En referencia a la XOD, hay una tendencia a la disminución, pero este cambio no es significativo; por tanto, sería necesario conseguir una mejoría adicional de la esteatosis hepática con un mayor tiempo de intervención. Asimismo, los niveles de irisina se redujeron significativamente en el tercil 3 a los 6 meses, con respecto al tercil 1. Un estudio anterior mostró que los sujetos con EHGNA tenían niveles de irisina más altos que los sanos [308], y se ha sugerido que estos niveles altos actúan como un mecanismo compensatorio destinado a mejorar el metabolismo energético y la sensibilidad a la insulina [308]. Así, la reducción de los niveles de irisina en el grupo con más mejoría podría indicar una normalización metabólica en estos pacientes.

Este estudio reveló que los pacientes con EHGNA, que más mejoraron sus niveles de contenido graso intrahepático, también mostraron una mayor disminución en los niveles de CK-18. Estos resultados siguen el patrón de estudios previos, los cuáles revelaron que la CK-18 aumentaba con la esteatosis hepática y describieron una disminución de los niveles séricos de CK-18 junto con la pérdida de peso en pacientes con fibrosis hepática después de una intervención dietética de 6 meses [309,310]. Esto apunta a la existencia de una asociación positiva entre cambios en los niveles de la CK-18 y la pérdida de peso.

Sin embargo, otros marcadores más generales relaciones con la inflamación como TNF α , IL-6 o resolvin D1 no mostraron cambios significativos en sus valores. Esto podría deberse a que, aunque tras 6 meses de intervención se ha producido una reducción del IMC, los pacientes siguen siendo obesos, por lo que estos marcadores más generales no serían lo suficientemente sensibles y sería necesaria una mejora mayor o una intervención más prolongada para poder mostrar cambios en sus valores.

3.4 EFECTOS DE LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA DESPUÉS DE 6 MESES DE INTERVENCIÓN EN LA POBLACIÓN CON EHGNA

Los pacientes diagnosticados de EHGNA se clasificaron en dos grupos según el grado de mejora en la puntuación de adherencia a la MedDiet tras 6 meses de intervención nutricional. Los resultados reflejan que un mayor aumento en el grado de adherencia a la MedDiet está claramente relacionado con un menor grado de estrés oxidativo y del estado inflamatorio en pacientes con EHGNA, lo que puede ser de utilidad para el tratamiento de esta enfermedad.

Además, los pacientes con mayor adherencia también presentaron una mejor evolución en la patología con una menor acumulación de contenido graso intrahepático y menores niveles circulantes de CK-18. En este sentido, estudios previos han demostrado que una mayor adherencia a la MedDiet se asocia con una menor prevalencia de NAFLD y resistencia a la insulina y con una enfermedad hepática menos grave entre los pacientes con NAFLD [311,312].

Resultados sobre parámetros antropométricos y bioquímicos generales están de acuerdo con estudios previos que evidenciaron una pérdida de peso corporal y cambios reducidos en los niveles de PAS y PAD después de aumentar la adherencia a una MedDiet [313,314]. Además, y de manera similar a los presentes resultados, se ha informado que la baja adherencia a la MedDiet se asocia con niveles elevados de glucosa en sangre y HbA1c en pacientes diabéticos [315,316]. Estos resultados confirman el hecho de que la MedDiet contribuye a mejorar el control glucémico y la sensibilidad a la insulina, y como consecuencia, reducir la incidencia de eventos cardiovasculares.

En este estudio, los valores basales de AST, ALT y GGT, marcadores de daño hepático y útiles para monitorear la EHGNA [317], se encuentran dentro de los valores de

referencia, lo que indicaría que los pacientes presentan esteatosis hepática pero sin daño tisular evidente. Sin embargo, los valores de la AST, ALT y GGT disminuyeron significativamente en el grupo con mayor adherencia a la MedDiet, destacando los efectos protectores derivados de la mejora de la calidad de la dieta. En concordancia con estos resultados, hallazgos previos que evidenciaron una mejora significativa entre el inicio y el final del tratamiento en pacientes con EHGNA después del seguimiento de MedDiet, reduciendo el riesgo y la gravedad de la EHGNA y los niveles de enzimas hepáticas circulantes [318,319]. Asimismo, los niveles plasmáticos de CK-18 se redujeron tras el periodo de intervención, principalmente en el grupo con mayor mejoría en la MedDiet. Además, un estudio previo observó una asociación entre los niveles elevados de CK-18 y la hipertensión en pacientes con NAFLD, por lo que la CK-18 podría ser útil para detectar hipertensión temprana [320]. En estos resultados destacan los efectos beneficiosos de la MedDiet al observar una disminución de los marcadores plasmáticos de daño hepático en el grupo que más ha mejorado su adherencia a la MedDiet.

La MedDiet se ha relacionado con un aumento de los sistemas antioxidantes endógenos y una disminución de la actividad prooxidante [321]. En este sentido, se ha demostrado que una respuesta antioxidante contribuye a restaurar un metabolismo lipídico normal, lo que podría prevenir el desarrollo y progresión de NAFLD. En el presente trabajo, los efectos beneficiosos de la intervención nutricional se evidenciaron mediante una reducción significativa de contenido graso intrahepático después de 6 meses de consumir MedDiet. Del mismo modo, se ha observado una asociación inversa entre la adherencia a la MedDiet y el daño hepático en pacientes con NAFLD debido a que se ha detectado una reducción de los lípidos intrahepáticos con RMN [322]. Además, aquellos pacientes que más mejoraron la calidad de su dieta también aumentaron significativamente su capacidad física según lo evaluado por el test del escalón de Chester. Estos resultados sugieren la existencia de una asociación entre la calidad de la dieta y la práctica de ejercicio físico, contribuyendo más eficientemente a la mejora de la EHGNA. Los presentes resultados respaldan las conclusiones de un metanálisis que determinó que la alta adherencia a la MedDiet se asocia con un mejor rendimiento físico y una función cognitiva global [323].

En cuanto a los parámetros hematológicos, se han observado niveles significativamente más bajos de neutrófilos, eosinófilos y basófilos en el grupo por encima de la mediana en la adherencia a la MedDiet después de 6 meses de seguimiento, mientras que los niveles de hematocrito presentaron un pequeño incremento. La disminución de su número en el grupo con mayor adherencia puede estar relacionada con mejores parámetros bioquímicos y menor acumulación de grasa que reduciría el estado proinflamatorio de estos pacientes y la movilización de células inmunitarias. En este sentido, se ha evidenciado una reducción significativa en el recuento de leucocitos tras 12 semanas de intervención nutricional con MedDiet y aceite de oliva virgen extra (AOVE) [324]. Además, también se observó una reducción significativa de leucocitos, neutrófilos y linfocitos tras una pérdida de peso sostenida tras dos años de seguimiento [325].

Al analizar los parámetros de estrés oxidativo e inflamación, los resultados han mostrado una mejoría más pronunciada en el grupo con mayor adherencia a la MedDiet. Los efectos beneficiosos de la MedDiet se atribuyen, entre otros factores, a la presencia de compuestos bioactivos con actividad antioxidante y antiinflamatoria [326,327]. De hecho, una intervención nutricional basada en un patrón de dieta mediterránea aumenta la capacidad antioxidante total del suero en comparación con un grupo control asignado a una dieta baja en grasas [328]. Además de esta acción directa, algunos componentes de MedDiet son capaces de inducir los mecanismos de defensa antioxidantes endógenos en pacientes con SMet [260,329]. Concretamente, en el presente estudio, un mayor aumento en la adherencia a la MedDiet se relacionó directamente con aumento de actividades enzimáticas antioxidantes en plasma y PBMCs, así como una mayor expresión de catalasa en PBMCs. La expresión de MnSOD y Nrf2 también tiende a aumentar su variación, aunque no es estadísticamente significativa. Esta falta de diferencias podría derivar de la variabilidad entre los distintos individuos, por lo que aumentar el número de participantes podría haber mostrado diferencias más claras. Esta mejora en los mecanismos antioxidantes es paralela a una disminución en los niveles de MDA en plasma en ambos grupos. Aunque el grupo con menor mejora en la adherencia a la MedDiet no ha reportado variaciones significativas en los mecanismos de defensa antioxidante, sí se beneficia de un menor grado de

peroxidación lipídica. De manera similar, se han observado niveles más bajos de MDA a medida que aumenta el grado de adherencia a la MedDiet en pacientes sanos y en pacientes con SMet a los que se les indica que sigan una dieta de estilo mediterráneo [329,330].

Los resultados reflejan que una mejor adherencia a la MedDiet se traduce en una mayor reducción de los niveles plasmáticos de MPO tras los 6 meses de intervención nutricional. Esta mejora puede deberse a un mejor perfil inflamatorio que disminuye tanto el número de células inmunitarias circulantes como su estado de preactivación. Se ha observado una actividad elevada de MPO en biopsias de hígado de pacientes con esteatosis simple de hígado graso, aumentando progresivamente de NAFLD a NASH [331]. Además, los presentes resultados revelan que los participantes de ambos grupos, después de 6 meses de seguimiento, mostraron niveles más altos de resolvinas D1 respecto a los valores iniciales, lo que indica que incluso pequeñas mejoras en la adherencia a la MedDiet tienen efectos antiinflamatorios beneficiosos. De acuerdo con los presentes resultados, se ha evidenciado que los neutrófilos estimulados de pacientes con SMet aumentaron la liberación de resolvinas después del programa de pérdida de peso [332].

Por el contrario, los niveles de TNF α e IL-6 muestran una tendencia a la disminución, aunque solo es significativa para la IL-6 en el grupo de mayor adherencia a la MedDiet. Datos anteriores informaron una asociación entre biomarcadores inflamatorios con deterioro del estado oxidativo debido a la EHGA [333]. Además, dado que los niveles de TNF α e IL-6 están directamente relacionados con el porcentaje de tejido adiposo, la disminución observada en el IMC y la grasa hepática tras la intervención nutricional puede disminuir su liberación [243]. Esta disminución de citocinas inflamatorias está de acuerdo con la disminución de la expresión de TLR4. La activación de los TLR por productos microbianos o patrones moleculares asociados a daños endógenos induce una cascada de vías de señalización intracelular que conducen a la producción de citoquinas proinflamatorias y también pueden contribuir a la resistencia a la insulina [334]. Además, TLR4 puede ser activado por ácidos grasos saturados y ceramida, lo que podría ser relevante en NAFLD [335]. De hecho, la expresión de TLR4 está elevada en el hígado de pacientes con NAFLD en comparación con pacientes sanos [336]. La pérdida

de peso, junto con un mejor perfil metabólico, puede reducir el estado proinflamatorio y la presencia de ácidos grasos libres, reduciendo la expresión de TLR4 y sus productos derivados.

Aunque se ha observado una tendencia a la disminución de los niveles de irisina a los 6 meses de seguimiento respecto a los valores iniciales, las diferencias no son significativas. Se ha observado que un aumento de los niveles de irisina en circulación se asocia con un fenotipo más agresivo de enfermedad hepática [337].



