



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**  
**Departamento de Medicina**

**EFFECTO DE TRES MODELOS DE  
DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
UCP-2 EN TEJIDO ADIPOSO  
PERIFÉRICO Y MARCADORES DE  
OXIDACIÓN EN PACIENTES CON  
RESISTENCIA A LA INSULINA**



**MARÍA ESTHER SÁNCHEZ GARCÍA**

TITULO: EFECTO DE TRES MODELOS DE DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE  
UCP-2 EN TEJIDO ADIPOSO PERIFÉRICO Y MARCADORES DE  
OXIDACIÓN EN PACIENTES CON RESISTENCIA A LA INSULINA

AUTOR: MARÍA ESTHER SÁNCHEZ GARCÍA

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2008  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---

ISBN-13: 978-84-7801-914-4  
D.L.: CO-1480-2008

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**Departamento de Medicina**

**EFFECTO DE TRES MODELOS DE DIETA SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE UCP-2 EN TEJIDO ADIPOSEO  
PERIFÉRICO Y MARCADORES DE OXIDACIÓN EN  
PACIENTES CON RESISTENCIA A LA INSULINA**

Trabajo presentado por María Esther Sánchez García, licenciada en Medicina y Cirugía, para optar al grado de Doctor.

**Fdo: María Esther Sánchez García  
Córdoba, 15 de Mayo de 2008**





**TÍTULO DE LA TESIS:** EFECTO DE TRES MODELOS DE DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE UCP-2 EN TEJIDO ADIPOSO PERIFÉRICO Y MARCADORES DE OXIDACIÓN EN PACIENTES CON RESISTENCIA A LA INSULINA

**DOCTORANDO/A:** MARÍA ESTHER SÁNCHEZ GARCÍA

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

**D. JUAN ANTONIO PANIAGUA GONZÁLEZ Y D. FRANCISCO PÉREZ JIMÉNEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,**

**HACEN CONSTAR:**

Que el trabajo titulado “EFECTO DE TRES MODELOS DE DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE UCP-2 EN TEJIDO ADIPOSO PERIFÉRICO Y MARCADORES DE OXIDACIÓN EN PACIENTES CON RESISTENCIA A LA INSULINA” ha sido realizado por D<sup>a</sup> María Esther Sánchez García bajo nuestra dirección, en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

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

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

Córdoba, 15 de Mayo de 2008

Firma del/de los director/es

Fdo.: Dr. Juan Antonio Paniagua González

Fdo.: Dr. Prof. Francisco Pérez Jiménez



## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho de este trabajo una realidad.

A los **doctores D. Juan Antonio Paniagua González y al Prof. D. Francisco Pérez Jiménez**, directores ejemplares de esta tesis sin los que habría sido imposible su realización. Ambos han sido ejemplo de disciplina, conocimiento, inquietud científica y un gran apoyo tanto personal como científico en los momentos difíciles.

Al **Prof. Dr. D. José López Miranda**, quien me brindó la oportunidad de iniciarme en el campo de la investigación y sin el cual no habría sido posible la realización de este trabajo.

A la **doctora D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Ángeles Blanco Molina**, maestra, compañera y amiga, siempre dispuesta a ayudar. Sin su apoyo incondicional tanto durante el periodo de la residencia como posteriormente, este proyecto posiblemente habría fracasado.

A los **doctores D. Rafael Ángel Fernández de la Puebla, D. Francisco José Fuentes Jiménez, D. Manuel Martín, D. Rafael Martínez, D. Jose Luis Ogea, y D. Juan Ruano, así como al resto de miembros de la Unidad de Medicina Interna y compañeros de residencia**, maestros que me enseñaron no sólo a practicar la Medicina sino un nuevo modo de entenderla como profesión y forma de vida.

A la **doctora D<sup>a</sup> Carmen Marín**, la paciencia y el cariño personificados, que tantas veces me ha ayudado en nuestro proyecto, guiándonos en el laboratorio con su experiencia.

A la **doctora D<sup>a</sup> Inmaculada Romero**, sin la que este trabajo no habría sido posible. Con su tensión y su esfuerzo ha desarrollado gran parte del trabajo de laboratorio siendo una maestra ejemplar, rigurosa, eficiente y amable y, por supuesto, una amiga.

A **M<sup>a</sup> José, Yolanda, Purificación, Juan y Rafael**, compañeros en el laboratorio y fuera de él, que nos han dedicado su tiempo a enseñarnos sin esperar nada a cambio.

A **M<sup>a</sup> Jose Moyano**, ejecutora de todas las determinaciones bioquímicas del estudio.

Al **Instituto de la Grasa**, que ha participado en la realización de parte del trabajo de laboratorio.

A los **participantes** de este estudio, sin las cuales habría sido imposible su realización. Gracias a ellos no sólo se ha materializado, sino que compartimos momentos inolvidables durante el tiempo que estuvimos trabajando en él.

A **Ángel**, ante todo compañero, amigo y confidente, mano que me ha impulsado en los momentos difíciles y siempre dispuesto a mostrar su mejor sonrisa. Gracias por todo, compañero.

**A mis amigos**, especialmente a Cristina, Mamen e Ignacio.

**A mi familia**

**A Kique**

**A mis padres y hermana**, que han estado siempre e incondicionalmente a mi lado, apoyándome y compartiendo conmigo tanto los momentos difíciles como los éxitos, ejemplo a seguir en todos los aspectos. Gracias por vuestra ayuda y vuestros sabios consejos. En gran medida, esta tesis también es vuestra.

**A todos, GRACIAS**



# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	<b>11</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>1. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA DIABETES Y LA OBESIDAD</b> .....	<b>13</b>
<b>2. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA</b> .....	<b>15</b>
2.1. El aceite de oliva: composición y efectos biológicos .....	15
2.2. Tipos de grasas de la dieta .....	20
<b>3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL</b> .....	<b>21</b>
3.1. Metabolismo y control de la producción energética. Producción de especies reactivas del oxígeno y de nitrógeno en la mitocondria .....	21
3.2. Disfunción mitocondrial, ácidos grasos intracelulares y resistencia a la insulina .....	23
3.3. Proteínas desacoplantes .....	26
<b>4. EL ENDOTELIO VASCULAR Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL</b> .....	<b>34</b>
4.1. Activación endotelial .....	35
4.2. Disfunción endotelial .....	36
4.3. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial .....	37
<b>5. ESTRÉS OXIDATIVO</b> .....	<b>37</b>
5.1. Vía del factor NF- $\kappa$ B .....	39
5.2. Vía del JNK/SAPK .....	39
5.3. Vía de la hexosamina .....	40
5.4. Estrés oxidativo, glucotoxicidad y disfunción endotelial .....	42
<b>6. LA DISLIPEMIA DIABÉTICA</b> .....	<b>43</b>
6.1. Cambios específicos en la composición de las lipoproteínas en la diabetes tipo 2 .....	43
6.2. Efectos específicos de cada una de las lipoproteínas sobre la función endotelial .....	44
6.3. Metabolización postprandial de triglicéridos como posible mediadora de la aparición de resistencia insulínica y estrés oxidativo .....	46
<b>III. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	<b>49</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>51</b>
<b>V. DISEÑO Y METODOLOGÍA</b> .....	<b>53</b>
<b>1. POBLACIÓN</b> .....	<b>53</b>
1.1. Proceso de selección de los participantes .....	53
1.2. Criterios de inclusión .....	54

1.3. Criterios de exclusión .....	55
1.4. Cálculo del tamaño muestral .....	55
<b>2. DISEÑO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>55</b>
<b>3. CALORIMETRÍA INDIRECTA .....</b>	<b>57</b>
<b>4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS .....</b>	<b>58</b>
4.1. Extracciones sanguíneas.....	58
4.2. Determinaciones bioquímicas básicas .....	58
4.3. Determinación de los ácidos grasos plasmáticos.....	59
4.4. Cuantificación de las partículas de LDL oxidada.....	59
4.5. Cuantificación de Nitrotirosina .....	60
<b>5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN EL TEJIDO ADIPOSO PERIFÉRICO .....</b>	<b>60</b>
<b>6. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL .....</b>	<b>61</b>
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....</b>	<b>62</b>
<b>8. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>62</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
<b>1. CARACTERÍSTICAS BASALES.....</b>	<b>63</b>
<b>2. RESULTADOS DE LA INTERVENCIÓN DIETÉTICA.....</b>	<b>64</b>
2.1. Gasto energético, ingesta dietética y peso corporal.....	64
2.2. Calorimetría indirecta tras la intervención dietética .....	65
2.3. Composición en ácidos grasos de los ésteres de colesterol .....	65
2.4. Resultados de la intervención dietética sobre el metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono.....	67
<b>3. EXPRESIÓN POSTPRANDIAL DE UCP2 EN TEJIDO GRASO PERIFÉRICO .....</b>	<b>70</b>
<b>4. VASODILATACIÓN MICROVASCULAR POSTIQUEMIA.....</b>	<b>72</b>
<b>5. NITROTIROSINA .....</b>	<b>73</b>
<b>6. LDL OXIDADA.....</b>	<b>75</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>IX. ABREVIATURAS .....</b>	<b>91</b>

## I. RESUMEN

**Introducción:** La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cursa con aterosclerosis acelerada. Los fenómenos involucrados en este proceso no están completamente establecidos.

**Hipótesis de trabajo:** La ingesta de una dieta mediterránea puede inducir un menor grado de estrés oxidativo asociados a una disminución en la expresión postprandial del sistema de la proteína desacoplante tipo 2 (UCP2).

**Objetivo principal:** Estudiar en pacientes obesos con resistencia a la insulina el efecto de tres modelos de dietas isocalóricas sobre la expresión génica de UCP2 en el tejido adiposo periférico en el estado postprandial.

**Objetivos secundarios:** Determinar el efecto basal y postprandial de cada modelo de alimentación sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo, el perfil lipídico e hidrocarbonado y la función endotelial microvascular.

**Población, diseño y metodología:** Participaron once voluntarios con resistencia a la insulina y obesidad central y antecedentes familiares de DM2. Los sujetos realizaron tres dietas isocalóricas de 28 días: una rica en grasa saturada (SAT), una rica en grasa monoinsaturada (MONO) y otra rica en hidratos de carbono (HC). Al final de cada periodo, tras un desayuno de sobrecarga, se determinó la expresión postprandial de UCP2 en el tejido adiposo periférico, la vasodilatación dependiente del endotelio (VDE) basal y tras 150 minutos de la ingesta. Además, se midieron los niveles del perfil lipídico, LDL oxidada (LDL-ox) y nitrotirosina (NT) tanto en situación basal como postprandial.

**Resultados:** La expresión postprandial de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de UCP2 en el tejido adiposo periférico era mayor tras la dieta rica en HC. Las concentraciones postprandiales de glucosa e insulina incrementaron tras la comida alta en HC mientras que los ácidos grasos libres (AGLs) aumentaron tras las dietas altas en grasas. Los niveles de colesterol total, triglicéridos y colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) no cambiaron durante las tres fases de dieta; mientras que el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) disminuyó tras la dieta alta en HC. La concentración postprandial de LDL-ox disminuyó tras la ingestión de la dieta MONO, y los niveles séricos de NT incrementaron tras la ingesta de una dieta rica en HC. La VDE postprandial medida con láser-doppler fue mayor tras el consumo agudo de una dieta rica en aceite de oliva.

**Conclusiones:** En personas con sobrepeso y resistencia a la insulina, la ingesta aguda de un desayuno rico en aceite de oliva virgen se asocia a una menor expresión postprandial de UCP2 en el tejido adiposo periférico, mayores niveles de HDL y menores de LDL-ox y NT y una mejoría de la VDE.

**Conflicto de intereses:** Este trabajo carece de conflicto de intereses con ninguna compañía u organización que haya colaborado en la investigación. Ha sido financiada con las becas concedidas por la Secretaría General de Calidad y Eficiencia, Junta de Andalucía, Exp. 78/02, 240/04 y 462/06, el CIBER 6/03/0047, la Fundación Española de Aterosclerosis (Beca Astra Zeneca 2003), la Fundación Avenzoar de Sevilla (2004) y la Fundación del Colegio de Médicos de Córdoba (2004).



## II. INTRODUCCIÓN

### **1. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA DIABETES Y LA OBESIDAD**

La DM2 es una enfermedad multifactorial que cursa con hiperglucemia y diversas alteraciones metabólicas, constituyendo una causa principal de morbimortalidad en los países occidentales. En estos países, la incidencia continúa incrementándose por lo que está alcanzando cifras endémicas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que el número aproximado de casos de diabetes para el año 2.030 será de 366 millones en el mundo de los que casi 48 millones corresponderán a Europa y unos 3,75 millones pertenecerán a nuestro país. Si nos situamos en el año 2.002, la prevalencia total de diabéticos menores de 20 años en Estados Unidos (EEUU) fue de 210.000, que supone un 0,26% de la población en este grupo etario, aumentando a un 8,7% en sujetos de entre 20 y 60 años y a un 18,3% en aquellos mayores de 60 años. Si se realiza un análisis en función de las características raciales, se aprecia una mayor incidencia entre los indios americanos, nativos de Alaska y Hawai, asiáticos y personas de raza negra no hispanos.

La importancia de estos datos epidemiológicos radica en la mayor morbimortalidad de los pacientes diabéticos frente a aquellos que no lo son. De este modo, en el año 2.000, la diabetes supuso la sexta causa de muerte de la población, estimándose que existe el doble de riesgo de muerte entre los pacientes diabéticos. Si analizamos los datos de este mismo año en EEUU con respecto a la morbilidad, encontramos que el riesgo de morir por un evento cardíaco o un ictus es de 2-4 veces mayor entre los sujetos diabéticos y que estos presentan altas tasas de complicaciones como ceguera, neuropatía, coexistencia de hipertensión arterial (HTA), amputaciones, complicaciones durante el embarazo, etc.<sup>1</sup>

En cuanto a la incidencia de la enfermedad destaca el incremento del número de nuevos casos de diabetes tipo 2 en niños, por lo que está siendo objeto de activa investigación en los últimos años. Datos epidemiológicos aportados por la Universidad de Chicago, a partir de una base de datos realizada desde 1985, encontraron que se está produciendo un aumento en el diagnóstico de diabetes mellitus no tipo 1 en niños y que es más frecuente en niños obesos, de raza negra no hispanos y con antecedentes familiares de primer grado de diabetes<sup>2</sup>. En otro trabajo se relaciona la obesidad con la resistencia insulínica e incluso se llega a plantear la necesidad de un método de cribaje en niños obesos con pruebas de tolerancia oral a la glucosa<sup>3</sup>. Por estos motivos, se han intentado establecer una serie de marcadores y/o de factores de riesgo pronósticos para el desarrollo de DM2 de forma precoz como los descritos por Gungor y colaboradores, que proponen como posibles marcadores la obesidad, la existencia de antecedentes familiares de DM2, el pertenecer a minorías étnicas, el padecer un síndrome de ovario poliquístico o presentar acantosis

nigricans y tener antecedentes maternos de DM2 o de diabetes gestacional<sup>4</sup>. Todos estos hallazgos unidos a la existencia de altas tasas de agregación en una misma familia, supone que el tratamiento de la DM2 en jóvenes debe afrontarse desde el núcleo familiar, acordando un cambio en el estilo de vida de la familia de forma mantenida<sup>5</sup>. La agregación familiar ha sido estudiada en múltiples trabajos, y parece estar debida a un desequilibrio entre la sensibilidad y la secreción insulínica con una heredabilidad estimada del 70%<sup>6</sup>, que se pone de manifiesto de forma precoz en sujetos con historia familiar de DM2, fundamentalmente desde la pubertad.

En estados de prediabetes, como la intolerancia a la glucosa, se duplica el riesgo de desarrollar arteriosclerosis, mientras que los diabéticos tienen un riesgo de tres a cuatro veces superior al de la población normal<sup>7</sup>, como se ha observado en el estudio Framingham, a finales de los años 70<sup>8</sup>.

Cuando se inicia la resistencia insulínica, se produce un incremento de la secreción de insulina compensatorio con el fin de mantener las cifras de glucemia plasmática dentro de los límites de normalidad. Esta situación perpetúa la tolerancia a la glucosa durante un periodo de tiempo a través de la compensación de la célula  $\beta$  pero, en un porcentaje de casos, este mecanismo compensatorio falla provocando un aumento de la concentración de glucosa en el plasma, que conlleva la aparición de diabetes<sup>9</sup>.

Si la hiperinsulinemia es un factor independiente que incrementa el riesgo cardiovascular en personas no diabéticas no se conoce suficientemente, pero suele predecir la aparición de DM2 y cursa con una típica alteración del perfil lipídico con elevadas concentraciones de colesterol vehiculado por lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL pequeñas y densas<sup>10</sup>, un descenso de los niveles de HDL<sup>11</sup> e HTA<sup>12</sup>. El síndrome de resistencia a la insulina, descrito como síndrome X por Reaven en 1988, se caracteriza por una serie de alteraciones metabólicas y hemostáticas entre las que se incluyen una alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, HTA, dislipemia, la existencia de un estado protrombótico-hipofibrinolítico, estrés oxidativo y disfunción endotelial<sup>13, 14</sup>.

Sin embargo, en los estadios más precoces de la resistencia a la insulina se evidencia una disfunción endotelial que finalmente evolucionará a una arteriosclerosis franca generalizada<sup>15</sup> responsable de la aparición de la macroangiopatía diabética con afectación vascular coronaria, cerebrovascular y periférica causantes de la morbimortalidad cardiovascular de los pacientes diabéticos<sup>16</sup>. Pero la resistencia a la insulina está íntimamente relacionada con la obesidad<sup>17</sup>. Igualmente, se ha demostrado que la obesidad se asocia de forma independiente a la existencia de una alteración de la función endotelial y a un engrosamiento de la pared vascular<sup>18, 19</sup>. Este hallazgo ha provocado el desarrollo de diferentes estudios, entre los que destaca el realizado por Woo y colaboradores<sup>20</sup>, en el que se estudia la reversibilidad de estas alteraciones tras someter a pacientes obesos o con sobrepeso a una modificación de su dieta habitual, acompañada o no de

ejercicio físico observando que la disfunción endotelial asociada a la obesidad revierte parcialmente tras un período de 6 semanas de dieta, mejorando aún más si ésta se acompaña de ejercicio de forma mantenida. Estos parámetros llegan casi a normalizarse cuando el periodo de intervención se prolonga durante 1 año, incluyendo la VDE y el grosor íntima-media (GIM). Por lo tanto, las medidas de educación sanitaria promoviendo hábitos de vida saludables puede conllevar beneficios clínicos disminuyendo el riesgo de futuros eventos cardiovasculares<sup>21</sup>.

## **2. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LA DIETA MEDITERRÁNEA**

Las enfermedades degenerativas crónicas, también llamadas por la OMS enfermedades no transmisibles y relacionadas con los hábitos dietéticos y nutricionales están aumentando su incidencia en el mundo debido al proceso de globalización al que estamos sometidos en los últimos años. Este hecho conlleva la adquisición de nuevos hábitos higiénico-dietéticos, adoptando una alimentación caracterizada por un aumento del consumo de grasa SAT, que generalmente se acompaña de una menor ingesta de fibra, frutas y verduras, una reducción en la actividad física y un incremento del consumo de tabaco que, finalmente, llevan al desarrollo de sobrepeso y obesidad. La consecuencia de este proceso son una mayor prevalencia de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta como la DM2, enfermedades cardiovasculares, la HTA, los accidentes vasculares cerebrales y determinados cánceres.

Los datos de prevalencia de estas enfermedades secundarias a los cambios dietéticos, previsible para el año 2020, son poco halagüeños, calculándose que estarán involucradas en casi el 75% de las muertes y en el 71%, 75% y 70% de las muertes por cardiopatía isquémica, ictus y diabetes respectivamente<sup>22</sup>. Es más, el Proyecto Eurodiet puso de manifiesto que, en los países del sur de Europa en los que clásicamente se consumía una dieta mediterránea rica en aceite de oliva, el porcentaje de grasas SAT ingerido era superponible al de los países nórdicos<sup>23</sup>. Por este motivo, en la mayoría de los países europeos se están realizando recomendaciones sobre la reducción del consumo de grasas, fundamentalmente de las saturadas, ya que éstas se han asociado clásicamente con desarrollo de obesidad, resistencia insulínica e hiperinsulinemia<sup>24</sup>.

### **2.1. El aceite de oliva: composición y efectos biológicos**

El conocimiento de las cualidades saludables del consumo de aceite de oliva, dentro de una dieta mediterránea, eran conocidas ya desde la antigua Grecia y tuvieron gran repercusión en la medicina árabe. Sin embargo, no ha sido hasta el siglo XX cuando todas estas ideas han comenzado a tener una base científica<sup>25</sup>. En la última década ha crecido el interés por la dieta mediterránea debido al conocimiento de sus efectos beneficiosos, no sólo desde el punto de vista cardiovascular, sino también a otros niveles. Además, al ser una dieta con un alto contenido en

grasas le aporta un interés gastronómico especial, al aumentar su palatabilidad, explicando de este modo su gran difusión y aceptación. Su característica fundamental radica en que la mayor parte de su contenido graso procede del aceite de oliva, rico en MONO, especialmente ácido oleico. El aceite de oliva está compuesto de dos fracciones fundamentales, desde el punto de vista cuantitativo. La mayor parte la constituyen los compuestos saponificables glicéricos, como los triglicéridos (TG) que constituyen el 98-99%. Entre ellos destaca la abundancia de ácido oléico que constituye del 60-84% del total de ácidos grasos de los TG, mientras que el ácido linoleico sólo supone del 3-21% de su composición. Pero de forma añadida, el aceite de oliva posee una serie de microcomponentes no grasos que representan del 1-2% y, que le aportan un gran interés biológico del que carecen el resto de aceites vegetales, con composición grasa similar, como el de girasol, soja y colza. Entre estos micronutrientes cabe destacar los hidrocarburos (escualeno, carotenoides y clorofila), los tocoferoles (alfa, beta y gamma tocoferol), los aromatizantes, los estenoles y esteroides y los compuestos fenólicos. Estos últimos pueden ser ácidos fenólicos simples (hidroxitirosol, tirosol, cafeico, cumárico, gálico y vainílico), secoiroides (oleuropeína y ligstrósido), flavonoides (apigenina, luteolina) y lignanos (pinoresinol y 1-acetopinoresinol).

El primer estudio multicéntrico, realizado para establecer las posibles consecuencias de la ingesta de diferentes dietas, fue el estudio de los Siete Países. En él se siguieron 11579 varones sanos en siete países durante 15 años y se demostró que la mortalidad total estaba íntimamente relacionada con la ingesta de grasa SAT e inversamente con la toma de grasa MONO, sin encontrarse relación con la toma de ácidos grasos poliinsaturados (POLI), proteínas, HC ni alcohol. Además, establecieron que existía una íntima relación entre el consumo de grasa SAT, las cifras plasmáticas de colesterol y el riesgo de padecer una enfermedad coronaria<sup>26</sup>. De forma inversa, la ingesta mantenida de MONO, fundamentalmente aportados en forma de aceite de oliva, ha demostrado ser muy beneficiosa. Tras este primer trabajo se han llevado a cabo otros entre los que se destacan el Lyon Diet Heart Study<sup>27</sup> que demostró por primera vez los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea en pacientes que habían sufrido un infarto agudo de miocardio y los realizados por Trichopoulos y colaboradores<sup>28-30</sup> que han demostrado en población general y en pacientes postinfartados una reducción en la mortalidad tanto por enfermedad coronaria como por cáncer en personas que consumían de forma mantenida una dieta mediterránea.

### **Efectos del aceite de oliva sobre los factores de riesgo cardiovascular**

Los efectos saludables del consumo del aceite de oliva son múltiples y afectan a varios mecanismos de vital importancia en el área cardiovascular, además de la mejoría del control lipídico y otros factores metabólicos<sup>31</sup>. La ingesta de una dieta mediterránea, basada en el aceite

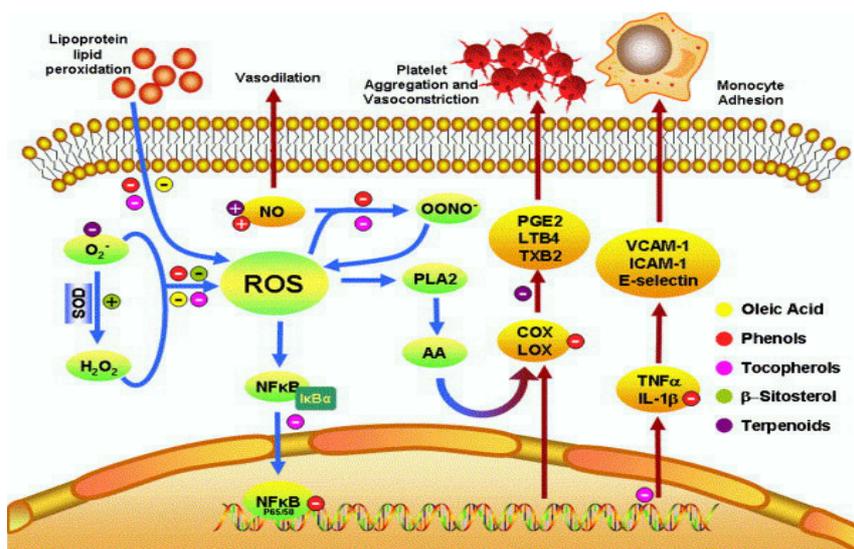
de oliva, mejora el metabolismo lipoproteico postprandial al inducir cifras más bajas de triglicéridos y de LDL y más elevadas de HDL<sup>32, 33</sup>. Este efecto es patente tanto al comparar el consumo de una dieta rica en MONO frente a una pobre en grasa y con alto contenido en HC como al compararlo frente a una dieta alta en grasa SAT<sup>34</sup>. Este hecho es característico de las grasas MONO, no siendo exclusivo del aceite de oliva sino de todos los aceites ricos en ácido oleico<sup>35</sup>. Además, se sabe que la lipemia postprandial depende, en gran medida, del tipo de grasa ingerida. De este modo, el consumo de una dieta rica en aceite de oliva genera la síntesis de quilomicrones de mayor tamaño<sup>36</sup> que entran más rápidamente a la circulación y que, por tanto, son aclarados con mayor rapidez. Esta característica supondría un menor potencial aterogénico para este tipo de grasas<sup>37</sup>. Pero además, el aceite de oliva virgen parece poseer beneficios añadidos mediados por los micronutrientes que incorpora, fundamentalmente los polifenoles. Estos compuestos podrían reducir de forma adicional la actividad de la hidroximetilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, modificando los parámetros lipídicos plasmáticos, por lo que se apunta como una nueva diana terapéutica hipolipemiente<sup>38</sup>.

La dieta mediterránea ha mostrado ser eficaz en la disminución de la presión arterial, tanto en sujetos sanos como hipertensos, al compararla con dietas ricas en SAT y pobres en grasas<sup>39</sup>. Este efecto también se ha observado en enfermos con síndrome metabólico, en los que se comprobó una reducción mantenida de las cifras de presión arterial sistólica y diastólica tras consumir una dieta mediterránea<sup>40, 41</sup>. La duda que se plantea es si este efecto beneficioso sobre la tensión arterial es tan sólo atribuible a la grasa MONO, es decir, al consumo de ácido oleico, o del aceite de oliva virgen por su acción a través de los micronutrientes que contiene. Tras varios trabajos con resultados discordantes, un estudio llevado a cabo con 40 pacientes con cardiopatía isquémica estable, a los que se les administraba aceite de oliva con distinta cantidad de componentes fenólicos, ha demostrado que el consumo de aceite de oliva virgen, alto en polifenoles, disminuye la presión arterial sistólica y los parámetros oxidativos<sup>41</sup>. Al evaluar la respuesta de pacientes con DM2, otro de los factores de riesgo cardiovascular clásico, al consumir una dieta rica en MONO, los resultados no son concluyentes no confirmándose siempre diferencias en el control glucémico ni en el perfil lipídico de pacientes con DM2 o con alto riesgo para desarrollarla<sup>42, 43</sup>. Los resultados de nuestro grupo sugieren un mejor control glucémico en sujetos sanos tras el consumo de una dieta de tipo mediterránea<sup>39, 44</sup>. Además, en el estudio realizado por Vessby y colaboradores, se observó como al sustituir los ácidos grasos saturados de la dieta por MONO mejora la sensibilidad insulínica en personas sanas<sup>45</sup>. En personas con resistencia a la insulina, el consumo de una dieta isocalórica rica en MONO frente a una con un alto contenido en HC y otra rica en SAT incrementa la captación periférica de glucosa mejorando la respuesta a la insulina<sup>46</sup>. Por tanto, se acepta que el consumo de grasa SAT incrementa la resistencia a la insulina mientras

que la ingesta de grasa MONO aumenta la sensibilidad a la insulina, siendo este efecto dependiente del grado de sensibilidad o resistencia insulínica de la persona<sup>47</sup>.

## El aceite de oliva y el fenómeno arteriosclerótico: efecto sobre la función endotelial y el estrés oxidativo

El aceite de oliva virgen podría participar en la modulación de distintas vías implicadas en el desarrollo del fenómeno arteriosclerótico. La ingesta de una dieta de alta energía genera un ambiente inflamatorio asociada a una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (EROs). Éstas, a través de la activación del complemento, favorecen el desarrollo de disfunción endotelial, la adhesión de leucocitos al endotelio y su internalización a través de la capa endotelial hasta el espacio subendotelial iniciando, de este modo, el desarrollo de la arteriosclerosis<sup>48</sup>. Sin embargo, las grasas MONO parecen tener un efecto antioxidante, protegiendo a las células endoteliales de estos fenómenos. De forma directa, protege de la oxidación a las moléculas de LDL<sup>49</sup> y el aceite de oliva, a través de sus micronutrientes, fundamentalmente los compuestos fenólicos, atenúan el ambiente prooxidativo fundamentalmente durante la fase postprandial<sup>50, 51</sup>. Además, parecen mejorar fenómenos inflamatorios como la migración de linfocitos y macrófagos mediada por citoquinas, reducir la expresión de moléculas de adhesión y mejoran la VDE<sup>52</sup>. Así mismo, aumentan la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y modifican la activación de genes implicados en la inflamación mediados, probablemente, a través del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) u otros factores de transcripción. Además, la ingesta de aceite de oliva genera un ambiente antitrombótico disminuyendo la agregación plaquetaria y las concentraciones plasmáticas de factor de von Willenbrand, plasminógeno, factor VII<sup>53, 54</sup>, factor tisular y factor inhibidor de la activación del plasminógeno (PAI-1)<sup>55</sup>.



## **Figura 1.** Modelo de los mecanismos de acción del ácido oléico y de los micronutrientes del aceite de oliva virgen.

O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anión supeóxido; SOD, ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de hidrógeno, NO, óxido nítrico; ROS, Especies reactivas de oxígeno; NFκB, factor nuclear κB; IκBα, subunidad inhibidora κB; OONO<sup>-</sup>, peroxinitrito; PLA<sub>2</sub>, fosfolipasa A<sub>2</sub>; AA, ácido araquidónico; PGE<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub>; LTB<sub>4</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub>; TXB<sub>2</sub>, tromboxano B<sub>2</sub>; COX, ciclooxigenasa; LOX, 5-lipooxigenasa; VCAM-1, molécula de adhesión vascular celular; ICAM-1, molécula de adhesión intracelular; TNFα, factor de necrosis tumoral α, IL-1β, interleukina 1β.