CONCLUSIONES

1. Los valores más elevados de estrés oxidativo observados en pacientes con SMet se relacionan con un mayor estado proinflamatorio en comparación con pacientes sin SMet con independencia del sexo.
2. El estado proinflamatorio sistémico de los pacientes con SMet puede inducir la movilización y producción de ROS y mediadores de inflamación de las PBMCs, lo que se evidencia en un aumento de los mecanismos de defensa antioxidantes, probablemente derivados de un estado de preactivación de las células inmunitarias.
3. Las personas con sobrepeso y obesidad presentan un aumento progresivo en los valores de los marcadores de estrés oxidativo e inflamación en comparación con personas con normopeso.
4. Los valores de biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo en plasma aumentaron principalmente en obesos. Sin embargo, en las PBMCs se observó un aumento de las defensas antioxidantes como mecanismo compensatorio ante una situación crónica de estímulos prooxidativos y proinflamatorios. La relación entre los biomarcadores estudiados y el sobrepeso/obesidad sugiere que estos marcadores pueden ser útiles para monitorizar la progresión/reversión de la obesidad.
5. Una intervención basada en el consumo de una dieta mediterránea hipocalórica mejora los parámetros antropométricos, bioquímicos y el estado prooxidativo y proinflamatorio tras dos años de intervención. Esta mejoría se acentúa en el grupo sometido a una intervención más intensiva donde, además de la dieta, se realiza la promoción de la actividad física y la terapia conductual; lo cual podría contribuir a reducir el riesgo cardiometabólico y mejorar el estado de salud general de los participantes.
6. Los niveles de los marcadores de estrés oxidativo, estado proinflamatorio y los niveles de CK-18 plasmáticos aumentaron significativamente a medida que progresaba el contenido de grasa intrahepática medida con RMN en pacientes diagnosticados de EHGNA.

7. Las pruebas diagnósticas como la RMN no se realizan de forma rutinaria en la práctica clínica habitual para diagnosticar o controlar la EHGNA, por lo que la combinación de varios marcadores no invasivos permitiría el control y la evolución de esta patología.

8. La reducción del contenido graso intrahepático se asocia con una mejora en el nivel de estrés oxidativo y el estado proinflamatorio, así como una mejor capacidad cardiorrespiratoria en pacientes con EHGNA. Los biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo e inflamación se redujeron principalmente en los pacientes que mostraron una mayor reducción de los niveles de contenido graso intrahepático tras 6 meses de intervención.

9. La relación entre la mejora de la capacidad aeróbica y la reducción del contenido graso intrahepático destaca la importancia de la actividad física regular en la prevención/reversión de la EHGNA.

10. Una mejora en la calidad de la dieta, evaluada por el grado de adherencia a la Dieta Mediterránea, permitió mejorar los parámetros antropométricos y bioquímicos, así como los niveles de contenido graso intrahepático y la capacidad física de los pacientes con EHGNA.

11. Una mayor mejora en la adherencia a la Dieta Mediterránea también mejoró el estado oxidativo y proinflamatorio en pacientes con EHGNA tras 6 meses de intervención en el estilo de vida.

12. Una mayor adherencia a las pautas marcadas sobre el estilo de vida se reflejó en una mejor evolución de la EHGNA, lo que puede suponer un gran impacto desde el punto de vista sociosanitario.



BIBLIOGRAFÍA

1. Biswas, T.; Garnett, S.P.; Pervin, S.; Rawal, L.B. The prevalence of underweight, overweight and obesity in Bangladeshi adults: Data from a national survey. *PLoS One* **2017**, *12*, e0177395.
2. Engin, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2017**, *960*, 1–17.
3. Pahwa, R.; Adams-Huet, B.; Jialal, I. The effect of increasing body mass index on cardio-metabolic risk and biomarkers of oxidative stress and inflammation in nascent metabolic syndrome. *J. Diabetes Complications* **2017**, *31*, 810–813.
4. Skalicky, J.; Muzakova, V.; Kandar, R.; Meloun, M.; Rousar, T.; Palicka, V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2008**, *46*, 499–505.
5. Ataey, A.; Jafarvand, E.; Adham, D.; Moradi-Asl, E. The Relationship Between Obesity, Overweight, and the Human Development Index in World Health Organization Eastern Mediterranean Region Countries. *J. Prev. Med. Public Heal.* **2020**, *53*, 98–105.
6. Vincent, H.K.; Taylor, A.G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* **2006**, *30*, 400–418.
7. (WHO), W.H.O. Obesity and overweight Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on Sep 7, 2021).
8. Lecube, A.; Monereo, S.; Ángel Rubio, M.; Martínez-de-Icaya, P.; Martí, A.; Salvador, J.; Masmiquel, L.; Goday, A.; Bellido, D.; Lurbe, E.; et al. Prevención, diagnóstico y tratamiento de la obesidad. Posicionamiento de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad de 2016. **2016**.
9. Rovira, R.F. Evaluación del estado nutricional (dieta, composición corporal, bioquímica y clínica) Conceptos clave.
10. Moreira, O.C.; Alonso-Aubin, D.A.; Patrocinio De Oliveira, C.E.; Candia-Luján, R.; De Paz, J.A. Methods of assessment of body composition: an updated review of description, application, advantages and disadvantages.
11. Weir, C.B.; Jan, A. BMI Classification Percentile And Cut Off Points. *StatPearls* **2021**.
12. Durrer Schutz, D.; Busetto, L.; Dicker, D.; Farpour-Lambert, N.; Pryke, R.; Toplak, H.; Widmer, D.; Yumuk, V.; Schutz, Y. European Practical and Patient-Centred Guidelines for Adult Obesity Management in Primary Care Durrer Schutz et al.: Management of Obesity by GPs. *Obes Facts* **2019**, *12*, 40–66.
13. Carmienke, S.; Freitag, M.; Pischon, T.; Schlattmann, P.; Fankhaenel, T.; Goebel, H.; Gensichen, J. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: a systematic review and meta-regression analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2013**, *67*, 573–585.
14. Romero-Corral, A.; Somers, V.K.; Sierra-Johnson, J.; Thomas, R.J.; Collazo-Clavell, M.; Korinek, J.; Allison, T.; Batsis, J.; Sert-Kuniyoshi, F.; Lopez-Jimenez, F. Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. *Int. J. Obes. (Lond)*. **2008**, *32*, 959–966.
15. Petak, S.; Barbu, C.G.; Yu, E.W.; Fielding, R.; Mulligan, K.; Sabowitz, B.; Wu, C.H.;

- Shepherd, J.A. The Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry: body composition analysis reporting. *J. Clin. Densitom.* **2013**, *16*, 508–519.
16. Wong, J.C.; O'Neill, S.; Beck, B.R.; Forwood, M.R.; Khoo, S.K. Comparison of obesity and metabolic syndrome prevalence using fat mass index, body mass index and percentage body fat. *PLoS One* **2021**, *16*.
 17. Rubio, M.A.; Moreno, C.; Cabrerizo, L. Guías para el tratamiento de las dislipemias en el adulto: Adult Treatment Panel III (ATP-III). *Endocrinol. y Nutr.* **2004**, *51*, 254–265.
 18. Hernández Rodríguez, J.; Moncada Espinal, O.M.; Arnold Domínguez, Y. Utilidad del índice cintura/cadera en la detección del riesgo cardiometabólico en individuos sobrepesos y obesos Available online: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1561-29532018000200007&script=sci_arttext&tlng=pt (accessed on Sep 15, 2021).
 19. Sánchez García, J.I.; Carratalá Pérez, M.; Molina, M.; Server Romero, L.; Valencia Valencia, P.; Fernández-Cañadas Sánchez, J.M. [The magnitude of fatness: prevalence and type of obesity in people registered at a health center] - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9607235/> (accessed on Dec 1, 2021).
 20. Aranceta, J.; Foz, M.; Gil, B.; Jover, E.; Mantilla, T.; Millán, J.; Monereo, S.; Moreno, B. Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular.
 21. López-Ejeda, N. Un nuevo y sencillo método para diagnosticar la obesidad infantil: el índice cintura/talla (ICT) | Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (S.E.D.C.A.) Available online: <https://nutricion.org/un-nuevo-y-sencillo-metodo-para-diagnosticar-la-obesidad-infantil-el-indice-cintura-talla-ict/> (accessed on Sep 15, 2021).
 22. Overweight and obesity - BMI statistics - Statistics Explained Available online: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics (accessed on Nov 10, 2021).
 23. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *Lancet (London, England)* **2017**, *390*, 2627–2642.
 24. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet (London, England)* **2016**, *387*, 1377–1396.
 25. Obesity Rates By Country 2021 Available online: <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/obesity-rates-by-country> (accessed on Nov 11, 2021).
 26. OECD Obesity Update 2017. **2017**.
 27. Aranceta, J.; Pérez Rodrigo, C.; Majem, L.S.; Barba, L.R.; Izquierdo, J.Q.; Vioque, J.; Marí, J.T.; Verdú, J.M.; González, J.L.; Tojo, R.; et al. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Med. Clin. (Barc)*. **2003**, *120*, 608–612.
 28. Salas-Salvadó, J.; Rubio, M.A.; Barbany, M.; Moreno, B.; de la SEEDO*, G.C. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med. Clin. (Barc)*. **2007**, *128*, 184–196.

29. Rubio, M.A.; Salas-Salvadó, J.; Barbany, M.; Moreno, B.; Aranceta, J.; Bellido, D.; Blay, V.; Formiguera, X.; Foz, M.; Luis de Pablos, P.; et al. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev. Española Obes.* **2007**.
30. Yumuk, V.; Tsigos, C.; Fried, M.; Schindler, K.; Busetto, L.; Micic, D.; Toplak, H. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes. Facts* **2015**, *8*, 402–424.
31. Hruby, A.; Hu, F.B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* **2015**, *33*, 673–689.
32. Farooqi, S.; O’Rahilly, S. Genetics of obesity in humans. *Endocr. Rev.* **2006**, *27*, 710–718.
33. Kyrou, I.; Chrousos, G.P.; Tsigos, C. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1083*, 77–110.
34. Blüher, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 288–298.
35. OECD The Heavy Burden of Obesity THE ECONOMICS OF PREVENTION. *OECD Heal. Policy Stud.* **2019**, 1–256.
36. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11234459/> (accessed on Sep 7, 2021).
37. Di Angelantonio, E.; Bhupathiraju, S.N.; Wormser, D.; Gao, P.; Kaptoge, S.; de Gonzalez, A.B.; Cairns, B.J.; Huxley, R.; Jackson, C.L.; Joshy, G.; et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. *Lancet (London, England)* **2016**, *388*, 776–786.
38. MacMahon, S.; Baigent, C.; Duffy, S.; Rodgers, A.; Tominaga, S.; Chambless, L.; De Backer, G.; De Bacquer, D.; Kornitzer, M.; Whincup, P.; et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet (London, England)* **2009**, *373*, 1083–1096.
39. Berrington de Gonzalez, A.; Hartge, P.; Cerhan, J.R.; Flint, A.J.; Hannan, L.; MacInnis, R.J.; Moore, S.C.; Tobias, G.S.; Anton-Culver, H.; Freeman, L.B.; et al. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 2211–2219.
40. Khan, S.S.; Ning, H.; Wilkins, J.T.; Allen, N.; Carnethon, M.; Berry, J.D.; Sweis, R.N.; Lloyd-Jones, D.M. Association of Body Mass Index With Lifetime Risk of Cardiovascular Disease and Compression of Morbidity. *JAMA Cardiol.* **2018**, *3*, 280–287.
41. Grover, S.A.; Kaouache, M.; Rempel, P.; Joseph, L.; Dawes, M.; Lau, D.C.W.; Lowensteyn, I. Years of life lost and healthy life-years lost from diabetes and cardiovascular disease in overweight and obese people: a modelling study. *lancet. Diabetes Endocrinol.* **2015**, *3*, 114–122.
42. Gami, A.S.; Witt, B.J.; Howard, D.E.; Erwin, P.J.; Gami, L.A.; Somers, V.K.; Montori, V.M. Metabolic Syndrome and Risk of Incident Cardiovascular Events and Death. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 403–414.
43. Salas, R.; Bibiloni, M.D.M.; Ramos, E.; Villarreal, J.Z.; Pons, A.; Tur, J.A.; Sureda, A. Metabolic syndrome prevalence among Northern Mexican adult population. *PLoS One*

2014, 9.

44. Guallar-Castillón, P.; Pérez, R.F.; López García, E.; León-Muñoz, L.M.; Aguilera, M.T.; Graciani, A.; Gutiérrez-Fisac, J.L.; Banegas, J.R.; Rodríguez-Artalejo, F. Magnitud y manejo del síndrome metabólico en España en 2008-2010: Estudio ENRICA. *Rev. Española Cardiol.* **2014**, *67*, 367–373.
45. Beigh, S.H.; Jain, S. Prevalence of metabolic syndrome and gender differences. *Bioinformation* **2012**, *8*, 613–616.
46. Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **2005**, *365*, 1415–1428.
47. Alberti, K.; Zimmet, P. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet. Med.* **1998**, *15*, 539–553.
48. Balkau, B.; Charles, M. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet. Med.* **1999**, *16*, 442–443.
49. Alberti, K.G.M.M.; Zimmet, P.; Shaw, J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* **2006**, *23*, 469–480.
50. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.-C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith Jr, S.C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International. *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645.
51. Cano-Ibáñez, N.; Gea, A.; Martínez-González, M.A.; Salas-Salvadó, J.; Corella, D.; Zomeño, M.D.; Romaguera, D.; Vioque, J.; Aros, F.; Wärnberg, J.; et al. Dietary Diversity and Nutritional Adequacy among an Older Spanish Population with Metabolic Syndrome in the PREDIMED-Plus Study: A Cross-Sectional Analysis. *Nutr.* **2019**, *Vol. 11*, Page 958 **2019**, *11*, 958.
52. Garralda-Del-Villar, M.; Carlos-Chillerón, S.; Diaz-Gutierrez, J.; Ruiz-Canela, M.; Gea, A.; Martínez-González, M.A.; Bes-Rastrollo, M.; Ruiz-Estigarribia, L.; Kales, S.N.; Fernández-Montero, A. Healthy Lifestyle and Incidence of Metabolic Syndrome in the SUN Cohort. *Nutr.* **2019**, *Vol. 11*, Page 65 **2018**, *11*, 65.
53. Saklayen, M.G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* **2018**, *20*.
54. Julibert, A.; Bibiloni, M.D.M.; Mateos, D.; Angullo, E.; Tur, J.A. Dietary Fat Intake and Metabolic Syndrome in Older Adults. *Nutr.* **2019**, *Vol. 11*, Page 1901 **2019**, *11*, 1901.
55. Wang, H.H.; Lee, D.K.; Liu, M.; Portincasa, P.; Wang, D.Q.H. Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome. *Pediatr. Gastroenterol. Hepatol. Nutr.* **2020**, *23*, 189–230.
56. Daniele, N. Di; Noce, A.; Vidiri, M.F.; Moriconi, E.; Marrone, G.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; D'Urso, G.; Tesaro, M.; Rovella, V.; Lorenzo, A. De; et al. Impact of Mediterranean

- diet on metabolic syndrome, cancer and longevity. *Oncotarget* **2016**, *8*, 8947–8979.
57. Mendrick, D.L.; Diehl, A.M.; Topor, L.S.; Dietert, R.R.; Will, Y.; La Merrill, M.A.; Bouret, S.; Varma, V.; Hastings, K.L.; Schug, T.T.; et al. Metabolic Syndrome and Associated Diseases: From the Bench to the Clinic. *Toxicol. Sci.* **2018**, *162*, 36–42.
 58. Worm, N. Beyond Body Weight-Loss: Dietary Strategies Targeting Intrahepatic Fat in NAFLD. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–12.
 59. Ishii, S.; Tanaka, T.; Akishita, M.; Ouchi, Y.; Tuji, T.; Iijima, K.; Kikutani, T.; Higashiguchi, T.; Ishikawa-Takata, K.; Obuchi, S.P.; et al. Metabolic Syndrome, Sarcopenia and Role of Sex and Age: Cross-Sectional Analysis of Kashiwa Cohort Study. *PLoS One* **2014**, *9*, e112718.
 60. Yu, S.; Guo, X.; Yang, H.; Zheng, L.; Sun, Y. An update on the prevalence of metabolic syndrome and its associated factors in rural northeast China. *BMC Public Health* **2014**, *14*, 1–9.
 61. Xi, B.; He, D.; Hu, Y.; Zhou, D. Prevalence of metabolic syndrome and its influencing factors among the Chinese adults: the China Health and Nutrition Survey in 2009. *Prev. Med. (Baltim)*. **2013**, *57*, 867–871.
 62. Mabry, R.M.; Reeves, M.M.; Eakin, E.G.; Owen, N. Gender differences in prevalence of the metabolic syndrome in Gulf Cooperation Council Countries: a systematic review. *Diabet. Med.* **2010**, *27*, 593–597.
 63. Erem, C.; Hacıhasanoglu, A.; Deger, O.; Topbaş, M.; Hosver, I.; Ersoz, H.O.; Can, G. Prevalence of metabolic syndrome and associated risk factors among Turkish adults: Trabzon MetS study. *Endocrine* **2008**, *33*, 9–20.
 64. Athyros, V.G.; Bouloukos, V.I.; Pehlivanidis, A.N.; Papageorgiou, A.A.; Dionysopoulou, S.G.; Symeonidis, A.N.; Petridis, D.I.; Kapousouzi, M.I.; Satsoglou, E.A.; Mikhailidis, D.P. The prevalence of the metabolic syndrome in Greece: the MetS-Greece Multicentre Study. *Diabetes. Obes. Metab.* **2005**, *7*, 397–405.
 65. Dallongeville, J.; Cottel, D.; Arveiler, D.; Tauber, J.P.; Bingham, A.; Wagner, A.; Fauvel, J.; Ferrières, J.; Ducimetière, P.; Amouyel, P. The association of metabolic disorders with the metabolic syndrome is different in men and women. *Ann. Nutr. Metab.* **2004**, *48*, 43–50.
 66. Xu, H.; Li, X.; Adams, H.; Kubena, K.; Guo, S. Etiology of Metabolic Syndrome and Dietary Intervention. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *20*.
 67. Deboer, M.D. Assessing and Managing the Metabolic Syndrome in Children and Adolescents. *Nutrients* **2019**, *11*.
 68. de la Sierra, A.; Gorostidi, M.; Aranda, P.; Corbella, E.; Pintó, X. Prevalence of Atherogenic Dyslipidemia in Spanish Hypertensive Patients and Its Relationship With Blood Pressure Control and Silent Organ Damage. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed)*. **2015**, *68*, 592–598.
 69. Núñez-Cortés, J.M.; Pedro-Botet, J. Dislipemia aterogénica: la otra pandemia, asociada a la diabetes. *Clin. E Investig. En Arterioscler.* **2021**, *33*, 30.
 70. Vallejo-Vaz, A.J.; Corral, P.; Schreier, L.; Ray, K.K. Triglycerides and residual risk. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **2020**, *27*, 95–103.
 71. Chait, A.; Ginsberg, H.N.; Vaisar, T.; Heinecke, J.W.; Goldberg, I.J.; Bornfeldt, K.E.

- Remnants of the Triglyceride-Rich Lipoproteins, Diabetes, and Cardiovascular Disease. *Diabetes* **2020**, *69*, 508–516.
72. Langsted, A.; Madsen, C.; Nordestgaard, B. Contribution of remnant cholesterol to cardiovascular risk. *J. Intern. Med.* **2020**, *288*, 116–127.
73. Castañer, O.; Pintó, X.; Subirana, I.; Amor, A.J.; Ros, E.; Hernáez, Á.; Martínez-González, M.Á.; Corella, D.; Salas-Salvadó, J.; Estruch, R.; et al. Remnant Cholesterol, Not LDL Cholesterol, Is Associated With Incident Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2020**, *76*, 2712–2724.
74. Organización Mundial de la Salud Hipertensión Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension> (accessed on Oct 22, 2021).
75. Mancia, G.; Fagard, R.; Narkiewicz, K.; Redón, J.; Zanchetti, A.; Böhm, M.; Christiaens, T.; Cifkova, R.; De Backer, G.; Dominiczak, A.; et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J. Hypertens.* **2013**, *31*, 1281–1357.
76. Casey, D.E.; Thomas, R.J.; Bhalla, V.; Commodore-Mensah, Y.; Heidenreich, P.A.; Kolte, D.; Muntner, P.; Smith, S.C.; Spertus, J.A.; Windle, J.R.; et al. 2019 AHA/ACC Clinical Performance and Quality Measures for Adults With High Blood Pressure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Performance Measures. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* **2019**, *12*, e000057.
77. Organización Mundial de la Salud Diabetes Available online: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (accessed on Oct 22, 2021).
78. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia Report of a WHO/IDF Consultation. *World Heal. Organ.* **2006**.
79. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26158184/> (accessed on Oct 22, 2021).
80. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care* **2020**, *43*, S14–S31.
81. Younossi, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease – A global public health perspective. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 531–544.
82. Harrison, S.A.; Oliver, D.; Arnold, H.L.; Gogia, S.; Neuschwander-Tetri, B.A. Development and validation of a simple NAFLD clinical scoring system for identifying patients without advanced disease. *Gut* **2008**, *57*, 1441–1447.
83. Finck, B.N. Targeting metabolism, insulin resistance, and diabetes to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes* **2018**, *67*, 2485–2493.
84. Ni Than, N.A.; Newsome B, P.N. Non-alcoholic fatty liver disease: when to intervene and with what. *Clin. Med. (Northfield. Ill.)* **2015**, *15*, 186–90.
85. Sureda, A.; Capó, X.; Tejada, S. *Hepatoprotective activity of natural compounds and plant*