Imagen tomada de Perona, JS, Cabello-Moruno, R and Ruiz-Gutierrez, V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem* 2006;17:429-45.

El ser humano se encuentra en un estado postabsortivo la mayor parte de su vida, de ahí el interés que despierta el estudio de los fenómenos que acontecen en este periodo y su papel en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares<sup>55</sup>. Con esta finalidad, se han realizado múltiples estudios, centrados fundamentalmente en el efecto a corto plazo de la ingesta de una dieta grasa sobre el árbol vascular periférico. El problema es que los resultados obtenidos a este respecto son dispares. De este modo, si analizamos los datos obtenidos por Raitakari y colaboradores<sup>56</sup>, concordantes con otros autores, apoyan la hipótesis de que la ingesta de una dieta grasa, independientemente de su composición lipídica, no conlleva alteraciones de la VDE en sujetos sanos. En contraposición, otros investigadores, defienden el deterioro agudo de la función endotelial tras una ingesta grasa, secundaria a la hipertrigliceridemia que se produce<sup>57, 58</sup> observándose, incluso, un aumento postprandial de los neutrófilos y de determinadas citoquinas proinflamatorias circulantes como la interleukina 8 (IL-8) que podría explicar, al menos parcialmente, el efecto proinflamatorio de la ingesta grasa.

Por tanto, sería lógico pensar que la ingesta prolongada de una dieta pobre en grasas SAT y basada en el consumo de hidratos de carbono complejos, aceite de oliva, frutas, verduras y fibra, se asociaría a una reducción de los niveles postprandiales de AGLs, una menor resistencia insulínica y una disminución de las cifras de LDL, mejorando así la VDE<sup>59</sup>.

## **Otros efectos beneficiosos del aceite de oliva**

Los efectos beneficiosos del aceite de oliva traspasan el ámbito cardiovascular, pudiendo estar relacionados con el envejecimiento al preservar la función mitocondrial y su cadena de electrones, reduciendo la producción de radicales libres y de este modo, protegiendo al ácido desoxirribonucleico (ADN) de la oxidación<sup>60</sup>. Además, previene la aparición y el desarrollo de los cánceres asociados al estilo de vida, fundamentalmente los de origen gastrointestinal y hormono-dependientes, como el cáncer de mama y de próstata, al prevenir la oxidación del ADN por las EROs, evitar la aparición de cambios en las membranas celulares y modular la expresión génica<sup>61, 62</sup>. Igualmente, se ha comprobado que algunos de los componentes menores del aceite de oliva, como el escualeno, el α-tocoferol, los carotenoides, algunos esteroides, el eritrodilol y el ácido oleico y los componentes fenólicos, poseen efectos beneficiosos al presentar propiedades antioxidantes, actividad quimioprotectora y capacidad de mejorar la función

endotelial, al disminuir la expresión de moléculas de adhesión e incrementar la biodisponibilidad de NO y el aclaramiento de radicales libres intracelulares<sup>50</sup>.

## 2.2. Tipos de grasas de la dieta

Los lípidos alimentarios están constituidos por múltiples compuestos químicos diferentes, que comparten la insolubilidad en agua y la solubilidad en disolventes orgánicos. La ingesta de grasas en la dieta se realiza fundamentalmente en forma de triglicéridos, que son ésteres de glicerol con ácidos grasos. Otros compuestos lipídicos alimentarios son los lípidos complejos (glicerolípidos y esfingolípidos), cuya función no es sólo energética, sino que constituyen las membranas biológicas, modulan su actividad y originan los eicosanoides. Por último, la tercera forma de grasa dietética es el colesterol, que además de formar parte de las membranas celulares, es el precursor de las hormonas esteroideas, ácidos biliares y vitamina D. Los ácidos grasos son los constituyentes de los triglicéridos y de los lípidos complejos y pueden esterificar también el colesterol. Éstos se clasifican en función de la longitud de su cadena (corta 4-6 carbonos; media 8-12 carbonos; larga 14-20 carbonos; muy larga  $\geq 22$  carbonos), del grado de saturación, es decir, de la presencia de dobles enlaces (sin dobles enlaces: SAT; un solo enlace: MONO o monoenoicos; más dobles enlaces: POLI o polienoicos) y de la disposición espacial de los hidrógenos (simple: trans; dobles enlaces: cis generalmente).

**Tabla 1.** Tipos de ácidos grasos en la dieta y alimentos de los que proceden

TIPO DE ÁCIDOS GRASOS	SAT	MONO	POLI
<b>ÁCIDOS GRASOS IMPLICADOS</b> (Nombre común)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Butírico (4:0)</li> <li>- Caproico (6:0)</li> <li>- Caprílico (8:0)</li> <li>- Capricho (10:0)</li> <li>- Láurico (12:0)</li> <li>- Mirístico* (14:0)</li> <li>- Palmítico* (16:0)</li> <li>- Esteárico (18:0)</li> <li>- Araquídico (20:0)</li> <li>- Behénico (22:0)</li> <li>- Lignocérico (24:0)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Palmitoleico (16:1)</li> <li>- Oleico (18:1; cis)\$</li> <li>- Elaídico (18:1; trans)</li> <li>- Gadoleico (20:1; 9cis)</li> <li>- Gondoico (20:1; 11cis)</li> <li>- Erúcico (22:1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\omega</math>-6:</li> <li>Linoleico (18:2)\$<math>\diamond</math></li> <li><math>\gamma</math>-linolénico (18:3)</li> <li>Dihomo- <math>\gamma</math>-linolénico (20:3)</li> <li>Araquidónico (20:4) <math>\diamond</math></li> <li>Adrénico (22:4)</li> <li>Osmond (22:5)</li> <li>- <math>\omega</math>-3:</li> <li><math>\alpha</math>-linolénico (18:3)\$<math>\diamond</math></li> <li>Estearidónico (18:4)</li> <li>Timnodónico (eicosapentanóico) (20:5)\$</li> <li>Clupanodónico (22:5)</li> <li>Clupadónico o cervónico (docosahexaenóico) (22:6)\$</li> </ul>
<b>ALIMENTOS QUE LOS CONTIENEN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grasas animales (ternera, cerdo, cordero, mantequilla) ricas en ác. palmítico.</li> <li>- Grasas vegetales (aceite de coco y de palma) ricas en ác. láurico y palmítico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aceite de oliva</li> <li>- Aceite de colza</li> <li>- Aceites de girasol y cártamo enriquecidos genéticamente con ác. oleico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\omega</math>-6: Aceites vegetales de semillas (maíz, girasol, soja, germen de trigo, pepita de uva, cacahuete y cártamo), margarina insaturada</li> <li>- <math>\omega</math>-3: Ácidos grasos de cadena larga procedentes de plantas (aceites de colza y soja) y aceites de pescado</li> </ul>

\*Los ác. palmítico y mirístico son los más aterogénicos.

\$ Ácidos grasos más abundantes

(x:y): x: número de átomos de carbono; y: número de dobles enlaces.

◇ Ácidos grasos esenciales

La composición de ácidos grasos que ingerimos tiene una gran repercusión funcional, ya que las características químicas de cada uno de ellos les confieren determinadas propiedades. De este modo, el grado de insaturación se relaciona con una mayor susceptibilidad a la oxidación, ya que ésta se produce sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos de los fosfolípidos por medio de las EROs, adquiriendo un especial protagonismo en el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas, como la aterosclerosis y el envejecimiento<sup>50</sup>.

### **3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL**

#### **3.1. Metabolismo y control de la producción energética. Producción de especies reactivas del oxígeno y de nitrógeno en la mitocondria**

La producción de energía se genera a partir del catabolismo de las moléculas que contienen átomos de carbono y de la hidrólisis de la adenosina trifosfato (ATP). El catabolismo conlleva la degradación de los nutrientes ingeridos y de los principios inmediatos almacenados (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos), transformándolos en moléculas más pequeñas como piruvato, precursores del acetil coenzima A (acetil-CoA), substratos intermedios del ciclo del ácido tricarboxílico y coenzimas reducidas, como la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y la flavina adenina dinucleótido (FADH<sub>2</sub>).

Las reacciones catabólicas pueden llevarse a cabo en distintos lugares. De este modo, en el citoplasma se produce la glicólisis y el ciclo de la pentosa-fosfato, en la mitocondria la oxidación de los ácidos grasos y la reoxidación de las coenzimas reducidas, en los lisosomas la degradación de los oligosacáridos y de las proteínas y en los peroxisomas la de los ácidos grasos.

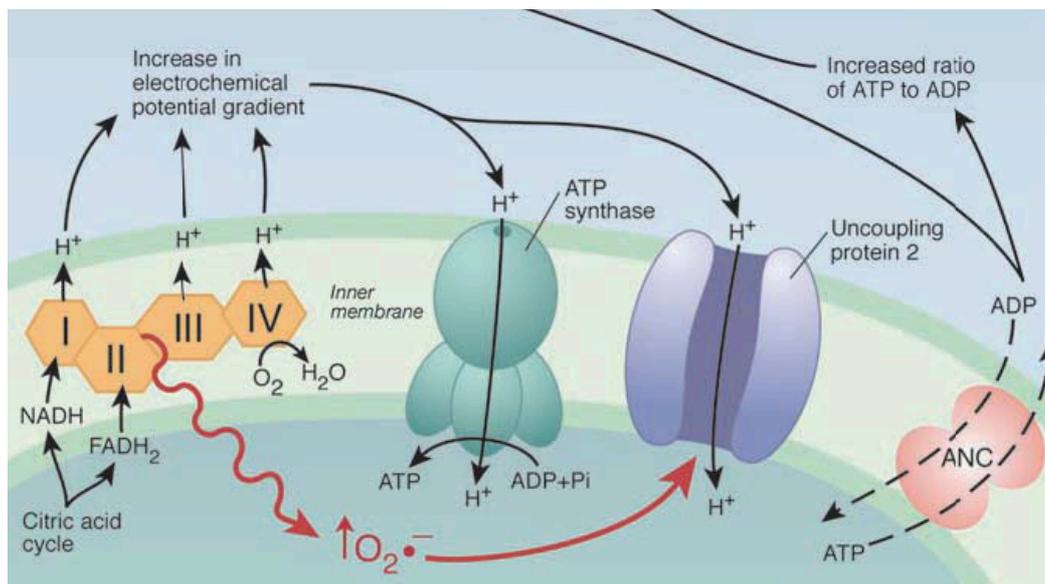
La mitocondria posee múltiples funciones, como la síntesis de urea, la gluconeogénesis y la síntesis proteica, la producción de radicales libres y la apoptosis, pero sobre entre todas ellas destaca la respiración celular y la oxidación de las moléculas reducidas. La fosforilación oxidativa mitocondrial, consiste en la producción de energía, en forma de ATP, a partir de los dinucleótidos reducidos transportadores de electrones (NADH y la FADH<sub>2</sub>), que constituyen el producto final de las distintas rutas metabólicas para la obtención de energía como son el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (también conocido como ciclo de Krebs), la beta-oxidación de los ácidos grasos y la

oxidación de los aminoácidos. De forma simultánea, a través de la glucólisis, se genera energía en forma de ATP, a partir de las reacciones de oxidación-reducción<sup>63</sup> mediante la transferencia de la energía almacenada en los enlaces de carbono de la glucosa al tercer enlace de fosfato de la molécula de ATP<sup>64</sup>. Ambos mecanismos están unidos a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, que se inicia con la transferencia de los electrones de los enlaces de carbono a la NADH y a la FADH<sub>2</sub>. Esta cadena está situada en la membrana interna mitocondrial y se encuentra acoplada a un sistema de bombeo de protones hacia el espacio intermembrana. Se trata de una unidad multiproteica formada por cuatro complejos: el complejo I (NADH-coenzima Q reductasa o NADH-deshidrogenasa), el complejo II (succinato-coenzima Q reductasa), el complejo III (coenzima Q-citocromo C reductasa) y el complejo IV (citocromo C oxidasa). Los electrones transferidos son finalmente utilizados en el complejo IV para reducir el oxígeno a agua a partir de la reacción  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + \frac{1}{2}\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ , manteniendo de este modo una baja concentración intracelular de protones. Los complejos I, III y IV son bombas de protones dependientes de reacciones de oxidación-reducción, que utilizan la energía obtenida de los electrones para bombear protones a través de la membrana interna mitocondrial, desde la matriz hacia el espacio intermembrana, creando de este modo un gradiente electroquímico de protones de -170mV aproximadamente<sup>65</sup>. Este gradiente de protones es utilizado por diferentes transportadores, entre ellos la ATP sintetasa<sup>66</sup>. Estos protones entran nuevamente en la matriz de la mitocondria a través de la ATP sintetasa que utiliza la energía almacenada procedente del gradiente electroquímico para sintetizar ATP a partir de adenosina difosfato (ADP). La reentrada de protones al interior de la mitocondria puede realizarse a través de una ruta alternativa que desacopla la síntesis de ATP de la fosforilación oxidativa, ya sea a través de las UCPs<sup>67</sup> o sin mediación proteica (fuga de protones)<sup>68</sup>, reduciendo el gradiente de protones sin obtener energía. En condiciones normales suele existir un desacoplamiento moderado que favorece las funciones fisiológicas al aumentar discretamente la respiración celular y con ello aumentar el metabolismo basal, evitar la formación de radicales libres, prevenir la formación de un gradiente de protones excesivo que inhiba la cadena respiratoria y provocar una pequeña liberación de calor, que a largo plazo podría estar relacionada con la regulación del peso corporal<sup>66</sup>.

La cadena de transporte de electrones transfiere electrones desde un donador (NADH o FADH<sub>2</sub>) a un aceptor final como es el oxígeno (O<sub>2</sub>) mediante una serie de reacciones de óxido-reducción. Aunque el transporte de electrones ocurre con una alta eficiencia, un pequeño porcentaje de electrones pueden fugarse de la cadena de transporte y al reaccionar con el O<sub>2</sub> forman un radical libre tóxico llamado superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). En los estudios realizados *in vitro*, parece que la mayoría de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se lleva a cabo en el complejo I durante el transporte reverso de electrones. Sin embargo, la mayor producción de EROs se origina cuando se oxida el succinato presente en

el complejo II en ausencia de inhibidores de la cadena de transporte de electrones. Los aniones superóxido producidos son liberados hacia el lado matricial de la membrana interna mitocondrial<sup>69</sup>.

Esta asimetría existente entre la producción de  $O_2^-$  y el transporte hacia delante y reverso de electrones ha sido objeto de estudio por el grupo de trabajo de Brand et al. Llegando a la conclusión de que para que se produzcan altas tasas de síntesis de  $O_2^-$  se precisa un aporte adecuado de electrones, un gradiente elevado de pH a través de la membrana y la existencia de un transporte inverso de electrones. Esta situación desciende de forma significativa cuando se produce un desacoplamiento ligero al reducir tanto el potencial de membrana como el gradiente de pH<sup>70</sup>.



**Figura 2.** Acoplamiento de la cadena de transporte de electrones a la síntesis de de ATP.

ADP, adenosina difosfato; ANC, transportador de nucleótidos de adenina; ATP, adenosina trifosfato; FADH<sub>2</sub>, flavina adenina dinucleótido; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, anión superóxido; Pi, fosfato inorgánico.