- extracts in nonalcoholic fatty liver disease*; Elsevier Inc., 2021; ISBN 9780128164884.
86. Pan, M.H.; Lai, C.S.; Tsai, M.L.; Ho, C.T. Chemoprevention of nonalcoholic fatty liver disease by dietary natural compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 147–171.
 87. Levene, A.P.; Goldin, R.D. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology* **2012**, *61*, 141–152.
 88. Asrih, M.; Jornayvaz, F.R. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *418*, 55–65.
 89. Epstein, F.H.; Moller, D.E.; Flier, J.S. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *N. Engl. J. Med.* **1991**, *325*, 938–948.
 90. Perumpail, B.J.; Khan, M.A.; Yoo, E.R.; Cholankeril, G.; Kim, D.; Ahmed, A. Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 8263–8276.
 91. Bellentani, S.; Scaglioni, F.; Marino, M.; Bedogni, G. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig. Dis.* **2010**, *28*, 155–161.
 92. Franzese, A.; Vajro, P.; Argenziano, A.; Puzziello, A.; Iannucci, M.P.; Saviano, M.C.; Brunetti, F.; Rubino, A. Liver involvement in obese children. Ultrasonography and liver enzyme levels at diagnosis and during follow-up in an Italian population. *Dig. Dis. Sci.* **1997**, *42*, 1428–1432.
 93. McCullough, A.J. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Liver Dis.* **2004**, *8*, 521–533.
 94. Estes, C.; Anstee, Q.M.; Arias-Loste, M.T.; Bantel, H.; Bellentani, S.; Caballeria, J.; Colombo, M.; Craxi, A.; Crespo, J.; Day, C.P.; et al. Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016–2030. *J. Hepatol.* **2018**, *69*, 896–904.
 95. Vernon, G.; Baranova, A.; Younossi, Z.M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 274–285.
 96. VanWagner, L.B.; Rinella, M.E. Extrahepatic Manifestations of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr. Hepatol. Reports* **2016**, *15*, 75–85.
 97. Tana, C.; Ballestri, S.; Ricci, F.; Di Vincenzo, A.; Ticinesi, A.; Gallina, S.; Giamberardino, M.A.; Cipollone, F.; Sutton, R.; Vettor, R.; et al. Cardiovascular Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1–19.
 98. Marcuccilli, M.; Chonchol, M. NAFLD and chronic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*.
 99. Bhatt, H.B.; Smith, R.J. Fatty liver disease in diabetes mellitus. *Hepatobiliary Surg. Nutr.* **2015**, *4*, 101–108.
 100. Sookoian, S.; Castaño, G.O.; Scian, R.; Gianotti, T.F.; Dopazo, H.; Rohr, C.; Gaj, C. Serum aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease are a signature of liver metabolic perturbations at the amino acid and Krebs cycle level. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *103*, 422–434.

101. Clark, J.M. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, *40 Suppl 1*.
102. Mulhall, B.P.; Ong, J.P.; Younossi, Z.M. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2002**, *17*, 1136–1143.
103. Machado, M. V.; Cortez-Pinto, H. Non-invasive diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. A critical appraisal. *J. Hepatol.* **2013**, *58*, 1007–1019.
104. Hadeifi, A.; Degré, D.; Trépo, E.; Moreno, C. Noninvasive diagnosis in alcohol-related liver disease. *Heal. Sci. Reports* **2020**, *3*.
105. Tong, J.; Guo, J.J. Key molecular pathways in the progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 8515–8522.
106. Yasutake, K.; Kohjima, M.; Kotoh, K.; Nakashima, M.; Nakamuta, M.; Enjoji, M. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 1756.
107. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357.
108. Perdomo, C.M.; Frühbeck, G.; Escalada, J. Impact of nutritional changes on nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrients* **2019**, *11*, 677.
109. Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ. J.* **2012**, *5*, 9–19.
110. Schieber, M.; Chandel, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **2014**, *24*.
111. Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* **1995**, *61*, 1–31.
112. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 125–126.
113. Sies, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 8735–8741.
114. Masarone, M.; Rosato, V.; Dallio, M.; Gravina, A.G.; Aglitti, A.; Loguercio, C.; Federico, A.; Persico, M. Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 1–14.
115. Milagro, F.I.; Campi3n, J.; Mart3ez, J.A. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. *Obesity* **2006**, *14*, 1118–1123.
116. Alessio, H.M. Lipid peroxidation in healthy and diseased models: Influence of different types of exercise. Elsevier Science BV, **2000**, 115-127.
117. Tirosh, O.; Z. Reznick, A. Chemical bases and biological relevance of protein oxidation. Elsevier, **2000**, 89–114.
118. Ayala, A.; Mu3oz, M.F.; Arg3elletes, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and

- signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, 2014.
119. Tsikas, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal. Biochem.* **2017**, 524, 13–30.
 120. Dalle-Donne, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J. Cell. Mol. Med.* **2006**, 10, 389–406.
 121. Wickens, A.P. Ageing and the free radical theory. *Respir. Physiol.* **2001**, 128, 379–391.
 122. Larsen, E.L.; Weimann, A.; Poulsen, H.E. Interventions targeted at oxidatively generated modifications of nucleic acids focused on urine and plasma markers. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, 145, 256–283.
 123. Kjær, L.K.; Cejvanovic, V.; Henriksen, T.; Petersen, K.M.; Hansen, T.; Pedersen, O.; Christensen, C.K.; Torp-Pedersen, C.; Gerds, T.A.; Brandslund, I.; et al. Cardiovascular and All-Cause Mortality Risk Associated With Urinary Excretion of 8-oxoGuo, a Biomarker for RNA Oxidation, in Patients With Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Diabetes Care* **2017**, 40, 1771–1778.
 124. Henriksen, T.; Hillestrøm, P.R.; Poulsen, H.E.; Weimann, A. Automated method for the direct analysis of 8-oxo-guanosine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine in human urine using ultraperformance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 47, 629–635.
 125. Rasmussen, S.T.; Andersen, J.T.; Nielsen, T.K.; Cejvanovic, V.; Petersen, K.M.; Henriksen, T.; Weimann, A.; Lykkesfeldt, J.; Poulsen, H.E. Simvastatin and oxidative stress in humans: A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Redox Biol.* **2016**, 9, 32–38.
 126. Yoboue, E.D.; Mougeolle, A.; Kaiser, L.; Averet, N.; Rigoulet, M.; Devin, A. The role of mitochondrial biogenesis and ROS in the control of energy supply in proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2014**, 1837, 1093–1098.
 127. Ludovico, P.; Burhans, W.C. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS Yeast Res.* **2014**, 14, 33.
 128. Radak, Z.; Ishihara, K.; Tekus, E.; Varga, C.; Posa, A.; Balogh, L.; Boldogh, I.; Koltai, E. Exercise, oxidants, and antioxidants change the shape of the bell-shaped hormesis curve. *Redox Biol.* **2017**, 12, 285–290.
 129. Ferrer, M.D.; Sureda, A.; Mestre, A.; Tur, J.A.; Pons, A. The double edge of reactive oxygen species as damaging and signaling molecules in HL60 cell culture. *Cell. Physiol. Biochem.* **2010**, 25, 241–252.
 130. Ji, L.L. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp. Gerontol.* **2007**, 42, 582–593.
 131. Mirończuk-Chodakowska, I.; Witkowska, A.M.; Zujko, M.E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv. Med. Sci.* **2018**, 63, 68–78.
 132. Sureda, A.; Ferrer, M.D.; Tauler, P.; Romaguera, D.; Drobic, F.; Pujol, P.; Tur, J.A.; Pons,

- A. Effects of exercise intensity on lymphocyte H₂O₂ production and antioxidant defences in soccer players. *Br. J. Sports Med.* **2009**, *43*, 186–190.
133. Goyal, M.M.; Basak, A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* **2010**, *1*, 888–897.
134. Mueller, S.; Millonig, G.; Waite, G.N. The GOX/CAT system: a novel enzymatic method to independently control hydrogen peroxide and hypoxia in cell culture. *Adv. Med. Sci.* **2009**, *54*, 121–135.
135. Chiu, D.T.Y. Oxidative stress in biology and medicine. *Biomed. J.* **2014**, *37*, 97–98.
136. Matés, J.M.; Pérez-Gómez, C.; De Castro, I.N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 595–603.
137. Espinosa-Diez, C.; Miguel, V.; Mennerich, D.; Kietzmann, T.; Sánchez-Pérez, P.; Cadenas, S.; Lamas, S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 183–197.
138. Deponte, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 3217–3266.
139. Minich, D.M.; Brown, B.I. A Review of Dietary (Phyto)Nutrients for Glutathione Support. *Nutrients* **2019**, *11*.
140. Lu, J.; Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *66*, 75–87.
141. Lee, G.Y.; Han, S.N. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients* **2018**, *10*.
142. Schneider, C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 7–30.
143. Valdés, F. [Vitamin C]. *Actas Dermosifiliogr.* **2006**, *97*, 557–568.
144. Rodrigo, R.; Miranda, A.; Vergara, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta.* **2011**, *412*, 410–424.
145. Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr. Hosp.* **2012**, *27*, 76–89.
146. Vona, R.; Gambardella, L.; Cittadini, C.; Straface, E.; Pietraforte, D. Biomarkers of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 1–19.
147. Bekkouche, L.; Bouchenak, M.; Malaisse, W.J.; Yahia, D.A. The mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in algerian metabolic syndrome patients. *Horm. Metab. Res.* **2014**, *46*, 274–282.
148. Stocker, R.; Keaney, J.F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 1381–1478.
149. Grandl, G.; Wolfrum, C. Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. *Semin. Immunopathol.* **2018**, *40*, 215–224.
150. Alkhoury, N.; Dixon, L.J.; Feldstein, A.E. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: Not

- all lipids are created equal. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *3*, 445–451.
151. Unger, R.H. Minireview: weapons of lean body mass destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* **2003**, *144*, 5159–5165.
 152. Aronis, A.; Madar, Z.; Tirosh, O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: Exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *38*, 1221–1230.
 153. Manna, P.; Jain, S.K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2015**, *13*, 423–444.
 154. Kumar, V.A.; Abbas, A.K.; Aster, J.C. *Robbins y Cotran. Patología Estructural Y Funcional*; 9th ed.; Elsevier, 2015; ISBN 9788490228784.
 155. Geering, B.; Stoeckle, C.; Conus, S.; Simon, H.-U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 398–409.
 156. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 428–435.
 157. Alan, J.E.; Lewis, D.E. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. *Ann. Rheum. Dis.* **1988**, *47*, 792.
 158. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 173–182.
 159. Granger, D.N.; Senchenkova, E. Inflammation and the Microcirculation. *Colloq. Ser. Integr. Syst. Physiol. From Mol. to Funct.* **2010**, *2*, 1–87.
 160. Lowry, S.F. The Evolution of an Inflammatory Response. *Surg. Infect. (Larchmt).* **2009**, *10*, 419.
 161. Lintermans, L.L.; Stegeman, C.A.; Heeringa, P.; Abdulahad, W.H. T cells in vascular inflammatory diseases. *Front. Immunol.* **2014**, *5*.
 162. Sugimoto, M.A.; Sousa, L.P.; Pinho, V.; Perretti, M.; Teixeira, M.M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front. Immunol.* **2016**, *7*.
 163. Chatzigeorgiou, A.; Karalis, K.P.; Bornstein, S.R.; Chavakis, T. Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2583–2592.
 164. Serhan, C.N.; Levy, B.D. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J. Clin. Invest.* **2018**, *128*, 2657–2669.
 165. Headland, S.E.; Norling, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin. Immunol.* **2015**, *27*, 149–160.
 166. Reville, K.; Crean, J.K.; Vivers, S.; Dransfield, I.; Godson, C. Lipoxin A4 redistributes myosin IIA and Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 1878–1888.
 167. Serhan, C.N.; Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1191–1197.