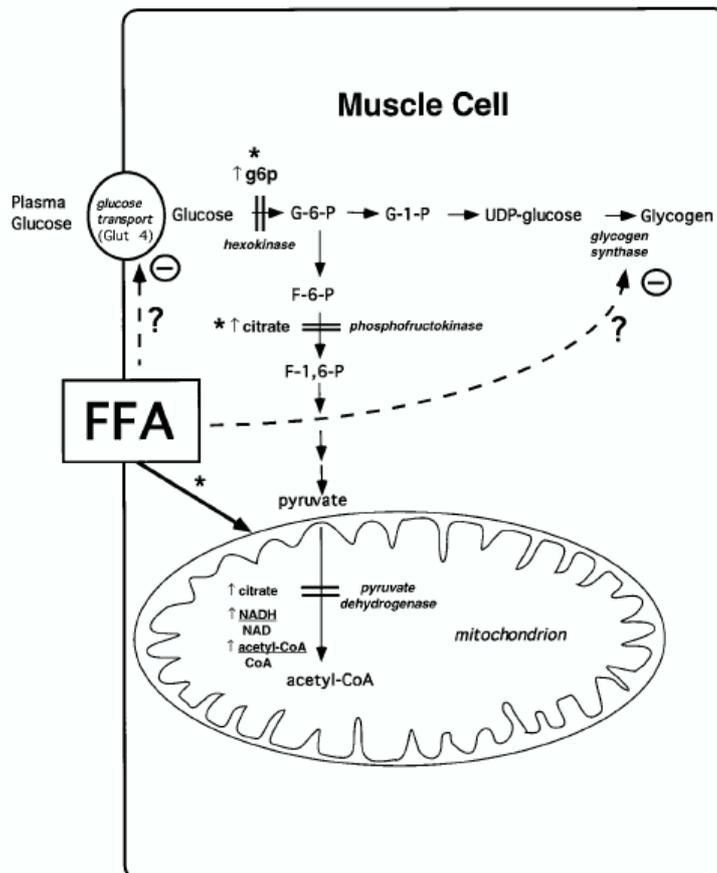
Imagen tomada de Lowell, B.B. and Shulman, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, 2005. **307**(5708): p. 384-7.

### 3.2. Disfunción mitocondrial, ácidos grasos intracelulares y resistencia a la insulina

Se sabe que los pacientes con DM2 presentan generalmente resistencia a la insulina, que se inicia incluso 10 ó 20 años antes de que aparezca la hiperglucemia franca<sup>71</sup> y que la existencia de insulino-resistencia en personas con padres diabéticos es el mejor factor predictor de enfermedad<sup>72</sup>. Pero no todos los individuos con resistencia a la insulina desarrollan posteriormente DM2. Este hecho parece ser debido al desarrollo de un fenómeno de adaptación de la célula  $\beta$  para soportar el aumento de la demanda, por ejemplo, aumentando la masa de células  $\beta$ . La masa de células  $\beta$  depende de varios factores como la masa primaria conseguida, la tasa de replicación y el índice de apoptosis celular que parece ser el factor determinante<sup>73</sup>.

La resistencia a la insulina afecta fundamentalmente a órganos esenciales en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, como son el músculo esquelético, el tejido adiposo y el hígado. Los mecanismos celulares responsables que afectan la sensibilidad a la insulina en estos tejidos no son totalmente conocidos; aunque, parece necesaria una integridad del metabolismo oxidativo mitocondrial. Sin embargo, también se ha postulado que las adipoquinas circulantes, secretadas por el tejido adiposo, podrían ser las moduladoras de la respuesta hepática y muscular a la insulina, jugando un papel fundamental tanto los ácidos grasos como sus metabolitos intracelulares [acil coenzima A (acil-CoA), diacilglicerol y ceramidas]<sup>74</sup>. Existen diferentes hipótesis que intentan explicarlo:

Ya en los años 60, Randle demostró que los ácidos grasos causaban resistencia a la acción de la insulina en el tejido muscular cardíaco de ratas<sup>75</sup>. Este modelo se explicaría aceptando que el incremento de la oxidación de los ácidos grasos en el tejido muscular podría producir un aumento del cociente acetyl-CoA/CoA y NADH/NAD<sup>+</sup>, que inhibirían a las dos enzimas involucradas en la glucólisis (piruvato deshidrogenasa y fosfofructo-kinasa). Esto conduciría a un aumento intracelular de glucosa-6-fosfato, que inactivaría a la hexoquinasa y finalmente implicaría una menor captación de glucosa mediada por la insulina (figura 3).

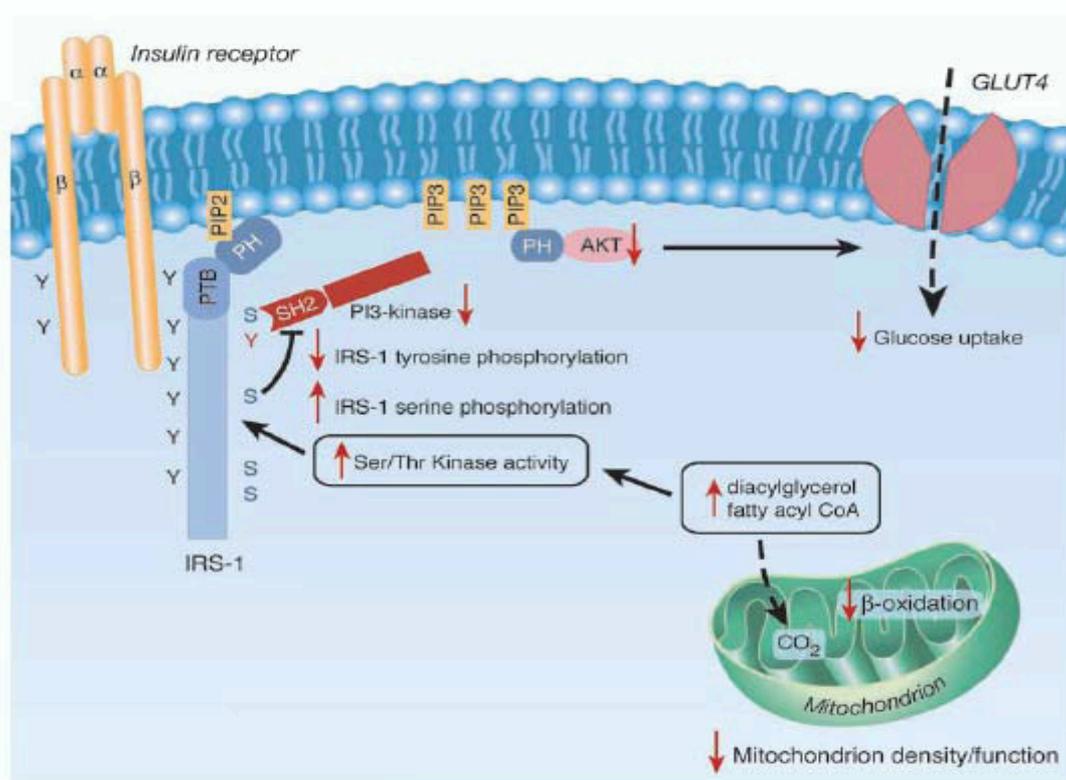


**Figura 3.** Esquema de los posibles lugares de interacción de los ácidos grasos sobre el metabolismo de la glucosa mediado por la insulina en el músculo según la hipótesis de Randle y colaboradores<sup>75</sup>.

FFA, ácidos grasos libres; g6p, glucosa-6-fosfato; G-I-P, glucosa-1-fosfato; F-6-P, fructosa-6-fosfato; F-1,6-P, fructosa 1,6 bifosfato.

Imagen tomada de Roden, M., Price, T.B., Perseghin, G., Petersen, K.F., Rothman, D.L., Cline, G.W. and Shulman, G.I. Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* 1996;97:2859-65.

Sin embargo, posteriormente se ha observado que el acúmulo de los ácidos grasos produce resistencia insulínica, al inhibir de forma directa la captación de glucosa mediado por la insulina, no interaccionando con la glucólisis<sup>76</sup>. Esta inhibición podría estar producida por el acúmulo intracelular de acil-CoA y diacilglicerol, que activaría múltiples vías enzimáticas, produciendo finalmente la disminución de la captación de glucosa en respuesta a la insulina (figura 4).



**Figura 4.** Posibles mecanismos de producción de resistencia insulínica a nivel muscular a partir de la existencia de disfunción mitocondrial.

AKT, proteína-kinasa B; IRS-1, sustrato 1 del receptor de la insulina; PH, dominio homólogo a la plectrina; PI 3-kinasa, fosfatidil inositol 3-kinasa; PIP2, fosfatidil inositol difosfato; PIP3, fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato; PTB, dominio de unión a la fosfotirosina; SH2, dominio homólogo a la SRC.

Imagen tomada de Lowell, B.B. and Shulman, G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*, 2005. 307(5708): p. 384-7.

En los últimos estudios realizados parece evidente que la disfunción de la mitocondria es fundamental en el desarrollo de la resistencia a la insulina y posteriormente de la DM2, al producir una disminución tanto de la actividad oxidativa de ácidos grasos como de la síntesis de ATP

mitocondrial. Se han planteado varias hipótesis para explicar este hecho. En primer lugar, la disfunción mitocondrial puede estar relacionada con el envejecimiento<sup>77</sup>. Además, se observa la presencia precoz de disfunción mitocondrial en sujetos hijos de padres diabéticos con resistencia a la insulina. Finalmente, un incremento del contenido de ácidos grasos en las células musculares con resistencia insulínica se asocia con un descenso en la actividad mitocondrial<sup>78</sup>. Por lo tanto, es lógico pensar que una predisposición genética asociada a un acúmulo de ácidos grasos a nivel hepático y/o muscular y al envejecimiento son condiciones que favorecen la aparición de disfunción mitocondrial, la generación de resistencia a la insulina y, finalmente, el desarrollo de DM<sup>79</sup>.

### 3.3. Proteínas desacoplates

Desde el descubrimiento de las proteínas desacoplates (UCPs) en los años 90, se ha intentado establecer las funciones de cada una de ellas. Parece que el sistema de UCPs se inicia con la isoforma ancestral de proteína desacoplante 4 (UCP4) y que el resto podrían ser las formas evolucionadas de ésta<sup>80</sup>, actuando todas ellas como canales de protones o transportadores<sup>81</sup>. La proteína desacoplante 1 (UCP1) difiere de las UCP2 y de la proteína desacoplante 3 (UCP3) fundamentalmente, en su distribución en los tejidos y en su acción (tabla 3): mientras la UCP1 lo hace fundamentalmente en el tejido graso marrón, las UCP2 y UCP3 se expresan en múltiples tejidos, fundamentalmente en el tejido graso blanco y en el músculo esquelético respectivamente<sup>82</sup>.

**Tabla 2.** Tipos de UCPs: distribución en los tejidos y funciones fundamentales.

	UCP1	UCP2	UCP3
<b>Tejido en el que se expresa</b>	Tejido graso marrón	Múltiples tejidos, fundamentalmente tejido graso blanco, tejidos inmunomoduladores (bazo y macrófagos) y páncreas endocrino	Músculo esquelético y tejido adiposo marrón
<b>Activadores</b>	AGLs Ácido retinoico Superóxido Ubiquinona Hidroxinomenal	AGLs Ácido retinoico Superóxido Ubiquinona Hidroxinomenal	AGLs Ayuno Superóxido Ubiquinona Hidroxinomenal
<b>Inhibidores</b>	GDP, GTP, ADP, ATP	GDP, ATP	GDP, ATP
<b>Acción bioquímica</b>	Transporte de protones Exportación de AGLs deprotonados Transporte de EROs	Transporte de protones Exportación de AGLs deprotonados Transporte de EROs	Transporte de protones Exportación de AGLs deprotonados Transporte de EROs

		Transporte de Glutacion Translocación de AGLs peroxidados	Translocación de AGLs peroxidados
<b>Acción fisiológica</b>	Termogénesis adaptativa inducida por frío y por la dieta	Gasto energético basal Adaptación al aumento de la oxidación de los AGLs Limitación de la síntesis de EROs Control de la producción de NO Regulación de los niveles de glutacion Protección frente a la arteriosclerosis Inhibición de la secreción de insulina Neuroprotección Actividad antiinflamatoria Inhibición de la adhesión de macrófagos Regulación de la apoptosis Activación de la oncogénesis	Gasto energético basal Adaptación al aumento de la oxidación de los AGLs Limitación de la síntesis de EROs Hipertermia inducida por N-Metil-D-aspartato

Tabla adaptada de Ricquier, D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc Nutr Soc*, 2005. 64 (1): p. 47-52.

Mientras la UCP1 cataliza la termogénesis adaptativa en el tejido graso marrón de los mamíferos, aumentando la conductancia de protones a través de la membrana mitocondrial interna<sup>83</sup>, desacoplando la oxidación del sustrato de la fosforilación del ADP a ATP, produciendo un consumo rápido de oxígeno y la generación de calor, las otras UCPs no poseen esta función. En el caso de UCP2 y UCP3, su desacoplamiento moderado atenúa la producción de EROs, ejerciendo un efecto protector frente al daño celular<sup>70, 84</sup>. Este fenómeno parece ser debido a que tanto el  $O_2^-$  como los lípidos peroxidados como el 4-hidroxiomenal, activan la reentrada de protones mediada por UCP2, protegiendo a la célula frente al daño oxidativo<sup>85, 86</sup>. Además, podrían jugar un papel fisiológico importante en la exportación de ácidos grasos<sup>87</sup> e hidroperóxidos de ácidos grasos<sup>88</sup> aunque no existen evidencias suficientes que lo demuestren. La hiperactividad de la UCP2 en la célula  $\beta$  pancreática se asocia a una disminución de la secreción de insulina inducida por la glucosa<sup>89</sup>, pudiendo estar implicada en el desarrollo de la diabetes mellitus. Por último, hay que añadir la posible participación de ambas UCPs en la termogénesis en la obesidad, diabetes, envejecimiento y en enfermedades degenerativas, neurológicas, circulatorias e inmunológicas<sup>82</sup>.

## Evaluación de la funcionalidad del sistema UCPs

Con el fin de establecer las funciones específicas de cada tipo de UCP se han diseñado diferentes estudios.

La sobreexpresión de UCPs en células de mamíferos puede dar información de la funcionalidad aunque algunas veces puede deberse a artefactos. De este modo, los estudios realizados con este diseño, fundamentalmente mediante la utilización de adenovirus para establecer la función de la UCP2, no han sido determinantes. Mientras que en el trabajo realizado por Hong y colaboradores se observó una inhibición de la secreción de insulina mediada por glucosa<sup>90</sup>, el realizado por otros grupos con modelos que sobreexpresaban la UCP2 mostró el efecto opuesto, detectándose un aumento de la secreción de insulina estimulada por la glucosa<sup>91, 92</sup>. Por último, en el estudio publicado recientemente por el grupo de Produit-Zengaffinen y colaboradores en el que producían una sobreexpresión de UCP2 en las células  $\beta$ -pancreáticas, no encontraron diferencias significativas en la secreción insulínica<sup>93</sup>. Dado que la cantidad de insulina es normal en los islotes pancreáticos que sobreexpresan mRNA de UCP2, parece probable que esta proteína no esté involucrada en la síntesis insulínica aunque pueda tener un papel importante en la regulación de la secreción de la misma<sup>94, 95</sup>.

Si lo que se provoca es una disminución de la expresión de UCPs en animales transgénicos tras insertar un plásmido en la secuencia de ADN que codifica la UCP2, existe la ventaja de que no están sujetos a artefactos por sobreexpresión de las proteínas aunque con el inconveniente de que puede existir una expresión compensadora de otros genes que podrían enmascarar la pérdida de función. A modo de ejemplo, en el estudio realizado en ratones knock-out para el gen de la UCP2, no se observó obesidad ni resistencia a la obesidad inducida por la dieta, demostrándose además una regulación de la temperatura corporal completamente normal<sup>96</sup>.

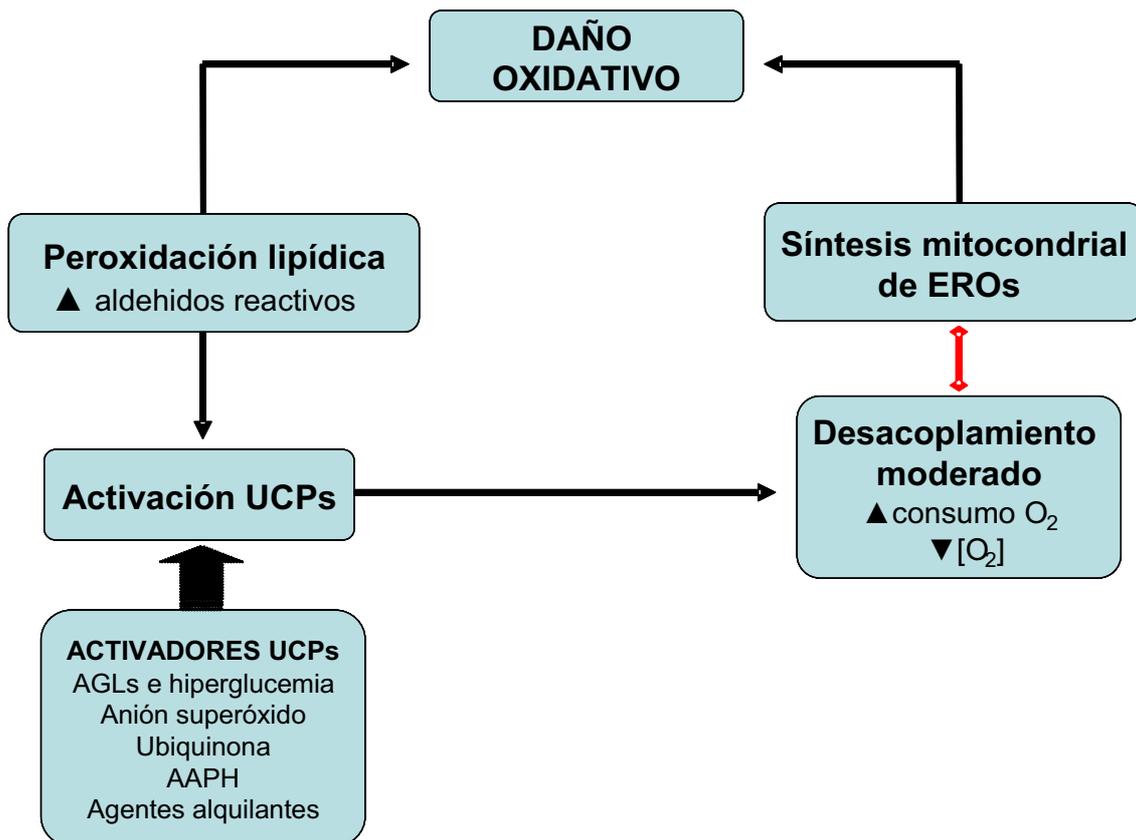
Por último, se ha intentado incorporar estas proteínas a los proteolisosomas con el fin de estudiar las reacciones catalizadas por las nuevas UCPs. Estos estudios han demostrado que tanto UCP2 como UCP3 pueden catalizar la conductividad de protones nucleótido-dependiente pero sólo en presencia de ácidos grasos y, probablemente también de generadores de radicales libres como la ubiquinona<sup>97</sup>, que podría actuar como fuente de radicales para iniciar las vías activadoras de los alquilantes<sup>98</sup>. La interpretación de estos hallazgos es que las UCPs no catalizan la transferencia de protones a menos que sean activadas por agentes alquilantes reactivos aunque los endógenos puedan producir activación in vitro de la proteína en las mitocondrias de tejido adiposo marrón. De este modo, estos estudios han demostrado que UCP2 y UCP3 son las responsables de catalizar la red de conductividad de protones de la membrana interna mitocondrial pero únicamente cuando son inducidas por los activadores idóneos como el anión  $O_2^-$  y el hidroxinonal<sup>82</sup>.

## Mecanismos de acción del sistema UCPs

Se sabe que la UCP1 cataliza dos tipos de transporte a través de la membrana aunque estas acciones son aplicables al resto de UCPs. Por una parte, incrementan la red de transferencia de protones de la membrana mitocondrial interna pero parece que únicamente cuando están presentes una serie de activadores. A este respecto existe discrepancia, desconociéndose con exactitud si cuando éstos no existen, las UCPs pueden no ser funcionales. En contra de esta teoría, existen múltiples publicaciones que rechazan esta hipótesis, apoyando la activación de UCP2 y UCP3 en mitocondrias y células intactas<sup>70, 86, 99</sup>. En las mitocondrias del tejido graso marrón intacto, la UCP1 se activa cuando se eliminan tanto los ácidos grasos como los nucleótidos<sup>100</sup>. Entre estos activadores destacan los AGLs, el  $O_2^-$ , la ubiquinona, el hidrocloreuro 2-aminopropano (AAPH), que es un generador de radicales basados en el carbono, algunos agentes alquilantes reactivos como el hidroxinonenal y sus análogos como el cinamato, retinal, retinoato y el receptor de retinoides selectivo para el ácido retinoico (TTNPB)<sup>70, 86</sup>. El modelo de interacción entre estos activadores planteado por Brand y colaboradores propone que la ubiquinona, el superóxido y el AAPH ejercen su acción indirectamente, generando radicales carboxilados sobre las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana interna mitocondrial. Estos radicales son oxidados rápidamente formando radicales lipídicos peroxidados que catalizan la liberación de hidroxinonenal que activaría directamente a las UCPs<sup>101</sup>.

Se han propuesto dos posibles mecanismos de activación de la inducción de la conductancia de protones mediada por  $O_2^-$ . La activación directa del transporte de protones a través de la UCP2 inducida por  $O_2^-$  o sus productos y la entrada del radical hidroperoxil acoplada a la exportación del anión  $O_2^-$  catalizada por UCP. Este último mecanismo requeriría la protonación del  $O_2^-$  en el medio para formar hidroperoxil, la difusión de este radical hacia la matriz mitocondrial para ser deprotonado y regenerar el  $O_2^-$ , seguido del regreso del  $O_2^-$  al medio desde la matriz mitocondrial<sup>85</sup>. Además, el hidroxinonenal puede modificar químicamente múltiples residuos de aminoácidos en las proteínas como el grupo sulhidrilo de la cisteína entre otros. Por este motivo, este compuesto posee una gran capacidad de toxicidad biológica al poder inhibir de forma directa la síntesis de ADN y proteínas, inactivar diversas enzimas, modificar las moléculas de LDL y modular la expresión génica. De forma añadida, el hidroxinonenal inhibe el transporte de ADP mediado por la adeninasa nucleótido traslocasa. Así, este metabolito puede disminuir el potencial de la membrana mitocondrial y por tanto, la síntesis de EROs<sup>101</sup>. Tanto el  $O_2^-$  generado en el área extramitocondrial como el producido en la matriz mitocondrial, ya sea en condiciones fisiológicas o no<sup>85</sup>, puede activar a las UCPs produciendo un desacoplamiento mitocondrial moderado que incrementa la conductancia de protones mitocondrial<sup>70</sup>. Este anión, al iniciar la peroxidación lipídica, produce la liberación de hidroxinonenal que activa directamente a las UCPs. Los

retinoides, el cimemato y el TTNBP podrían actuar como análogos del hidroxinonenal, aunque algunos de ellos pueden deber su efecto a su similitud con los ácidos grasos<sup>70, 84, 86</sup>. De este modo, al incrementarse las concentraciones plasmáticas de especies radicálicas, se ocasionan los efectos citotóxicos asociados al estrés oxidativo, activan distintas vías de señalización y estimulan a las UCPs que actúan contrarrestando estos efectos. Este mecanismo de retroalimentación negativa se origina para proteger a la célula del daño inducido por las EROs y podría representar la función ancestral común de todas las UCPs<sup>70</sup>.



**Figura 5.** Posible modelo de funcionamiento de la UCPs. Propuesto por Brand y colaboradores.

Figura adaptada de Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L., Parker, N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*, 2004. 37(6): p. 755-67.

En cualquier caso, parece importante la presencia de ácidos grasos o de sus análogos para la activación de la conductividad de protones en los proteolisosomas mediante las UCP2 y UCP3<sup>85, 97</sup>, no así para la activación mitocondrial a través de los agentes alquilantes<sup>101</sup>. El mecanismo por el cual los ácidos grasos podrían activar esta reacción podría ser más que por activación directa, por inhibición de los nucleótidos según el modelo propuesto para UCP1<sup>102</sup>. La activación directa se realizaría utilizando el carboxilato de los enlaces de de los ácidos grasos como grupo prostético<sup>103, 104</sup> y la indirecta a través del transporte aniónico de ácidos grasos y su posterior retorno a través de la membrana interna mitocondrial en forma de ácido graso protónico<sup>105</sup>.

Finalmente, el segundo tipo de transporte consiste en la exportación de ácidos grasos aniónicos o cloruro. Esta función la realizan, fundamentalmente, UCP2 y UCP3 que podrían exportar los AGLs fuera de la mitocondria cuando predomina el aporte de los mismos o la oxidación como ocurre en el músculo esquelético durante el ayuno y tras la ingesta de dietas ricas en grasas. De este modo, se consigue mantener una rápida oxidación de AGLs en casos de sobrealimentación mientras que se elimina de la mitocondria el sustrato sobrante que no puede ser metabolizado<sup>104</sup>.

## UCP2

La UCP2 es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial que fue descubierta en 1997<sup>106</sup>. El gen de esta proteína se encuentra situado en el cromosoma 11, en una región relacionada a la obesidad (11q13)<sup>107</sup> y posee ocho exones<sup>108</sup> que codifican una proteína de 309 aminoácidos con seis dominios transmembrana. El papel de la UCP2 no está totalmente establecido aunque parece que cuando se estimula su expresión permite el flujo de protones a través de la membrana interna de la mitocondria desacoplando el metabolismo oxidativo de la glucosa y de los ácidos grasos de la producción de ATP<sup>109</sup> reduciendo, por tanto, la producción de ATP y aumentando el ratio ADP/ATP. De este modo, se ha comprobado que la activación de esta proteína tanto en modelos experimentales *in vivo* como *in vitro*, mediante hiperglucemia y la exposición a ácidos grasos, produce una disfunción de la célula  $\beta$ <sup>95, 110</sup>, ocurriendo lo contrario en modelos con déficit genético de UCP2<sup>110, 111</sup>. Este hecho sugiere que la sobreproducción de UCP2 contribuye al desarrollo de diabetes inducida por la obesidad<sup>67</sup>. Este fenómeno, a nivel pancreático, se traduce en una inhibición de la secreción de insulina ya que reduce la apertura de los canales de potasio ATP-dependientes de la membrana celular, evitando la despolarización de la membrana que a su vez, no permite la apertura de los canales de calcio que estimulan, al aumentar el calcio citosólico, la secreción de insulina por la célula  $\beta$ <sup>110</sup>. Por tanto, la UCP2 puede desempeñar un papel importante durante los periodos en los que existe una baja concentración de glucosa al favorecer la  $\beta$ -oxidación de los AGLs, aumentando la producción de O<sub>2</sub><sup>-69</sup>. La UCP2 es activada por éste, generándose un desacoplamiento discreto que asegura el correcto funcionamiento de la célula  $\beta$  cuando existe falta de glucosa al atenuar la secreción de insulina a pesar de existir disponibilidad de sustratos adecuados para la producción de ATP<sup>70</sup>.

Otra posible función de la UCP2 puede ser el estar relacionada con el gasto energético basal y, por lo tanto, con el desarrollo de obesidad en humanos al existir una correlación positiva entre la expresión de ARNm de UCP2 en el tejido adiposo periférico y el gasto calórico basal<sup>112</sup>. Este hecho ha sido estudiado en trabajos posteriores, hallándose polimorfismos del gen de la UCP2 que podrían aumentar la expresión de esta proteína en el tejido graso humano, disminuyendo

ligeramente el riesgo de obesidad<sup>113</sup> y por tanto, también de DM2 al ser uno de los principales factores de riesgo para su desarrollo<sup>114</sup>.

Finalmente, un papel fundamental de UCP2 parece ser la prevención de la producción de EROs. Esta acción la realizaría al disminuir el gradiente de protones al producir un desacoplamiento entre la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, disminuyendo la producción de EROs y ERNs y, reduciendo por tanto, el estrés oxidativo<sup>70</sup>. El anión superóxido es el activador principal de la actividad de la UCP2<sup>99</sup>. El mecanismo por el cual produce esta acción no está completamente establecido aunque podría estar relacionado con la producción de radicales libres<sup>115</sup>.

El problema básico al intentar estudiar esta proteína y su expresión en el ser humano es su amplia distribución tisular y su gran variabilidad inter e intrasujeto, fundamentalmente a nivel muscular. Su acción fundamental en los distintos tejidos de sujetos sanos parece ser la de proteger frente al daño celular inducido por las EROs y las ERNs producidos durante la fosforilación oxidativa mitocondrial, no existiendo una relación clara entre la expresión de ARNm de UCP2 y el control del gasto energético basal y la termogénesis como ocurre con la UCP1<sup>116</sup>. Estudios en modelos animales realizados para valorar el comportamiento de UCP2 en situación basal y tras ayuno de 24 horas, han demostrado que su expresión aumenta de forma significativa a nivel muscular, pulmonar y gástrico. En estos dos últimos órganos, su papel podría ser el de proteger al organismo del estrés oxidativo provocado por infecciones, alérgenos o la polución ya que ambos órganos están constantemente expuestos a tóxicos y patógenos<sup>117</sup>.

Además, otras situaciones que provocan un aumento de la expresión de UCP2 son la ingesta de dietas con alto contenido graso<sup>118</sup>, situaciones de sepsis<sup>119</sup>, la infusión de soluciones lipídicas de forma experimental<sup>120</sup>, el hipertiroidismo<sup>121</sup> y la diabetes inducida por estreptozotocina<sup>122, 123</sup>. La expresión de UCP2 en estos casos varía según el tejido analizado siendo los órganos especialmente involucrados y, por tanto, objeto de mayor número de estudios, el músculo esquelético y el tejido adiposo blanco al estar íntimamente relacionados con el metabolismo energético.

En estudios realizados con ratones “knock-out” para UCP2 se ha comprobado un incremento de los niveles de EROs en los macrófagos frente a los controles, mostrando un desarrollo acelerado de la placa arteriosclerótica concordante con el papel del daño oxidativo en la patogénesis de la enfermedad arteriosclerótica<sup>124</sup>. Además, los macrófagos de ratones carentes del gen de la UCP2 mostraron altas concentraciones de EROs que se asocian con una mayor actividad citolítica que se manifestaba clínicamente como la resistencia a la infección por *Toxoplasma gondii* en estos animales<sup>96</sup>.

Otras posible función de UCP2 estudiada en varios tipos de células tumorales y neuronas es servir como proteína antiapoptótica, aumentando además en las primeras la apetencia por la oxidación de los ácidos grasos<sup>125</sup> e inhibir la inflamación<sup>126</sup>, que podría jugar un papel importante en la protección celular frente a las EROs.