168. Feghali, C.A.; Wright, T.M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front. Biosci.* **1997**, *2*.
169. Tzanavari, T.; Giannogonas, P.; Karalis, K.P. TNF-alpha and obesity. *Curr. Dir. Autoimmun.* **2010**, *11*, 145–156.
170. Pedersen, B.K.; Febbraio, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 1379–1406.
171. Petersen, A.M.W.; Pedersen, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. *J. Appl. Physiol.* **2005**, *98*, 1154–1162.
172. Choi, E.S.; Kim, M.K.; Song, M.K.; Kim, J.M.; Kim, E.S.; Chung, W.J.; Park, K.S.; Cho, K.B.; Hwang, J.S.; Jang, B.K. Association between serum irisin levels and non-alcoholic fatty liver disease in health screen examinees. *PLoS One* **2014**, *9*, e110680.
173. Polyzos, S.A.; Anastasilakis, A.D.; Efstathiadou, Z.A.; Makras, P.; Perakakis, N.; Kountouras, J.; Mantzoros, C.S. Irisin in metabolic diseases. *Endocrine* **2018**, *59*, 260–274.
174. Singh, S.; Anshita, D.; Ravichandiran, V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *101*.
175. Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *640*, 47–52.
176. Rensen, S.S.; Slaats, Y.; Nijhuis, J.; Jans, A.; Bieghs, V.; Driessen, A.; Malle, E.; Greve, J.W.; Buurman, W.A. Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 1473–1482.
177. Rensen, S.S.; Bieghs, V.; Xanthoulea, S.; Arfianti, E.; Bakker, J.A.; Shiri-Sverdlov, R.; Hofker, M.H.; Greve, J.W.; Buurman, W.A. Neutrophil-Derived Myeloperoxidase Aggravates Non-Alcoholic Steatohepatitis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. *PLoS One* **2012**, *7*, e52411.
178. Wang, B.; Yang, R.N.; Zhu, Y.R.; Xing, J.C.; Lou, X.W.; He, Y.J.; Ding, Q.L.; Zhang, M.Y.; Qiu, H. Involvement of xanthine oxidase and paraoxonase 1 in the process of oxidative stress in nonalcoholic fatty liver disease. *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 387–395.
179. Titos, E.; Rius, B.; López-Vicario, C.; Alcaraz-Quiles, J.; García-Alonso, V.; Lopategi, A.; Dalli, J.; Lozano, J.J.; Arroyo, V.; Delgado, S.; et al. Signaling and Immunoresolving Actions of Resolvin D1 in Inflamed Human Visceral Adipose Tissue. *J. Immunol.* **2016**, *197*, 3360–3370.
180. Musso, G.; Gambino, R.; Cassader, M.; Pagano, G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann. Med.* **2011**, *43*, 617–649.
181. Ke, Y.; Xu, C.; Lin, J.; Li, Y. Role of hepatokines in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Transl. Intern. Med.* **2020**, *7*, 143–148.
182. Sproston, N.R.; Ashworth, J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*.
183. Lackey, D.E.; Olefsky, J.M. Regulation of metabolism by the innate immune system. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 15–28.

184. Saltiel, A.R.; Olefsky, J.M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *J. Clin. Invest.* **2017**, *127*, 1–4.
185. Zgheib, C.; Xu, J.; Liechty, K.W. Targeting Inflammatory Cytokines and Extracellular Matrix Composition to Promote Wound Regeneration. *Adv. wound care* **2014**, *3*, 344–355.
186. Mansyur, M.A.; Bakri, S.; Patellongi, I.J.; Rahman, I.A. The association between metabolic syndrome components, low-grade systemic inflammation and insulin resistance in non-diabetic Indonesian adolescent male. *Clin. Nutr. ESPEN* **2020**, *35*, 69–74.
187. Welty, F.K.; Alfaddagh, A.; Elajami, T.K. Targeting inflammation in metabolic syndrome. *Transl. Res.* **2016**, *167*, 257–280.
188. Sheikhsari, G.; Soltani-Zangbar, M.S.; Pourmoghadam, Z.; Kamrani, A.; Azizi, R.; Aghebati-Maleki, L.; Danaii, S.; Koushaeian, L.; Hojat-Farsangi, M.; Yousefi, M. Oxidative stress, inflammatory settings, and microRNA regulation in the recurrent implantation failure patients with metabolic syndrome. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2019**, *82*, 0–3.
189. Savaş, E.M.; Oğuz, S.H.; Samadi, A.; Yılmaz Işıksan, S.; Ünlütürk, U.; Lay, İ.; Gürlek, A. Apoptosis Inhibitor of Macrophage, Monocyte Chemotactic Protein-1, and C-Reactive Protein Levels Are Increased in Patients with Metabolic Syndrome: A Pilot Study. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2020**, met.2019.0074.
190. Nishimura, S.; Manabe, I.; Nagasaki, M.; Eto, K.; Yamashita, H.; Ohsugi, M.; Otsu, M.; Hara, K.; Ueki, K.; Sugiura, S.; et al. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 914–920.
191. Esser, N.; Legrand-Poels, S.; Piette, J.; Scheen, A.J.; Paquot, N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2014**, *105*, 141–150.
192. Richard, C.; Wadowski, M.; Goruk, S.; Cameron, L.; Sharma, A.M.; Field, C.J. Individuals with obesity and type 2 diabetes have additional immune dysfunction compared with obese individuals who are metabolically healthy. *BMJ open diabetes Res. care* **2017**, *5*, e000379.
193. MOROHOSHI, M.; FUJISAWA, K.; UCHIMURA, I.; NUMANO, F. The Effect of Glucose and Advanced Glycosylation End Products on IL-6 Production by Human Monocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *748*, 562–570.
194. Reinhold, D.; Ansorge, S. Elevated Glucose Levels Stimulate Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), Suppress Interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 Production and DNA Synthesis in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Horm. Metab. Res.* **1996**, *28*, 267–270.
195. Guasch-Ferré, M.; Salas-Salvadó, J.; Ros, E.; Estruch, R.; Corella, D.; Fitó, M.; Martínez-González, M.A.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Fiol, M.; et al. The PREDIMED trial, Mediterranean diet and health outcomes: How strong is the evidence? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2017**, *27*, 624–632.
196. RAH, S. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 1387–1389.
197. Estruch, R.; Ros, E.; Salas-Salvadó, J.; Covas, M.-I.; Corella, D.; Arós, F.; Gómez-Gracia, E.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Fiol, M.; Lapetra, J.; et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 1279–90.

198. Martínez-González, M.A.; Buil-Cosiales, P.; Corella, D.; Bulló, M.; Fitó, M.; Vioque, J.; Romaguera, D.; Alfredo Martínez, J.; Wärnberg, J.; López-Miranda, J.; et al. Cohort Profile: Design and methods of the PREDIMED-Plus randomized trial. *Int. J. Epidemiol.* **2019**, *48*, 387-388o.
199. Alberti, K.G.M.M.; Eckel, R.H.; Grundy, S.M.; Zimmet, P.Z.; Cleeman, J.I.; Donato, K.A.; Fruchart, J.C.; James, W.P.T.; Loria, C.M.; Smith, S.C. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International . *Circulation* **2009**, *120*, 1640–1645.
200. Nigg, C.R.; Burbank, P.M.; Padula, C.; Dufresne, R.; Rossi, J.S.; Velicer, W.F.; Laforge, R.G.; Prochaska, J.O. Stages of change across ten health risk behaviors for older adults. *Gerontologist* **1999**, *39*, 473–482.
201. Medicine, I. of Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. *Diet. Ref. Intakes Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fat. Acids, Cholesterol, Protein, Amin. Acids* **2005**, 1–1331.
202. Beck, A.T.; Steer, R.A.; Carbin, M.G. Psychometric properties of the Beck Depression Inventory: Twenty-five years of evaluation. *Clin. Psychol. Rev.* **1988**, *8*, 77–100.
203. Hwang, S.T.; Cho, Y.K.; Yun, J.W.; Park, J.H.; Kim, H.J.; Park, D.I.; Sohn, C.I.; Jeon, W.K.; Kim, B.I.; Rhee, E.J.; et al. Impact of non-alcoholic fatty liver disease on microalbuminuria in patients with prediabetes and diabetes. *Intern. Med. J.* **2010**, *40*, 437–442.
204. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357.
205. Dietary Guidelines for Americans 2015-2020 U.S. Department of Health and Human Services and U.S. Department of Agriculture. 2015–2020. *Diet. Guidel. Am. 8th Ed.* **2015**.
206. de la Iglesia, R.; Lopez-Legarrea, P.; Celada, P.; Sánchez-Muniz, F.J.; Martinez, J.A.; Zulet, M.A. Beneficial Effects of the RESMENA Dietary Pattern on Oxidative Stress in Patients Suffering from Metabolic Syndrome with Hyperglycemia Are Associated to Dietary TAC and Fruit Consumption. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6903.
207. Pitsavos, C.; Panagiotakos, D.B.; Tzima, N.; Chrysohoou, C.; Economou, M.; Zampelas, A.; Stefanadis, C. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *82*, 694–699.
208. Zulet, M.; Bondia-Pons, I.; Abete, I.; de la Iglesia, R.; López-Legarrera, P.; Forga, L.; Navas-Carretero, S.; Martínez, J. The reduction of the metabolic syndrome in Navarra-Spain (RESMENA-S) study: a multidisciplinary strategy based on chrononutrition and nutritional education, together with dietetic and psychological control - PubMed. *Nutr Hosp* **2011**, *26*, 16–26.
209. BØYUM, A. Separation of White Blood Cells. *Nature* **1964**, *204*, 793–794.
210. Mestre-Alfaro, A.; Ferrer, M.D.; Sureda, A.; Tauler, P.; Martínez, E.; Bibiloni, M.M.; Micol, V.; Tur, J.A.; Pons, A. Phytoestrogens enhance antioxidant enzymes after swimming exercise and modulate sex hormone plasma levels in female swimmers. *Eur. J. Appl.*

- Physiol.* **2011**, *111*, 2281–2294.
211. Busquets-Cortés, C.; Capó, X.; Martorell, M.; Tur, J.A.; Sureda, A.; Pons, A. Training Enhances Immune Cells Mitochondrial Biosynthesis, Fission, Fusion, and Their Antioxidant Capabilities Synergistically with Dietary Docosahexaenoic Supplementation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 1–10.
 212. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126.
 213. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–55.
 214. Bergmayer, H.U.. Glutathione reductase. Methods of Enzymatic Analysis. *Starch - Stärke* **1963**, *15*, 272–272.
 215. Flohé, L.; Otting, F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 93–104.
 216. Capeillère-Blandin, C. Oxidation of guaiacol by myeloperoxidase: a two-electron-oxidized guaiacol transient species as a mediator of NADPH oxidation. *Biochem. J.* **1998**, *336*, 395–404.
 217. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
 218. Zimmet, P.Z.; McCarty, D.J.; de Courten, M.P. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J. Diabetes Complications* **11**, 60–8.
 219. Bulló, M.; Casas-Agustench, P.; Amigó-Correig, P.; Aranceta, J.; Salas-Salvadó, J. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. *Public Health Nutr.* **2007**, *10*, 1164–1172.
 220. Hernánadez, Beatlle, Martínez, San-Crsitóbal, Pérez, N. y M. Cambios alimentarios y de estilo de vida como estrategia en la prevención del síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2 : hitos y perspectivas Alimentary and lifestyle changes as a strategy in the prevention. *An. Sist. Sanit. Navar* **2016**, *39*, 269–289.
 221. Oguntibeju, O.O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2019**, *11*, 45–63.
 222. Okon, E.B.; Chung, A.W.Y.; Zhang, H.; Laher, I.; van Breemen, C. Hyperglycemia and hyperlipidemia are associated with endothelial dysfunction during the development of type 2 diabetes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2007**, *85*, 562–7.
 223. Nihi, M.M.; Manfro, R.C.; Martins, C.; Suliman, M.; Murayama, Y.; Riella, M.C.; Lindholm, B.; Nascimento, M.M. do [Association between body fat, inflammation and oxidative stress in hemodialysis]. *J. Bras. Nefrol.* **2010**, *32*, 9–15.
 224. Sureda, A.; Bibiloni, M.; Julibert, A.; Bouzas, C.; Argelich, E.; Llompart, I.; Pons, A.; Tur, J. Adherence to the Mediterranean Diet and Inflammatory Markers. *Nutrients* **2018**, *10*, 62.
 225. Ryder, E.; Diez-Ewald, M.; Mosquera, J.; Fernández, E.; Pedrañez, A.; Vargas, R.; Peña, C.; Fernández, N. Association of obesity with leukocyte count in obese individuals without metabolic syndrome. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2014**, *8*, 197–204.