## **Papel de otras proteínas desacoplantes**

La UCP3 se expresa, fundamentalmente, en músculo esquelético y, en menor cuantía en el tejido adiposo marrón y miocardio<sup>127</sup>. En ratones “knock-out” para UCP3, se produce un aumento del acoplamiento mitocondrial y del potencial de la membrana mitocondrial durante la oxidación no fosforilativa en las células musculares incrementando el daño oxidativo en las células musculares<sup>128</sup> además de hipertermia inducida por N-metil-D-aspartato<sup>129</sup>. Por tanto, parece ser que la función de UCP3 podría ser la de facilitar la salida de ácidos grasos aniónicos, reduciendo de este modo la síntesis de EROs mitocondriales, la lipoperoxidación y, por tanto, la lipotoxicidad muscular. La disfunción de UCP3 podría de este modo aumentar el riesgo de desarrollar DM2, hecho que se apoya en el hallazgo de una reducción de los niveles de UCP3 en el tejido muscular del 50% en pacientes diabéticos<sup>130</sup>. De forma inversa, la sobreexpresión de UCP3 en el tejido muscular de ratones se ha relacionado con resistencia para desarrollar obesidad inducida por una dieta rica en grasa<sup>131</sup>.

La UCP4, a diferencia de otras UCPs, se expresa únicamente en el cerebro. Su función parece ser la de intervenir en la fuga de protones mitocondrial en el tejido cerebral, pudiendo estar involucrada en la termorregulación adaptativa y en la producción de calor tanto en la etapa fetal como en la edad adulta. Además, puede estar implicada en la señalización del sistema nervioso, en el fenómeno apoptótico cerebral y en la regulación de la síntesis de EROs por lo que una alteración en su expresión podría relacionarse con la patogénesis de las enfermedades degenerativas neuronales<sup>132</sup>.

La proteína desacoplante 5 (UCP5), también llamada BMCP1 (proteína transportadora mitocondrial cerebral tipo 1) fue la última UCP descubierta<sup>133</sup> por lo que aún tiene un papel poco conocido. Se expresa fundamentalmente en el sistema nervioso de los mamíferos<sup>133, 134</sup>, fundamentalmente en las neuronas<sup>135</sup> aunque también puede encontrarse en otros tejidos. Se cree que interviene en las adaptaciones metabólicas al modificarse su expresión dependiendo del estado nutricional y de la temperatura<sup>134</sup> y en la regulación de la fosforilación oxidativa mitocondrial<sup>135</sup>.

## **Relación entre la expresión del sistema UCPs y la dieta**

Con respecto a la termogénesis adaptativa y al metabolismo lipídico, la única UCP que parece estar involucrada es la UCP1. En un estudio reciente, se ha demostrado que los niños con un determinado polimorfismo de UCP1 presentan menor termogénesis postprandial en respuesta a dietas grasas, indicando un posible papel de la UCP1 en la obesidad<sup>136</sup>. Igualmente, la presencia del polimorfismo ins/del del exón 8 del gen de la UCP2 podría estar relacionado con el desarrollo de obesidad infantil<sup>137</sup>. En el trabajo publicado por el grupo de Esterbauer se encontró una posible implicación del polimorfismo G/A en la región promotora de UCP2 en humanos, muy común en la población, con el riesgo de padecer obesidad<sup>113</sup>. Durante el ayuno, se aumenta la expresión tanto de UCP2 como de UCP3. En esta situación, a nivel del tejido muscular esquelético, se produce un aumento de la utilización lipídica como fuente energética, permitiendo de este modo usar la glucosa en aquellos tejidos con necesidad de la misma como el cerebro, indicando el posible papel de la UCP2 en el manejo de los lípidos o en la partición de los sustratos. Igualmente, el consumo de una dieta rica en grasa activa, en estado de ayuno, la expresión de ambas proteínas en el músculo esquelético así como en otros tejidos para proteger a la célula frente a la formación de EROs<sup>138</sup>. Estudios en modelos animales han demostrado que la ingesta de una dieta rica en grasa duplica la expresión de ARNm de UCP2 en el tejido graso blanco de ratones con resistencia a la obesidad, provocando tan sólo un leve incremento de su expresión en ratones propensos a la obesidad<sup>107</sup>. Este efecto se ha comprobado también en el tejido muscular de ratones con tendencia a la obesidad pero no en animales resistentes a la misma sobre la expresión de UCP3 sin hallarse diferencias en la expresión de UCP2 en este tejido<sup>139</sup>. Además, en estudios *in vivo* realizados tanto en modelos animales como en humanos, los niveles de ARNm de UCP2 se relacionaban con las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos<sup>106, 140</sup> en múltiples tejidos y podría interpretarse como una función protectora frente a las EROs producidas cuando existe una alta tasa de oxidación de ácidos grasos y un incremento de la respiración mitocondrial<sup>67</sup>. Por tanto, la UCP2 puede jugar un papel importante en el metabolismo lipídico y su acción podría explicar algunas de las alteraciones que preceden al establecimiento de la DM2 como la posible disregulación del metabolismo lipídico a nivel muscular y graso<sup>106</sup>, la alteración de la secreción insulínica y una posible acción sobre el mantenimiento del peso corporal<sup>141</sup>.

## **4. EL ENDOTELIO VASCULAR Y LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL**

La arteriosclerosis es un proceso crónico y generalizado del sistema vascular que se inicia en la infancia y en la juventud<sup>142</sup>. El periodo preclínico de la enfermedad puede durar varias décadas, tiempo durante el cual se producen, lentamente, cambios sobre las placas arterioscleróticas que

pueden llegar a ocasionar sintomatología por rotura de las mismas o si se ocasiona una estenosis luminal. Todo este proceso se inicia por la existencia de una disfunción del endotelio, fundamentalmente debida a una reducción de la biodisponibilidad de NO<sup>143</sup>.

El endotelio vascular es un tejido dinámico que posee múltiples funciones, incluyendo la regulación de la fluidez sanguínea, el crecimiento celular, el tono y la permeabilidad de la pared vascular y la formación de proteínas matriciales extravasculares que juegan un papel fundamental en la regulación de la vasculogénesis y angiogénesis, la adhesión y extravasación de células inflamatorias y la composición del intersticio<sup>144</sup>. Estos mecanismos de regulación son debidos a la capacidad endotelial de detectar y responder a una amplia variedad de estímulos internos y externos a través de sistemas complejos de receptores celulares de membrana y de mecanismos de transducción de señales<sup>145</sup>.

#### **4.1. Activación endotelial**

La capacidad de vasodilatación vascular ante un aumento de flujo sanguíneo o un estímulo de estiramiento se denomina VDE. Este fenómeno se produce en respuesta a fuerzas de rozamiento o a la activación de los receptores presentes en la superficie endotelial por sustancias como la insulina, la acetilcolina o la bradiquinina, que activan la transducción de señales vía proteína G y, al aumentar los niveles de calcio en el citosol, estimula a la óxido nítrico sintetasa (NOS) endotelial. El calcio entra en la célula a través de la activación de los canales de potasio calcio-dependientes que se abren, produciendo una hiperpolarización de la célula endotelial que conlleva un aumento de la entrada de calcio a la célula y la liberación de éste desde los depósitos intracelulares, formando un complejo con la calmodulina que se une, finalmente a la NOS. Este incremento de la actividad de la NOS endotelial, induce la formación de NO, citromodulina a partir de arginina, O<sub>2</sub> y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH).

La síntesis de NO se realiza a través de la conversión del aminoácido L-arginina en NO y L-citrulina y está catalizada por, al menos, tres isoformas de NOS que además, requiere de la presencia de cofactores como NADPH, dinucleótido de flavina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) y tetrahidropterina (BH<sub>4</sub>)<sup>146</sup>. Una de ellas es la NOS inducible y su síntesis está mediada por citoquinas inflamatorias macrofágicas como la interleukina 1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), además de otros muchos tipos celulares<sup>147</sup> y las otras dos se expresan de forma constitutiva, una a nivel cerebral (NOS neuronal) y otra en las células endoteliales vasculares (NOS endotelial)<sup>148</sup>. En estas células cumple dos funciones fundamentales: estimular la vasodilatación y eliminar las EROs que puedan causar daño oxidativo a nivel tisular. Una vez sintetizado y con una vida media de 3-20 segundos, el NO difunde localmente al espacio subendotelial y a la luz vascular donde se comporta como un potente agente vasodilatador,

antimitótico, antiinflamatorio, antitrombótico y antioxidante<sup>145, 149</sup> e inhibe la agregación plaquetaria, impidiendo así la progresión del fenómeno arteriosclerótico<sup>150</sup>.

A pesar de que este parece ser el mecanismo fundamental de activación endotelial, se ha comprobado que existen otros mecanismos que aumentan la síntesis de NO ante estímulos mecánicos ya que en ratones tratados genéticamente para carecer de NOS endotelial (ratones Knockout para el gen de la NOS endotelial), se conserva la capacidad de VDE<sup>151</sup>. Entre ellos, cabe destacar la fosforilación de la NOS endotelial a través de la proteína-kinasa serotonina/treonina, Akt/PKB<sup>152</sup>, su miristilación o palmitoilización enzimática o su interacción con caveolina<sup>145</sup>.

## 4.2. Disfunción endotelial

La disfunción endotelial parece subyacer en una amplia gama de enfermedades como la aterosclerosis, la HTA, el fallo cardíaco y la DM y se considera un estado predictivo independiente de eventos cardiovasculares<sup>153</sup>. Se ha demostrado que la alteración de la VDE medida en la arteria braquial tiene un valor pronóstico en pacientes con patología coronaria conocida<sup>154</sup>. Igualmente, se ha objetivado que la existencia de disfunción endotelial periférica es de valor pronóstico en pacientes hipertensos sin evidencia clínica de ángor o enfermedad coronaria<sup>155</sup> e, incluso, que esta alteración de la VDE de las arterias sistémicas puede ser objetivada en niños y sujetos jóvenes con factores de riesgo para el desarrollo de arteriosclerosis antes de que comiencen a desarrollarse las placas ateroscleróticas<sup>156</sup>. Además, se sabe que esta disfunción puede ser parcialmente reversible con tratamiento como las estatinas y los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, L-arginina, antioxidantes y preparados hormonales<sup>157</sup> y que su mejoría se relaciona con un mejor curso clínico<sup>158, 159</sup>. Por todo ello, se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de un método para evaluar la función del endotelio con el fin de poder identificar a los sujetos de alto riesgo, evaluar a pacientes con dolor torácico, monitorizar el tratamiento e, incluso, para efectuar una valoración preoperatoria del riesgo cardiovascular<sup>160</sup>.

En la disfunción endotelial existe un desequilibrio en la liberación y/o acción del NO. Además, existen alteraciones en la secreción de agentes vasoconstrictores como la endotelina-1 y de otras sustancias vasodilatadoras como el factor hiperpolarizante derivado del endotelio y la prostaciclina<sup>161</sup>.

Se ha comprobado que el endurecimiento de la pared arterial está relacionado con la función endotelial. Este efecto ha sido ampliamente demostrado en pacientes con DM2, afectando tanto a vasos de pequeño como de gran calibre<sup>162</sup>. Esto puede ser debido a un efecto directo o indirecto de la hiperglucemia<sup>163</sup>, incluyendo la formación de radicales libres de oxígeno, que producirían un incremento de la síntesis de colágeno tipo IV en la pared arterial y un aumento de la resistencia a

la degradación de la matriz colágena. Además, parece que la acumulación de laminina, fibronectina y ácido hialurónico a este nivel pueden tener un efecto importante<sup>164</sup>. De este modo, cuando disminuye la producción de NO y aumenta la liberación de endotelina-1 o angiotensina II, puede afectarse la distensibilidad vascular por un efecto vasotónico a nivel del músculo liso<sup>165</sup>.

### **4.3. Resistencia a la insulina y disfunción endotelial**

La insulina ejerce efectos vasculares beneficiosos incrementando la expresión génica y la actividad de NOS y, por tanto, su biodisponibilidad<sup>166, 167</sup>, estimulando la liberación de NO y la vasodilatación dependiente del endotelio<sup>168</sup> que, a su vez, favorece el transporte y la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina<sup>166</sup>.

La disfunción endotelial asociada a la DM2 parece estar producida por tres mecanismos básicamente: la existencia de un desacoplamiento tanto en la actividad de la NOS endotelial como de la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial y la activación vascular de la NADPH oxidasa. La activación de estas tres vías origina un aumento de la producción de  $O_2^-$  y de peroxinitrito ( $ONOO^-$ )<sup>149</sup>.

La alteración de la VDE asociada con el síndrome de resistencia a la insulina<sup>169</sup> y la obesidad puede ser debida a la exposición prolongada de las células endoteliales a los AGLs y a la glucosa circulantes<sup>163, 170</sup>. En el estudio realizado por Tack y colaboradores, se observó que la respuesta vasodilatadora mediada por la insulina en sujetos obesos podría estar alterada independientemente de la funcionalidad endotelial, produciendo una resistencia vascular a la insulina en el endotelio<sup>171</sup>. Por tanto, la disfunción endotelial puede no sólo ser una consecuencia de la resistencia a la insulina, sino también jugar un papel importante en su producción, originando una alteración postprandial en el incremento de flujo sanguíneo en los tejidos sensibles a la insulina como el músculo esquelético<sup>15</sup>. Además, se ha comprobado que en los pacientes con resistencia insulínica existe un retraso en el transporte de insulina al espacio intersticial que supone un paso limitante de la captación de glucosa a nivel celular, que podría estar mediado por los radicales libres de oxígeno sintetizado a nivel endotelial por aumento del estrés oxidativo<sup>16</sup>.

## **5. ESTRÉS OXIDATIVO**

El estrés oxidativo se ha relacionado con múltiples patologías como la arteriosclerosis, la HTA, el daño por isquemia-reperfusión, la inflamación, la fibrosis quística, el cáncer, la diabetes, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y el envejecimiento<sup>70</sup>. Este último trata de ser explicado mediante la teoría de los radicales libres que defiende que la pérdida progresiva de la función celular a lo largo de los años es debida a un daño acumulativo de los componentes celulares, siendo de vital importancia en este proceso el daño oxidativo producido por las EROs.

Incluso, se ha llegado a relacionar la esperanza de vida de una especie con la producción mitocondrial de  $O_2^{-}$ <sup>172</sup>. Igualmente, se ha comprobado que la ingesta de una dieta hipocalórica produce un aumento de supervivencia en animales de experimentación que se relaciona con menores tasas de generación de  $O_2^{-}$  al disminuir el daño oxidativo tisular<sup>173</sup>.

El estrés oxidativo se define como la existencia de un desequilibrio persistente entre la producción de especies moleculares de alta reactividad [fundamentalmente EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs)] y las defensas antioxidantes produciendo, finalmente, un daño tisular<sup>174</sup>. La síntesis de EROs se debe a la generación de  $O_2^{-}$  al acoplarse un electrón a la molécula de  $O_2$ , que al reducirse mediante la reacción catalizada por la superóxido dismutasa, forma moléculas de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Posteriormente, el  $H_2O_2$  puede transformarse en oxígeno y agua a través de la glutatión peroxidasa o escapar de este sistema antioxidante y convertirse en radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) que pueden iniciar las cascadas de peroxidación lipídicas en las membranas celulares<sup>70</sup>.

Las EROs radicálicas son el  $O_2^{-}$ , el hidroperóxido ( $HO_2^{\cdot}$ ), carbonato ( $CO_3^{\cdot-}$ ), peróxido ( $RO_2^{\cdot}$ ) y alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ ). Otras EROs no radicálicas son, además del  $H_2O_2$ , el HOCl, los hidroperóxidos de ácidos grasos (FAOOH), los aldehídos reactivos y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). En las células vasculares existen múltiples fuentes productoras de EROs como el transporte mitocondrial de electrones, la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa (COX), la NOS y la NADPH oxidasa.