226. Oda, E.; Kawai, R. The Prevalence of Metabolic Syndrome and Diabetes Increases through the Quartiles of White Blood Cell Count in Japanese Men and Women. *Intern. Med.* **2009**, *48*, 1127–1134.
227. Li, P.-F.; Chen, J.-S.; Chang, J.-B.; Chang, H.-W.; Wu, C.-Z.; Chuang, T.-J.; Huang, C.-L.; Pei, D.; Hsieh, C.-H.; Chen, Y.-L. Association of complete blood cell counts with metabolic syndrome in an elderly population. *BMC Geriatr.* **2016**, *16*, 10.
228. Rizzo, A.; Roscino, M.; Binetti, F.; Sciorsci, R. Roles of Reactive Oxygen Species in Female Reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* **2012**, *47*, 344–352.
229. Sladoje, D.P.; Kisić, B.; Mirić, D. The Monitoring of Protein Markers of Inflammation and Serum Lipid Concentration in Obese Subjects with Metabolic Syndrome. *J. Med. Biochem.* **2017**, *36*, 366–374.
230. Capó, X.; Martorell, M.; Busquets-Cortés, C.; Sureda, A.; Riera, J.; Drobnic, F.; Tur, J.A.; Pons, A. Effects of dietary almond- and olive oil-based docosahexaenoic acid- and Vitamin E-enriched beverage supplementation on athletic performance and oxidative stress markers. *Food Funct.* **2016**, *7*, 4920–4934.
231. Chen, S.J.; Yen, C.H.; Huang, Y.C.; Lee, B.J.; Hsia, S.; Lin, P.T. Relationships between Inflammation, Adiponectin, and Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *PLoS One* **2012**, *7*, 8–12.
232. Wu, S.-S.; Kor, C.-T.; Chen, T.-Y.; Liu, K.-H.; Shih, K.-L.; Su, W.-W.; Wu, H.-M. Relationships between Serum Uric Acid, Malondialdehyde Levels, and Carotid Intima-Media Thickness in the Patients with Metabolic Syndrome. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 6859757.
233. Ferrer, M.D.; Tauler, P.; Sureda, A.; Tur, J.A.; Pons, A. Antioxidant regulatory mechanisms in neutrophils and lymphocytes after intense exercise. *J. Sports Sci.* **2009**, *27*, 49–58.
234. Hutcheson, R.; Rocic, P. The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, *2012*, 1–13.
235. Ladeiras-Lopes, R.; Teixeira, P.; Azevedo, A.; Leite-Moreira, A.; Bettencourt, N.; Fontes-Carvalho, R. Metabolic syndrome severity score is associated with diastolic dysfunction and low-grade inflammation in a community-based cohort. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2019**, 2047487319895400.
236. Rajendran, P.; Rengarajan, T.; Thangavel, J.; Nishigaki, Y.; Sakthisekaran, D.; Sethi, G.; Nishigaki, I. The vascular endothelium and human diseases. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *9*, 1057–69.
237. Carbone, F.; Lattanzio, M.S.; Minetti, S.; Ansaldo, A.M.; Ferrara, D.; Molina-Molina, E.; Belfiore, A.; Elia, E.; Pugliese, S.; Palmieri, V.O.; et al. Circulating CRP Levels Are Associated with Epicardial and Visceral Fat Depots in Women with Metabolic Syndrome Criteria. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5981.
238. Jayarathne, S.; Koboziev, I.; Park, O.-H.; Oldewage-Theron, W.; Shen, C.-L.; Moustaid-Moussa, N. Anti-Inflammatory and Anti-Obesity Properties of Food Bioactive Components: Effects on Adipose Tissue. *Prev. Nutr. food Sci.* **2017**, *22*, 251–262.
239. García-Sánchez, A.; Gámez-Nava, J.I.; Díaz-de la Cruz, E.N.; Cardona-Muñoz, E.G.; Becerra-Alvarado, I.N.; Aceves-Aceves, J.A.; Sánchez-Rodríguez, E.N.; Miranda-Díaz, A.G. <p>The Effect of Visceral Abdominal Fat Volume on Oxidative Stress and

- Proinflammatory Cytokines in Subjects with Normal Weight, Overweight and Obesity. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2020**, Volume 13, 1077–1087.
240. Olefsky, J.M.; Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **2009**, *72*, 219–246.
 241. Rocha, V.Z.; Folco, E.J.; Sukhova, G.; Shimizu, K.; Gotsman, I.; Vernon, A.H.; Libby, P. Interferon- γ , a Th1 cytokine, regulates fat inflammation: A role for adaptive immunity in obesity. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 467–476.
 242. Elgazar-Carmon, V.; Rudich, A.; Hadad, N.; Levy, R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 1894–1903.
 243. Popko, K.; Gorska, E.; Stelmaszczyk-Emmel, A.; Plywaczewski, R.; Stoklosa, A.; Gorecka, D.; Pyrzak, B.; Demkow, U. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur. J. Med. Res.* **2010**, *15*, 120–122.
 244. Vincent, H.K.; Taylor, A.G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int. J. Obes.* **2006**, *30*, 400–418.
 245. Monserrat-Mesquida, M.; Quetglas-Llabrés, M.; Capó, X.; Bouzas, C.; Mateos, D.; Pons, A.; Tur, J.A.; Sureda, A. Metabolic Syndrome is Associated with Oxidative Stress and Proinflammatory State. *Antioxidants* **2020**, *9*, 236.
 246. Ladeiras-Lopes, R.; Teixeira, P.; Azevedo, A.; Leite-Moreira, A.; Bettencourt, N.; Fontes-Carvalho, R. Metabolic syndrome severity score is associated with diastolic dysfunction and low-grade inflammation in a community-based cohort. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2019**, 204748731989540.
 247. O'Rourke, R.W.; Kay, T.; Lyle, E.A.; Traxler, S.A.; Deveney, C.W.; Jobe, B.A.; Roberts, C.T.; Marks, D.; Rosenbaum, J.T. Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin. Exp. Immunol.* **2006**, *146*, 39–46.
 248. Ghanim, H.; Aljada, A.; Hofmeyer, D.; Syed, T.; Mohanty, P.; Dandona, P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* **2004**, *110*, 1564–1571.
 249. Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Rodríguez, A.; Ramírez, B.; Valentí, V.; Moncada, R.; Silva, C.; Salvador, J.; Frühbeck, G. Peripheral mononuclear blood cells contribute to the obesity-associated inflammatory state independently of glycemic status: involvement of the novel proinflammatory adipokines chemerin, chitinase-3-like protein 1, lipocalin-2 and osteopontin. *Genes Nutr.* **2015**, *10*.
 250. Dicker, D.; Salook, M.A.; Marcoviciu, D.; Djaldetti, M.; Bessler, H. Role of peripheral blood mononuclear cells in the predisposition of obese individuals to inflammation and infection. *Obes. Facts* **2013**, *6*, 146–151.
 251. Akhter, N.; Madhoun, A.; Arefanian, H.; Wilson, A.; Kochumon, S.; Thomas, R.; Shenouda, S.; Al-Mulla, F.; Ahmad, R.; Sindhu, S. Oxidative stress induces expression of the toll-like receptors (TLRs) 2 and 4 in the human peripheral blood mononuclear cells: Implications for metabolic inflammation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2019**, *53*, 1–18.
 252. Bondia-Pons, I.; Ryan, L.; Martinez, J.A. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. *J. Physiol. Biochem.* **2012**, *68*, 701–711.

253. Bankoglu, E.E.; Gerber, J.; Kodandaraman, G.; Seyfried, F.; Stopper, H. Influence of bariatric surgery induced weight loss on oxidative DNA damage. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2020**, *853*.
254. Qaddoumi, M.G.; Alanbaei, M.; Hammad, M.M.; Al Khairi, I.; Cherian, P.; Channanath, A.; Thanaraj, T.A.; Al-Mulla, F.; Abu-Farha, M.; Abubaker, J. Investigating the Role of Myeloperoxidase and Angiopoietin-like Protein 6 in Obesity and Diabetes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*.
255. Agnoli, C.; Sieri, S.; Ricceri, F.; Giraudo, M.T.; Masala, G.; Assedi, M.; Panico, S.; Mattiello, A.; Tumino, R.; Giurdanella, M.C.; et al. Adherence to a Mediterranean diet and long-term changes in weight and waist circumference in the EPIC-Italy cohort. *Nutr. Diabetes* **2018**, *8*.
256. Cano-Ibáñez, N.; Bueno-Cavanillas, A.; Martínez-González, M.Á.; Salas-Salvadó, J.; Corella, D.; Freixer, G. I.; Romaguera, D.; Vioque, J.; Alonso-Gómez, Á.M.; Wärnberg, J.; et al. Effect of changes in adherence to Mediterranean diet on nutrient density after 1-year of follow-up: results from the PREDIMED-Plus Study. *Eur. J. Nutr.* **2020**, *59*, 2395–2409.
257. Julibert, A.; Del Mar Bibiloni, M.; Gallardo-Alfaro, L.; Abbate, M.; Martínez-González, M.; Salas-Salvadó, J.; Corella, D.; Fitó, M.; Martínez, J.A.; Alonso-Gómez, Á.M.; et al. Metabolic Syndrome Features and Excess Weight Were Inversely Associated with Nut Consumption after 1-Year Follow-Up in the PREDIMED-Plus Study. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 3161–3170.
258. Kurajoh, M.; Fukumoto, S.; Murase, T.; Nakamura, T.; Ishihara, T.; Go, H.; Yamamoto, K.; Nakatani, S.; Tsuda, A.; Morioka, T.; et al. Insulin Resistance Associated with Plasma Xanthine Oxidoreductase Activity Independent of Visceral Adiposity and Adiponectin Level: MedCity21 Health Examination Registry. *Int. J. Endocrinol.* **2019**, *2019*.
259. Richette, P.; Poitou, C.; Manivet, P.; Denis, J.; Bouillot, J.L.; Clément, K.; Oppert, J.M.; Bardin, T. Weight Loss, Xanthine Oxidase, and Serum Urate Levels: A Prospective Longitudinal Study of Obese Patients. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **2016**, *68*, 1036–1042.
260. Sureda, A.; Bibiloni, M. del M.; Martorell, M.; Buil-Cosiales, P.; Marti, A.; Pons, A.; Tur, J.A.; Martinez-Gonzalez, M.Á. Mediterranean diets supplemented with virgin olive oil and nuts enhance plasmatic antioxidant capabilities and decrease xanthine oxidase activity in people with metabolic syndrome: The PREDIMED study. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 2654–2664.
261. Mathew, A. V.; Li, L.; Byun, J.; Guo, Y.; Michailidis, G.; Jaiswal, M.; Chen, Y.E.; Pop-Busui, R.; Pennathur, S. Therapeutic Lifestyle Changes Improve HDL Function by Inhibiting Myeloperoxidase-Mediated Oxidation in Patients With Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 2431–2437.
262. Fang, C.; Kim, H.; Barnes, R.C.; Talcott, S.T.; Mertens-Talcott, S.U. Obesity-Associated Diseases Biomarkers Are Differently Modulated in Lean and Obese Individuals and Inversely Correlated to Plasma Polyphenolic Metabolites After 6 Weeks of Mango (*Mangifera indica* L.) Consumption. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*.
263. Novotny, J.A.; Chen, T.Y.; Terekhov, A.I.; Gebauer, S.K.; Baer, D.J.; Ho, L.; Pasinetti, G.M.; Ferruzzi, M.G. The effect of obesity and repeated exposure on pharmacokinetic response