Si se induce una síntesis excesiva de NO durante la inflamación como mecanismo defensivo, se puede producir un daño tisular. Esto es debido a que el  $O_2^{-}$  reacciona con el NO formando  $ONOO^{\cdot}$  que se puede transformar en su forma ácida denominada ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ) que es una especie reactiva muy inestable y, por tanto, con un alto poder oxidante. La participación del  $ONOO^{\cdot}$  en la inflamación puede ponerse de manifiesto mediante la determinación de NT ( $NO_2$ -Tyr)<sup>175, 176</sup>. Esta molécula se genera a partir de la oxidación de  $NO_2^{\cdot}$  por la mieloperoxidasa (MPO) que origina la formación de  $NO_2^{\cdot}$  que a su vez es capaz de nitrosilar a la tirosina. Por tanto, la cuantificación de NT es una medida indirecta de la presencia de  $ONOO^{\cdot}$ . Todas estas moléculas con el NO, el dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ), el catión nitroso ( $NO^+$ ), el anión nitroxilo ( $NO^{\cdot-}$ ), el óxido nítrico ( $N_2O_3$ ), las N-nitrosaminas, los S-nitrosotioles y los ácidos grasos nitrosados, se denominan ERNs<sup>177</sup>.

La acumulación de EROs y ERNs altera numerosas funciones celulares por oxidación directa del DNA, proteínas y lípidos así como a través de los productos generados a partir de la oxidación de estos compuestos<sup>70</sup>. Además, activan vías intracelulares proinflamatorias y proaterogénicas a través del NF- $\kappa$ B, las hexosaminas, las kinasas Jun NH<sub>2</sub>-terminal/proteín kinasas activadas por estrés (JNK/SAPK)<sup>178</sup>, la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa de la proteína activada por mitógeno (KAPAM) (conlleva la activación de las isoformas 1 y 2 de las kinasas relacionadas con la

señalización extracelular (ERK1 y ERK2) que estimulan la proliferación de las células musculares lisas vasculares, la liberación de factores de crecimiento y la migración celular)<sup>179</sup> y la disminución de la sensibilidad a la insulina inactiva las señales de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y de la proteína quinasa B (PKB)<sup>149</sup>. La activación de todas estas vías celulares se relaciona, además de con el desarrollo de las complicaciones tardías de la diabetes, con la resistencia a la insulina y la disfunción de la célula  $\beta$  pancreática<sup>178</sup>.

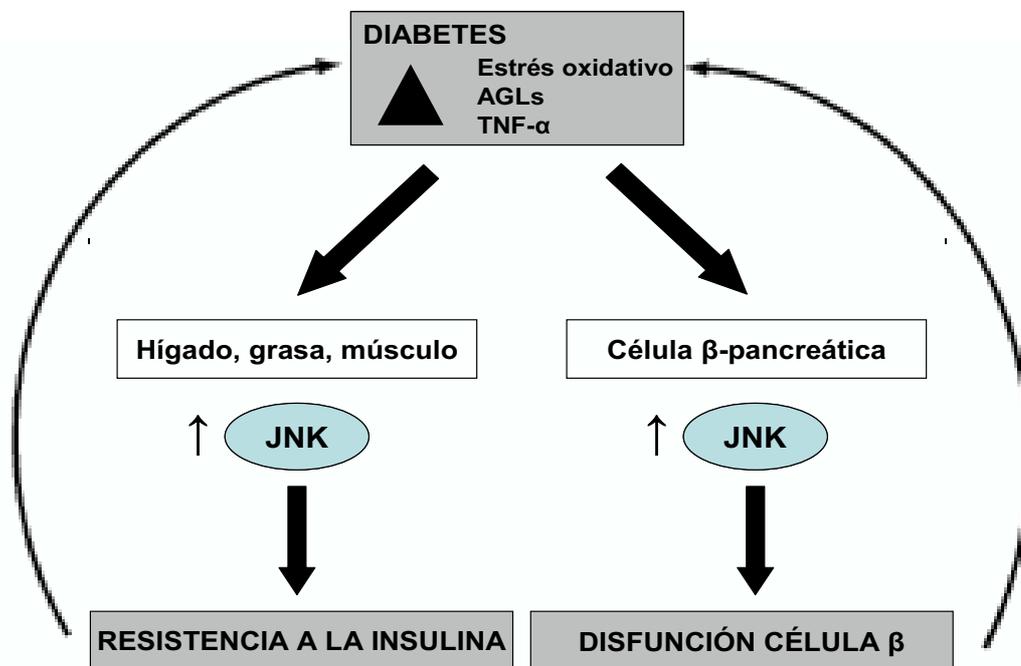
### **5.1. Vía del factor NF- $\kappa$ B**

La transcripción del factor NF- $\kappa$ B es uno de los mecanismos de señalización intracelular más estudiado y parece ser una de las vías de señalización celular inicial, tras el aumento de la síntesis de EROs, que activa el resto de las vías celulares en situación de hiperglucemia<sup>180</sup>. El NF- $\kappa$ B está regulado mediante la degradación por fosforilación de su subunidad inhibidora (I $\kappa$ B) que es mediada por la quinasa  $\beta$  (IKK- $\beta$ ) en respuesta a multitud de estímulos que incluyen los lípidos y las EROs. Cuando esto se produce, el NF- $\kappa$ B puede penetrar en el núcleo celular induciendo la expresión génica<sup>181</sup>. El NF- $\kappa$ B juega un papel fundamental como mediador de la respuesta inmune e inflamatoria, así como en la apoptosis celular ya que regula la expresión de un gran número de genes, incluyendo algunos relacionados directamente con el desarrollo de complicaciones de la diabetes como el factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) y los receptores de los productos finales de la glicación (RPFPG) que, a su vez, ejercen un mecanismo de retroalimentación positivo<sup>178</sup>.

### **5.2. Vía del JNK/SAPK**

La JNK [también conocidas como proteínas-quinasas activadas por estrés (SAPK), proteína-quinasa activadora mitogénica p38 (p38 MAPK) y PKC] son miembros de la compleja superfamilia de las proteínas-quinasas serina/treonina y son conocidas como las quinasas inducidas por estrés, siendo las responsables de una amplia variedad de estímulos inductores de estrés tanto exógenos (AGLs) como endógenos (estrés oxidativo y TNF- $\alpha$ ) en múltiples tipos celulares, incluyendo las células  $\beta$  pancreáticas. En éstas se ha comprobado que la activación de JNK produce una disminución de la expresión génica de insulina mediada por la existencia de estrés oxidativo y que, de forma inversa, la supresión de esta vía enzimática puede proteger a la célula  $\beta$  frente a la oxidación<sup>182</sup>. De este modo, se ha detectado que la vía de JNK está activada en la diabetes y puede estar involucrada en la progresión de la resistencia insulínica<sup>183</sup>. En modelos animales con DM2 y obesidad, homocigotos en una mutación supresora del gen de la JNK1 se ha comprobado una menor activación de este grupo enzimático en el tejido hepático, muscular y adiposo que indicaría cierta protección frente al desarrollo de resistencia insulínica inducida por la obesidad dietética<sup>184</sup>. Por tanto, un déficit de JNK confiere una resistencia parcial frente a la obesidad, la hiperglucemia

y la hiperinsulinemia en modelos diabéticos tanto genéticos como dietéticos, pudiendo ser una futura diana terapéutica en el tratamiento de la diabetes<sup>183</sup>. Además, la ruta metabólica p38 KAPAM parece estar relacionada con la regulación de la expresión de las UCPs aunque su mecanismo de acción es aún desconocido<sup>185</sup>.



**Figura 6.** Mecanismo de acción de la vía JNK. La DM aumenta el estrés oxidativo que produce una activación de las JNK en los diferentes tejidos provocando una mayor disfunción de la célula  $\beta$ -pancreática y el desarrollo de mayor resistencia insulínica.

Figura adaptada de Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T and Matsuoka TA. Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *Rev Diabet Stud* 2004;1:165-74

### 5.3. Vía de la hexosamina

El flujo excesivo de glucosa y AGLs hacia el interior de distintos tipos de células origina la activación de la síntesis de hexosamina que contribuye a la resistencia insulínica<sup>186</sup>. Todas estas vías son sistemas de señalización inducidas por estrés que pueden ser activadas tanto por la presencia de hiperglucemia como por la presencia de EROs. La activación mantenida de estas enzimas se asocia a la aparición de las complicaciones tardías de la diabetes<sup>178</sup>.

Las vías de señalización insulínica mediadas por las kinasas de estrés presentan diferentes dianas o sustratos. Entre ellos destacan la del receptor de insulina (RI)/ sustrato del receptor de insulina (SRI) que pueden ser de dos tipos (SRI-1 y SRI-2). Cuando en los SRI se produce un aumento de la fosforilación de serina disminuye la de tirosina, originando una disminución de la

actividad de la PI3K que produce, finalmente, una disminución en la actividad insulínica<sup>187, 188</sup>. Además, la hiperinsulinemia, a través de esta vía, puede producir efectos proarterogénicos, determinando un desequilibrio entre la PI3K y la actividad mitógena de los factores de crecimiento inducida por la proteín-kinasa, aumentando la expresión de moléculas de adhesión endotelial, favoreciendo la adhesión de los monocitos al endotelio<sup>189</sup> y produciendo un descenso en la actividad de la NOS endotelial<sup>190</sup>. Estos datos han sido obtenidos tanto en modelos animales como en humanos, demostrándose que, por ejemplo, los portadores del polimorfismo Arg<sup>972</sup> del gen que codifica el IRS-1 presentan mayores alteraciones de la función endotelial que los pacientes que presentan otros polimorfismos<sup>191</sup> y, que ésto, explicaría la existencia de mayor evidencia angiográfica de lesiones coronarias en estos pacientes<sup>192</sup>. Esto hecho unido a la acción proinflamatoria de las citoquinas liberadas por el tejido graso (adipoquinas) ocasiona una disminución del NO endotelial que origina un aumento de producción endotelial de aniones  $O_2^-$  y una disminución de la actividad de la NOS, induciendo un estado inflamatorio subclínico que causa la aparición y desarrollo de la aterogénesis y la formación de trombos intravasculares, responsables últimos de los eventos macrovasculares<sup>150, 193</sup>.

Esta situación de sobreexposición a los AGLs se repite diariamente durante la fase posabsortiva provocando una alteración de la función endotelial<sup>59</sup>. De esta manera, si mejoramos la resistencia insulínica y el control glucémico postprandial, se mejorará la función endotelial<sup>163</sup>. Lo que aún no está bien establecido es si la resistencia a la insulina en ausencia de hiperglucemia se asocia a la aparición de complicaciones vasculares, sugiriendo su papel protagonista en la reducción de la vasorreactividad de los pequeños vasos<sup>150</sup>. En diversos estudios epidemiológicos realizados en sujetos sanos con resistencia insulínica sin hiperglucemia e, incluso en sujetos sanos con antecedentes familiares de diabetes, se ha comprobado que existe un mayor riesgo de desarrollar complicaciones vasculares debido a una alteración de la VDE<sup>194, 195</sup>. El estudio de Campia y colaboradores demuestra que una hiperinsulinemia sistémica aguda, en un grupo de sujetos normotensos no diabéticos, se asocia a una alteración de la función endotelial, sobre todo, la dependiente del endotelio, que es independiente del grado de sensibilidad a la insulina y del perfil lipídico. Además, demuestran que una concentración plasmática de insulina similar a la hiperinsulinemia fisiológica durante la fase postprandial induce disfunción endotelial. Esto parece ser debido a que la hiperinsulinemia puede afectar a la función vascular a través de la activación de mecanismos sistémicos y el aumento de la actividad de la endotelina-1<sup>196</sup>. Igualmente, en pacientes sanos, una hiperinsulinemia aguda aumenta la actividad de endotelina-1, uno de los agentes vasoconstrictores más potentes que es sintetizado en la pared arterial, constituyendo un regulador muy importante de la formación de la neoíntima tras un daño vascular y con actividad mitógena que puede inducir la aparición de arteriosclerosis<sup>197, 198</sup>.

## 5.4. Estrés oxidativo, glucotoxicidad y disfunción endotelial

La glucotoxicidad se describe como el deterioro progresivo de la función de la célula  $\beta$  pancreática y el incremento de la resistencia insulínica, debida a la existencia de una hiperglucemia mantenida por una alteración de la síntesis y la secreción de insulina<sup>199</sup>. El aumento de la concentración plasmática de glucosa produce un aumento del estrés oxidativo mediante la activación de diferentes vías metabólicas<sup>200</sup>. Entre ellas, destacan la propia oxidación de la glucosa, la formación de productos de la glicosilación avanzada y la activación de la vía del poliol que llevan a la producción de EROs en los diferentes tejidos<sup>201</sup>, evidenciado a través del incremento de los niveles ADN, proteínas y lípidos oxidados<sup>200</sup>. Junto a la acción propiamente nociva de estas moléculas, el aumento del estrés oxidativo activa una serie de respuestas celulares como la de la PKC, la transcripción del factor NF- $\kappa$ B y las kinasas JNK asociadas al estrés<sup>202</sup>.

La metabolización del exceso de glucosa intracelular se produce a través de diferentes rutas metabólicas como la de la aldosa reductasa, la fosforilación oxidativa mitocondrial, la activación de las NADPH oxidasas y la alteración del cociente NADPH/NADP. De hecho, se cree que la mayoría de las moléculas oxidantes inducidas por la glucosa derivan del exceso de producción de  $O_2^-$  por la cadena de transporte de electrones mitocondrial<sup>201</sup>. Los productos de este proceso actuarían como activadores del resto de vías como la activación de la PKC, la producción de hexosamina, la activación de la aldosa reductasa y la producción de moléculas glicosiladas.

La activación de la aldosa reductasa transforma la glucosa en sorbitol y éste, a su vez, es metabolizado a fructosa mediante la acción de la enzima sorbitol deshidrogenasa. Estos tres azúcares, especialmente la fructosa y el sorbitol, producen la glicosilación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que, finalmente, inducen la formación de radicales libres. Además, el acúmulo de sorbitol aumenta la presión oncótica, disminuye la concentración de mioinositol y altera el equilibrio redox intracelular<sup>203</sup>. Por otro lado, el aumento de la captación de glucosa por la célula, estimula a la PKC que, a su vez, activa a distintas enzimas prooxidativas como la peroxidasa y la COX, induce la formación de citoquinas proinflamatorias y de EROs e incrementa la actividad de la vía del poliol, que deplecciona a la célula de NADPH, disminuyendo la vía redox del glutatión, que es uno de los mecanismos fundamentales de eliminación de radicales libres. La activación de esta vía induce, además, la activación de la COX e incrementa los niveles citosólicos de NADH, contribuyendo todo ello al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Toda esta cascada enzimática conlleva una mayor formación de  $O_2^-$  en la cadena mitocondrial de transporte de electrones. Otra acción de la glucosa es promover la oxidación de la  $BH_4$  por el  $ONOO^-$ . Esta molécula imprescindible para controlar la estrecha regulación que existe sobre la producción del NO a partir de L-arginina y  $O_2$ . Cuando disminuye la concentración de  $BH_4$ , se produce una alteración de la función de la NOS endotelial que hace que ésta transfiera los electrones al  $O_2$  en

vez de a la L-arginina, produciéndose  $O_2^-$  en vez de NO, generando de este modo mayor estrés oxidativo<sup>204</sup>. Igualmente, se ha comprobado que la hiperglucemia mantenida aumenta la glicosilación de proteínas plasmáticas que interactúan con receptores específicos endoteliales, aumentando la producción de EROs<sup>205</sup>. Otros efectos de la hiperglucemia son la glicosilación de las lipoproteínas y la peroxidación del colesterol LDL por el incremento de EROs como el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  y radicales  $OH^-$ <sup>149</sup> y de ERNs como el  $ONOO^-$ <sup>190</sup>. Por último, la glucosa promueve la isquemia, que causa una disminución de la actividad mitocondrial y un aumento de formación de radicales libres por el daño tras la reperfusión<sup>150</sup>. Todos estos procesos confluyen originando un desacoplamiento en la síntesis de NO, que aumenta la transferencia de electrones a moléculas de  $O_2$ , formándose una mayor cantidad de  $O_2^-$  y de  $ONOO^-$ , que son compuestos con un enorme poder oxidante<sup>149</sup>.