- to grape polyphenols in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2017**, *61*.
264. Newsholme, P.; Cruzat, V.F.; Keane, K.N.; Carlessi, R.; De Bittencourt, P.I.H. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 4527–4550.
 265. Versleijen, M.; Roelofs, H.; Preijers, F.; Roos, D.; Wanten, G. Parenteral lipids modulate leukocyte phenotypes in whole blood, depending on their fatty acid composition. *Clin. Nutr.* **2005**, *24*, 822–829.
 266. Pedersen, L.R.; Olsen, R.H.; Anholm, C.; Astrup, A.; Eugen-Olsen, J.; Fenger, M.; Simonsen, L.; Walzem, R.L.; Haugaard, S.B.; Prescott, E. Effects of 1 year of exercise training versus combined exercise training and weight loss on body composition, low-grade inflammation and lipids in overweight patients with coronary artery disease: a randomized trial. *Cardiovasc. Diabetol.* **2019**, *18*.
 267. Petelin, A.; Bizjak, M.; Černelič-Bizjak, M.; Jurdana, M.; Jakus, T.; Jenko-Pražnikar, Z. Low-grade inflammation in overweight and obese adults is affected by weight loss program. *J. Endocrinol. Invest.* **2014**, *37*, 745–755.
 268. Fu, C.P.; Sheu, W.H.H.; Lee, I. Te; Lee, W.J.; Wang, J.S.; Liang, K.W.; Lee, W.L.; Lin, S.Y. Weight loss reduces serum monocyte chemoattractant protein-1 concentrations in association with improvements in renal injury in obese men with metabolic syndrome. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2015**, *53*, 623–629.
 269. Jung, S.H.; Park, H.S.; Kim, K.S.; Choi, W.H.; Ahn, C.W.; Kim, B.T.; Kim, S.M.; Lee, S.Y.; Ahn, S.M.; Kim, Y.K.; et al. Effect of weight loss on some serum cytokines in human obesity: increase in IL-10 after weight loss. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, *19*, 371–375.
 270. Cejvanovic, V.; Asferg, C.; Kjær, L.K.; Andersen, U.B.; Linneberg, A.; Frystyk, J.; Henriksen, T.; Flyvbjerg, A.; Christiansen, M.; Weimann, A.; et al. Markers of oxidative stress in obese men with and without hypertension. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2016**, *76*, 620–625.
 271. Carlsson, E.R.; Fenger, M.; Henriksen, T.; Kjaer, L.K.; Worm, D.; Hansen, D.L.; Madsbad, S.; Poulsen, H.E. Reduction of oxidative stress on DNA and RNA in obese patients after Roux-en-Y gastric bypass surgery-An observational cohort study of changes in urinary markers. *PLoS One* **2020**, *15*.
 272. Tang, A.; Tan, J.; Sun, M.; Hamilton, G.; Bydder, M.; Wolfson, T.; Gamst, A.C.; Middleton, M.; Brunt, E.M.; Loomba, R.; et al. Nonalcoholic fatty liver disease: MR imaging of liver proton density fat fraction to assess hepatic steatosis. *Radiology* **2013**, *267*, 422–431.
 273. Santilli, F.; Bardi, P.; Scapellato, C.; Bocchia, M.; Guazzi, G.; Terzuoli, L.; Tabucchi, A.; Silviotti, A.; Lucani, B.; Giofrè, W.R.; et al. Decreased plasma endogenous soluble RAGE, and enhanced adipokine secretion, oxidative stress and platelet/coagulative activation identify non-alcoholic fatty liver disease among patients with familial combined hyperlipidemia and/or metabolic syndrome. *Vascul. Pharmacol.* **2015**, *72*, 16–24.
 274. Świdarska, M.; Maciejczyk, M.; Zalewska, A.; Pogorzelska, J.; Flisiak, R.; Chabowski, A. Oxidative stress biomarkers in the serum and plasma of patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Can plasma AGE be a marker of NAFLD? Oxidative stress biomarkers in NAFLD patients. *Free Radic. Res.* **2019**, *53*, 841–850.
 275. Kühn, T.; Nonnenmacher, T.; Sookthai, D.; Schübel, R.; Quintana Pacheco, D.A.; von Stackelberg, O.; Graf, M.E.; Johnson, T.; Schlett, C.L.; Kirsten, R.; et al. Anthropometric

- and blood parameters for the prediction of NAFLD among overweight and obese adults. *BMC Gastroenterol.* **2018**, *18*, 113.
276. Tian, J.; Zhong, R.; Liu, C.; Tang, Y.; Gong, J.; Chang, J.; Lou, J.; Ke, J.; Li, J.; Zhang, Y.; et al. Association between bilirubin and risk of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease based on a prospective cohort study. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31006.
277. Chang, Y.; Ryu, S.; Zhang, Y.; Son, H.J.; Kim, J.-Y.; Cho, J.; Guallar, E. A Cohort Study of Serum Bilirubin Levels and Incident Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Middle Aged Korean Workers. *PLoS One* **2012**, *7*, e37241.
278. Tilg, H.; Moschen, A.R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: The multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **2010**, *52*, 1836–1846.
279. Videla, L.A.; Rodrigo, R.; Araya, J.; Poniachik, J. Oxidative stress and depletion of hepatic long-chain polyunsaturated fatty acids may contribute to nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37*, 1499–1507.
280. Köroğlu, E.; Canbakan, B.; Atay, K.; Hatemi, İ.; Tuncer, M.; Dobrucalı, A.; Sonsuz, A.; Gültepe, İ.; Şentürk, H. Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Turk J Gastroenterol* **2016**, *27*, 361–367.
281. Han, J.; Kaufman, R.J. The role of ER stress in lipid metabolism and lipotoxicity. *J. Lipid Res.* **2016**, *57*, 1329–1338.
282. Borradaile, N.M.; Han, X.; Harp, J.D.; Gale, S.E.; Ory, D.S.; Schaffer, J.E. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.* **2006**, *47*, 2726–2737.
283. Rong, X.; Albert, C.J.; Hong, C.; Duerr, M.A.; Chamberlain, B.T.; Tarling, E.J.; Ito, A.; Gao, J.; Wang, B.; Edwards, P.A.; et al. LXRs regulate ER stress and inflammation through dynamic modulation of membrane phospholipid composition. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 685–697.
284. Kumar, A.; Sharma, A.; Duseja, A.; Das, A.; Dhiman, R.K.; Chawla, Y.K.; Kohli, K.K.; Bhansali, A. Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) have Higher Oxidative Stress in Comparison to Chronic Viral Hepatitis. *J. Clin. Exp. Hepatol.* **2013**, *3*, 12–18.
285. Hendy, O.M.; Elsabaawy, M.M.; Aref, M.M.; Khalaf, F.M.; Moaty Oda, A.A.; El Shazly, H.M.; Khalaf, F.A. Evaluation of circulating zonulin as a potential marker in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Bull. Egypt. Soc. Physiol. Sci* **2016**, *36*, 20–29.
286. Feldstein, A.E.; Wieckowska, A.; Lopez, A.R.; Liu, Y.C.; Zein, N.N.; McCullough, A.J. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* **2009**, *50*, 1072–1078.
287. Wu, G.; Li, H.; Fang, Q.; Zhang, J.; Zhang, M.; Zhang, L.; Wu, L.; Hou, X.; Lu, J.; Bao, Y.; et al. Complementary Role of Fibroblast Growth Factor 21 and Cytokeratin 18 in Monitoring the Different Stages of Nonalcoholic Fatty Liver Disease article. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1-10.
288. Monserrat-Mesquida, M.; Quetglas-Llabrés, M.; Capó, X.; Bouzas, C.; Mateos, D.; Pons, A.; Tur, J.A.; Sureda, A. Metabolic syndrome is associated with oxidative stress and proinflammatory state. *Antioxidants* **2020**, *9*, 236.

289. Kawanaka, M.; Nishino, K.; Nakamura, J.; Urata, N.; Oka, T.; Goto, D.; Suehiro, M.; Kawamoto, H.; Yamada, G. Correlation between serum cytokeratin-18 and the progression or regression of non-alcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* **2015**, *14*, 837–844.
290. Pardo, M.; Crujeiras, A.B.; Amil, M.; Aguera, Z.; Jiménez-Murcia, S.; Baños, R.; Botella, C.; de la Torre, R.; Estivill, X.; Fagundo, A.B.; et al. Association of irisin with fat mass, resting energy expenditure, and daily activity in conditions of extreme body mass index. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, *2014*, 857270.
291. Shoukry, A.; Shalaby, S.M.; El-Arabi Bdeer, S.; Mahmoud, A.A.; Mousa, M.M.; Khalifa, A. Circulating serum irisin levels in obesity and type 2 diabetes mellitus. *IUBMB Life* **2016**, *68*, 544–556.
292. Woo, Y.C.; Xu, A.; Wang, Y.; Lam, K.S.L. Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: Clinical perspectives. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **2013**, *78*, 489–496.
293. Maratos-Flier, E. Fatty liver and FGF21 physiology. *Exp. Cell Res.* **2017**, *360*, 2–5.
294. Zarei, M.; Pizarro-Delgado, J.; Barroso, E.; Palomer, X.; Vázquez-Carrera, M. Targeting FGF21 for the Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Trends Pharmacol. Sci.* **2020**, *41*, 199–208.
295. Roeb, E.; Steffen, H.M.; Bantel, H.; Baumann, U.; Canbay, A.; Demir, M.; Drebber, U.; Geier, A.; Hampe, J.; Hellerbrand, C.; et al. [S2k Guideline non-alcoholic fatty liver disease]. *Z. Gastroenterol.* **2015**, *53*, 668–723.
296. Marchesini, G.; Day, C.P.; Dufour, J.F.; Canbay, A.; Nobili, V.; Ratziu, V.; Tilg, H.; Roden, M.; Gastaldelli, A.; Yki-Jarvinen, H.; et al. EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 1388–1402.
297. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Charlton, M.; Cusi, K.; Rinella, M.; Harrison, S.A.; Brunt, E.M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* **2018**, *67*, 328–357.
298. Fabbrini, E.; Mohammed, B.S.; Magkos, F.; Korenblat, K.M.; Patterson, B.W.; Klein, S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **2008**, *134*, 424–431.
299. Vanni, E.; Bugianesi, E.; Kotronen, A.; Minicis, D.S.; Yki-Järvinen, H.; Svegliati-Baroni, G. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? *Dig. Liver Dis.* **2010**, *42*, 320–330.
300. Williams, K.; Shackel, N.; Gorrell, M.; McLennan, S.; Twigg, S. Diabetes and nonalcoholic Fatty liver disease: a pathogenic duo. *Endocr. Rev.* **2013**, *34*, 84–129.
301. Westerbacka, J.; Cornér, A.; Tiikkainen, M.; Tamminen, M.; Vehkavaara, S.; Häkkinen, A.; Fredriksson, J.; Yki-Järvinen, H. Women and men have similar amounts of liver and intra-abdominal fat, despite more subcutaneous fat in women: implications for sex differences in markers of cardiovascular risk. *Diabetologia* **2004**, *47*, 1360–1369.
302. Gelli, C.; Tarocchi, M.; Abenavoli, L.; Di Renzo, L.; Galli, A.; De Lorenzo, A. Effect of a counseling-supported treatment with the Mediterranean diet and physical activity on the severity of the non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 3150–3162.

303. Izquierdo, M.C.; Lopes, S.; Teixeira, M.; Polónia, J.; Alves, A.J.; Mesquita-Bastos, J.; Ribeiro, F. The Chester step test is a valid tool to assess cardiorespiratory fitness in adults with hypertension: reducing the gap between clinical practice and fitness assessments. *Hypertens. Res.* **2019**, *42*, 2021–2024.
304. Kwak, M.-S.; Kim, D. Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. *Korean J. Intern. Med.* **2018**, *33*, 64–74.
305. Stine, J.G.; Soriano, C.; Schreibman, I.; Rivas, G.; Hummer, B.; Yoo, E.; Schmitz, K.; Sciamanna, C. Breaking Down Barriers to Physical Activity in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Dig. Dis. Sci.* **2021**, *66*, 3604–3611.
306. Farzanegi, P.; Dana, A.; Ebrahimipour, Z.; Asadi, M.; Azarbayjani, M.A. Mechanisms of beneficial effects of exercise training on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): Roles of oxidative stress and inflammation. *Eur. J. Sport Sci.* **2019**, *19*, 994–1003.
307. Heinecke, J.W. Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **1997**, *8*, 268–274.
308. Hu, J.; Ke, Y.; Wu, F.; Liu, S.; Ji, C.; Zhu, X.; Zhang, Y. Circulating Irisin Levels in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2020**, 2020.
309. Altaf, B.; Jawed, S.; Salam, R.M.T. Association of apoptotic marker cytokeratin18 with blood pressure in nonalcoholic fatty liver disease patients. *J. Pak. Med. Assoc.* **2020**, *70*, 2128–2131.
310. Safarian, M.; Mohammadpour, S.; Shafiee, M.; Ganji, A.; Soleimani, A.; Nematy, M.; Bahari, A. Effect of diet-induced weight loss on cytokeratin-18 levels in overweight and obese patients with liver fibrosis. *Diabetes Metab. Syndr.* **2019**, *13*, 989–994.
311. Kontogianni, M.D.; Tileli, N.; Margariti, A.; Georgoulis, M.; Deutsch, M.; Tiniakos, D.; Fragopoulou, E.; Zafiropoulou, R.; Manios, Y.; Papatheodoridis, G. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Clin. Nutr.* **2014**, *33*, 678–683.
312. Baratta, F.; Pastori, D.; Polimeni, L.; Bucci, T.; Ceci, F.; Calabrese, C.; Ernesti, I.; Pannitteri, G.; Violi, F.; Angelico, F.; et al. Adherence to Mediterranean Diet and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Effect on Insulin Resistance. *Am. J. Gastroenterol.* **2017**, *112*, 1832–1839.
313. De Pergola, G.; D’Alessandro, A. Influence of Mediterranean Diet on Blood Pressure. *Nutrients* **2018**, *10*.
314. Bouzas, C.; Bibiloni, M.D.M.; Julibert, A.; Ruiz-canela, M.; Salas-salvadó, J.; Corella, D.; Zomeño, M.D.; Romaguera, D.; Vioque, J.; Alonso-gómez, Á.M.; et al. Adherence to the Mediterranean Lifestyle and Desired Body Weight Loss in a Mediterranean Adult Population with Overweight: A PREDIMED-Plus Study. *Nutrients* **2020**, *12*, 1–21.
315. Celada Roldan, C.; Tarraga Marcos, M.L.; Madrona Marcos, F.; Solera Albero, J.; Salmeron Rios, R.; Celada Rodriguez, A.; Panisello Royo, J.M.; Tárraga López, P.J. Adhesion to the Mediterranean diet in diabetic patients with poor control. *Clin. Investig. Arterioscler.* **2019**, *31*, 210–217.
316. Díez-Espino, J.; Buil-Cosiales, P.; Serrano-Martínez, M.; Toledo, E.; Salas-Salvadó, J.; Martínez-González, M.Á. Adherence to the Mediterranean diet in patients with type 2

- diabetes mellitus and HbA1c level. *Ann. Nutr. Metab.* **2011**, *58*, 74–78.
317. Sanyal, D.; Mukherjee, P.; Raychaudhuri, M.; Ghosh, S.; Mukherjee, S.; Chowdhury, S. Profile of liver enzymes in non-alcoholic fatty liver disease in patients with impaired glucose tolerance and newly detected untreated type 2 diabetes. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2015**, *19*, 597–601.
 318. Katsagoni, C.N.; Papatheodoridis, G. V.; Ioannidou, P.; Deutsch, M.; Alexopoulou, A.; Papadopoulos, N.; Papageorgiou, M.V.; Fragopoulou, E.; Kontogianni, M.D. Improvements in clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease, after an intervention based on the Mediterranean lifestyle: a randomised controlled clinical trial. *Br. J. Nutr.* **2018**, *120*, 164–175.
 319. Gelli, C.; Tarocchi, M.; Abenavoli, L.; Di Renzo, L.; Galli, A.; De Lorenzo, A. Effect of a counseling-supported treatment with the Mediterranean diet and physical activity on the severity of the non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 3150–3162.
 320. Altaf, B.; Jawed, S.; Salam, R.M.T. Association of apoptotic marker cytokeratin18 with blood pressure in nonalcoholic fatty liver disease patients. *J. Pak. Med. Assoc.* **2020**, *70*, 2128–2131.
 321. Billingsley, H.E.; Carbone, S. The antioxidant potential of the Mediterranean diet in patients at high cardiovascular risk: an in-depth review of the PREDIMED. *Nutr. Diabetes* **2018**, *8*, 1-8.
 322. Saavedra, Y.; Mena, V.; Priken, K. Effect of the Mediterranean diet on histological indicators and imaging tests in non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterol. Hepatol.* **2021**.
 323. Coelho-Júnior, H.J.; Trichopoulou, A.; Panza, F. Cross-sectional and longitudinal associations between adherence to Mediterranean diet with physical performance and cognitive function in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *70*.
 324. Longhi, R.; Santos, A.S. e. A. de C.; López-Yerena, A.; Rodrigues, A.P.S.; de Oliveira, C.; Silveira, E.A. The Effectiveness of Extra Virgin Olive Oil and the Traditional Brazilian Diet in Reducing the Inflammatory Profile of Individuals with Severe Obesity: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients* **2021**, *13*.
 325. Dixon, J.B.; O'Brien, P.E. Obesity and the white blood cell count: changes with sustained weight loss. *Obes. Surg.* **2006**, *16*, 251–257.
 326. Gorska, P.; Gorna, I.; Przyslawski, J. Mediterranean diet and oxidative stress. *Nutr. FOOD Sci.* **2021**, *51*, 677–689.
 327. Chatzianagnostou, K.; Del Turco, S.; Pingitore, A.; Sabatino, L.; Vassalle, C. The Mediterranean Lifestyle as a Non-Pharmacological and Natural Antioxidant for Healthy Aging. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* **2015**, *4*, 719–736.
 328. Razquin, C.; Martinez, J.A.; Martinez-Gonzalez, M.A.; Mitjavila, M.T.; Estruch, R.; Marti, A. A 3 years follow-up of a Mediterranean diet rich in virgin olive oil is associated with high plasma antioxidant capacity and reduced body weight gain. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2009**, *63*, 1387–1393.

329. Bekkouche, L.; Bouchenak, M.; Malaisse, W.J.; Yahia, D.A. The Mediterranean diet adoption improves metabolic, oxidative, and inflammatory abnormalities in Algerian metabolic syndrome patients. *Horm. Metab. Res.* **2014**, *46*, 274–282.
330. Azzini, E.; Polito, A.; Fumagalli, A.; Intorre, F.; Venneria, E.; Durazzo, A.; Zaccaria, M.; Ciarapica, D.; Foddai, M.S.; Mauro, B.; et al. Mediterranean Diet Effect: an Italian picture. *Nutr. J.* **2011**, *10*.
331. Pulli, B.; Wojtkiewicz, G.; Iwamoto, Y.; Ali, M.; Zeller, M.W.; Bure, L.; Wang, C.; Choi, Y.; Masia, R.; Guimaraes, A.R.; et al. Molecular MR imaging of myeloperoxidase distinguishes steatosis from steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease. *Radiology* **2017**, *284*, 390–400.
332. Barden, A.; Shinde, S.; Tsai, I.J.; Croft, K.D.; Beilin, L.J.; Puddey, I.B.; Mori, T.A. Effect of weight loss on neutrophil resolvins in the metabolic syndrome. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* **2019**, *148*, 25–29.
333. Popov, S.S.; Kryl'skii, E.D.; Shulgin, K.K.; Raskina, E.A.; Popova, T.N.; Pashkov, A.N.; Kuptsova, G.N. Inflammation is associated with impairment of oxidative status, carbohydrate and lipid metabolism in type 2 diabetes complicated by non-alcoholic fatty liver disease. *Minerva Endocrinol.* **2022**.
334. Lee, H.; Lee, S.; Cho, I.-H.; Joong Lee, S. Toll-like receptors: sensor molecules for detecting damage to the nervous system. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2013**, *14*, 33–42.
335. Holland, W.L.; Bikman, B.T.; Wang, L.P.; Yuguang, G.; Sargent, K.M.; Bulchand, S.; Knotts, T.A.; Shui, G.; Clegg, D.J.; Wenk, M.R.; et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 1858–1870.
336. Vespasiani-Gentilucci, U.; Carotti, S.; Perrone, G.; Mazzairelli, C.; Galati, G.; Onetti-Muda, A.; Picardi, A.; Morini, S. Hepatic toll-like receptor 4 expression is associated with portal inflammation and fibrosis in patients with NAFLD. *Liver Int.* **2015**, *35*, 569–581.
337. Armandi, A.; Rosso, C.; Nicolosi, A.; Caviglia, G.P.; Abate, M.L.; Olivero, A.; D'amato, D.; Venero, M.; Gaggini, M.; Saracco, G.M.; et al. Crosstalk between Irisin Levels, Liver Fibrogenesis and Liver Damage in Non-Obese, Non-Diabetic Individuals with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*.