Los fenómenos comentados previamente están ampliamente descritos en situaciones de alteraciones del metabolismo glucídico, ya sea en estados prediabéticos como en la diabetes mellitus establecida. Igualmente, se han realizado distintos estudios para comprobar si en sujetos sanos, tras una sobrecarga oral de glucosa (SOG), se producen alteraciones de la función endotelial. Este es el caso del estudio realizado por Kawano y colaboradores, en el que comprobaron que tras la administración de una SOG se produce una reducción de la VDE que se acompaña de un aumento plasmático de radicales libres de oxígeno<sup>206</sup>.

## **6. LA DISLIPEMIA DIABÉTICA**

La dislipemia asociada típicamente a la DM2 se caracteriza por la presencia de una disminución de las cifras plasmáticas de HDL, hipertrigliceridemia por aumento de las partículas de remanentes de quilomicrones y una modificación en la estructura de las partículas de LDL haciéndolas pequeñas y densas, más vulnerables a la oxidación y con mayor capacidad para penetrar en la íntima y unirse a los proteoglicanos<sup>15, 16</sup>. La etiología de esta dislipoproteinemia es multifactorial y parece estar relacionada con un mal control glucémico, la existencia de hiperinsulinemia y de resistencia a la insulina y con una alteración en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos y de las lipoproteínas<sup>149</sup>.

### **6.1. Cambios específicos en la composición de las lipoproteínas en la diabetes tipo 2**

1. Enriquecimiento de ésteres de colesterol de las VLDL y de triglicéridos de las LDL y HDL por un aumento del "pool" circulante de VLDL y por el aumento del intercambio lipídico mediado por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CEPT)<sup>207</sup>.

2. Aumento de la actividad de la proteína transportadora de fosfolípidos que contribuye a la hipertrigliceridemia y a cambios en la composición de la HDL<sup>208</sup>.
3. Aumento de la lipólisis de las moléculas de HDL y LDL ricas en triglicéridos debido a un aumento de actividad de la lipasa pancreática, conllevando la producción de LDL pequeñas y densas.
4. Cambios en el tamaño de la HDL (disminución de HDL2 y HDL3) por la disminución plasmática de la apolipoproteína A-I (apoA-I) y de las HDL ricas en apoA-I y apolipoproteína A-II (apoA-II)<sup>208</sup>.
5. Disminución de la concentración plasmática de HDL que implica una reducción del transporte reverso de colesterol y una disminución de los efectos antiaterogénicos de esta lipoproteína<sup>11, 209</sup>.

## **6.2. Efectos específicos de cada una de las lipoproteínas sobre la función endotelial**

La dislipemia es uno de los factores más importantes en el desarrollo de la disfunción endotelial asociada a la DM2. Se han realizado múltiples estudios sobre este tema, encontrándose una correlación significativa entre la alteración de la VDE en las arterias del brazo y los cambios lipídicos plasmáticos que se producen en esta patología.

A continuación, se procederá a describir el efecto de cada subfracción lipídica sobre la función endotelial.

### **1. LDL**

Como se ha mencionado con anterioridad, las partículas de LDL pequeñas y densas son altamente susceptibles a la oxidación, especialmente cuando están glucosiladas o sujetas a un ambiente de estrés oxidativo como ocurre en la diabetes tipo 2<sup>210</sup>. La LDL nativa, por sí misma, puede alterar la función endotelial al aumentar la producción y liberación de dimetil-arginina asimétrica que inhibe a la NOS endógena<sup>211</sup>. Cuando la molécula de LDL se oxida (LDLox), puede alterar la VDE<sup>163</sup>, afectando distintos mecanismos como el descenso de la expresión génica de NOS endotelial<sup>212</sup>, la estimulación de la PKC<sup>213</sup>, la alteración de señal de la proteína G<sup>214</sup> y el aumento de la síntesis de endotelina-1<sup>215</sup> y de la expresión de los receptores endoteliales de angiotensina II, alterando así la síntesis de NO, la vasodilatación y estimulando la actividad de la NADPH oxidasa. Además, parece que en pacientes con DM2, la LDLox estimula la expresión de citoquinas aterogénicas a nivel endotelial<sup>216</sup>. Ambas moléculas (LDL nativa y LDLox) pueden alterar la actividad de NOS endotelial al aumentar la expresión de caveolina-1<sup>217</sup>, cuya función es unirse a la NOS endotelial y evitar su activación mediante el complejo calcio-calmodulina. En los

estudios realizado por Paniagua y colaboradores, se demostró la existencia de una relación inversa entre el incremento de los niveles de LDLox y la VDE medida en la arteria braquial<sup>163</sup>.

## 2. VLDL y quilomicrones

Durante el periodo postprandrial se produce una alteración de la función endotelial en el que parece que subyacen dos mecanismos fundamentales<sup>218, 219</sup>. El primero de ellos es el acúmulo de lipoproteínas remanentes (tanto VLDL como quilomicrones) que podrían causar la alteración de la activación de la vía arginina/NO mediada por el receptor acoplado a la proteína G<sup>220</sup>. Además, parece existir una asociación significativa e independiente entre la concentración de remanentes y la alteración de la VDE, comprobada en estudios realizados en humanos a nivel coronario<sup>221</sup>. El segundo mecanismo es debido al incremento del estrés oxidativo que producen estos remanentes de lipoproteínas<sup>222</sup>, tanto durante la fase postprandial inmediata como durante la tardía. En el estudio realizado por Paniagua y colaboradores, se demostró la existencia de una asociación inversa entre el incremento de la producción leucocitaria de superóxido y la VDE medida en la arteria braquial<sup>163</sup>.

## 3. HDL

Las HDL son partículas con un alto contenido proteico (50 %) y relativamente ricas en fosfolípidos (30 %). Generalmente, las HDL son divididas en dos subclases: HDL<sub>2</sub> y HDL<sub>3</sub> siendo las primeras más grandes y menos densas. La principal función reconocida de las HDL es el transporte reverso de colesterol que se define como la ruta del colesterol desde las células periféricas como son las células espumosas de la íntima vascular hacia el hígado. Para que este proceso se lleve a cabo, es esencial que se produzca la unión de la partícula de HDL a su receptor específico, permitiendo la internalización de la HDL en la célula. En el estudio realizado por Paniagua y colaboradores en pacientes diabéticos, demuestran que tras un mejor control metabólico de los diabéticos, la reducción de los niveles de insulinemia plasmática se relacionó inversamente con un incremento de la capacidad de unión específica de la HDL<sub>3</sub>, indicando una posible relación de la resistencia a la insulina con la disminución de los niveles de HDL<sub>3</sub> observada en estos pacientes<sup>11</sup>.

Además, las partículas de HDL evitan la oxidación de las LDL a través de la activación plaquetaria del factor acetil-hidrolasa y de la paraoxonasa (especialmente la isoenzima 1). Estas enzimas asociadas al HDL hidrolizan los lípidos hidroperoxidados de las partículas de LDL. En la diabetes mellitus tipo 2, existe una disminución o alteración de las moléculas de HDL que se asocia a un descenso de la actividad de la paraoxonasa, aumentándose así la oxidación de las LDL<sup>223</sup>. De forma inversa, se ha demostrado que la HDL mejora la función endotelial al disminuir la expresión de moléculas de adhesión endotelial estimuladas por la LDLox<sup>224</sup>. Asimismo, parece que en la

diabetes se produce una disminución de los niveles de apoA-I y del cociente de las partículas de lipoproteína A (LpA) LpA-I:A-II, que conlleva niveles bajos de colesterol HDL<sub>3</sub><sup>225</sup>.

#### 4. Ácidos grasos libres

En estudios *in vitro* se ha comprobado que niveles elevados de AGLs producen múltiples efectos adversos sobre la función mitocondrial, incluyendo el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la producción de EROs<sup>226</sup>. Otros efectos añadidos son la inhibición de todas las grandes vías de utilización de HC incluyendo la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y la glucólisis tanto oxidativa como no oxidativa<sup>227</sup>. La razón de esta inhibición sobre las distintas acciones de la insulina parece estar producida por tres efectos diferentes de los ácidos grasos: un defecto en la oxidación de los HC<sup>228</sup>, aumentando la glucólisis no oxidativa, una alteración del transporte y/o fosforilación de la glucosa y un defecto de la glucógeno-sintetasa muscular al acumularse en las fibras musculares<sup>227</sup>. Si el almacenamiento de triglicéridos se produce en la célula  $\beta$  pancreática, desencadena la producción de apoptosis celular, la reducción de la secreción insulínica y, finalmente, el desarrollo de una diabetes franca<sup>24</sup>.

En la DM2, la lipólisis de lipoproteínas ricas en triglicéridos y el aumento de la liberación de ácidos grasos no esterificados (AGNEs) por los adipocitos mediado por la activación hormonal de la lipasa, puede contribuir al daño endotelial<sup>229</sup>. Su mecanismo de acción podría ser a través de la inhibición de la NOS endotelial o de la producción de EROs<sup>230, 231</sup>. De este modo, también se explicaría la disfunción endotelial que se produce en pacientes diabéticos tras la ingesta de una comida grasa.

### **6.3. Metabolización postprandial de triglicéridos como posible mediadora de la aparición de resistencia insulínica y estrés oxidativo**

Durante el periodo postprandial, se produce el almacenamiento de ácidos grasos en distintos tejidos constituyendo una fuente de liberación retardada de AGLs. La concentración de AGLs plasmáticos es la principal causa de la asociación entre grasa e insulino-resistencia ya que éstos ejercen acciones inhibitorias sobre la captación de glucosa mediada por insulina tanto en personas no diabéticas<sup>232</sup> como en pacientes con DM2. En personas sanas, la administración de AGLs causa un incremento del estrés oxidativo debido a un aumento en los niveles de malondialdehído (molécula altamente tóxica producida, en gran parte, por la oxidación lipídica y las EROs) y a una reducción del cociente de glutatión reducido/oxidado<sup>233</sup>. Si los triglicéridos se acumulan en el endotelio, el aumento de ácidos grasos origina una alteración mantenida de la VDE, promoviendo por tanto, un daño endotelial crónico<sup>234</sup>. Además, las tasas de producción de

glucosa hepática postabsortiva son mayores en pacientes con DM2 que en los controles aunque la supresión de la producción de glucosa hepática parece ser normal<sup>186, 227</sup>.

Cuando existe resistencia insulínica, tras la ingesta también se estimula la síntesis hepática de VLDL ricas en triglicéridos, específicamente las de gran tamaño llamadas VLDL1, lo que retrasa el aclaramiento de quilomicrones por saturación competitiva de la lipoproteín-lipasa (LPL) y por la actividad de los receptores de VLDL y de remanentes de quilomicrones intrahepáticos. Esto parece ser debido a un aumento en el intercambio de AGLs desde el tejido adiposo al hígado, aumentando el contenido graso hepático, y a la disminución del efecto inhibitorio que ejerce la insulina sobre la secreción hepática de la apolipoproteína B (apoB)<sup>235</sup>. En pacientes con obesidad e insulino-resistencia, se estimula la producción y liberación de AGLs desde los adipocitos y éstos, a su vez, inducen mayor resistencia a la insulina y mantienen una situación de hiperglucemia. Su mecanismo de acción parece ser múltiple, produciendo una inhibición de la NOS, y por tanto, una disminución de NO que produce una alteración de la función endotelial y un aumento de los radicales libres de oxígeno que se ve agravado por la mayor generación de los mismos por un incremento de la peroxidación lipídica. Igualmente, la pérdida de glicosaminoglicanos inducida por los radicales libres de oxígeno, puede ocasionar un descenso de la actividad capilar de la LPL endotelial, contribuyendo a la aparición del perfil lipídico característico de los pacientes con resistencia a la insulina y con DM2.



### **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La UCP2 es una proteína que se localiza en la membrana interna mitocondrial y está acoplada a la cadena de transporte de electrones y, por tanto, a la síntesis de energía. La mayoría de los pacientes con resistencia a la insulina experimentan un deterioro paulatino del metabolismo hidrogenocarbonato que conduce a un incremento del estrés oxidativo. Este ambiente prooxidante induce la expresión de UCP2 como mecanismo contrarregulador cuya finalidad es proteger a la célula de la oxidación. Nuestra hipótesis es que dado que tanto los AGLs como las EROs y las ERNs son inductores de la expresión génica de UCP2, la ingesta de diferentes dietas con distinta composición grasa y de HC podría modificar el grado de estrés oxidativo y por tanto, de expresión de dicha proteína.



## **IV. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

Estudiar la expresión génica de UCP2 en el tejido adiposo periférico en personas con sobrepeso de distribución central, resistencia a la insulina y antecedentes familiares de DM2 con sobrepeso, tras la administración de tres modelos de dieta en fase de mantenimiento de peso: una mediterránea rica en aceite de oliva, otra rica en hidratos de carbono y una tercera rica en grasas saturadas.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

1. Comparar el efecto de cada modelo de dieta sobre la reactividad endotelial microvascular.
2. Determinar el efecto de los tres modelos de dieta sobre los niveles basales y postprandiales de LDL-ox y nitrotirosina.
3. Analizar las modificaciones que se producen en el perfil lipídico y en el metabolismo hidrogenocarbonato tras la ingesta de cada una de las dietas.



# V. DISEÑO Y METODOLOGÍA

## 1. POBLACIÓN

### 1.1. Proceso de selección de los participantes

Los pacientes fueron reclutados de registros de pacientes diabéticos de cinco centros de Atención Primaria del Distrito Córdoba – Centro. Los participantes en este estudio debían tener sobrepeso de distribución abdominal, antecedentes familiares de DM2 y presentar resistencia a la insulina. Se hizo una preselección de 59 personas a las que se les realizó una historia clínica completa, medidas de peso, altura, perímetro de cintura, cálculo del índice de masa corporal (IMC), TA y realización de estudios bioquímicos.

Las pruebas de laboratorio incluían la determinación de una hematimetría con fórmula leucocitaria y recuento, glucemia determinada mediante el método de la glucosa oxidasa, hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), urea, creatinina, sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, magnesio, proteínas totales, aspartato aminotransferasa (AST), alanino aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, gammaglutamiltranspeptidasa (GGT), colesterol total y subclases (HDL y LDL), triglicéridos, determinaciones hormonales de hormona estimulante del tiroides (TSH), tiroxina (T4 libre) e insulinemia basal. Además, en la orina recogida en 24 horas se determinaron la microalbuminuria, creatinina, urea e iones.

De los voluntarios seleccionados inicialmente, 27 fueron excluidos porque no cumplían los criterios de selección (n=18) o por rechazar participar en el estudio (n=9). A los pacientes restantes (n=22) se les realizó una prueba de SOG y se les extrajo una muestra sanguínea mediante cateterización de la vena antecubital a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos. Tras la determinación de los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, se calculó el índice de sensibilidad insulínica de Matsuda (ISIm) y, finalmente, se seleccionaron 11 pacientes (4 hombres y 7 mujeres) que presentaban un ISIm < 4 (indicador de resistencia a la insulina; a menos valor, mayor resistencia)<sup>236</sup>.



**Figura 7.** Proceso de selección de los participantes en el estudio

## 1.2. Criterios de inclusión

1. Edad comprendida entre los 35 y 75 años.
2. Uno o ambos padres con DM2 y obesidad, demostradas mediante los datos obtenidos de los antecedentes familiares de la historia clínica (toma de tratamiento hipoglucemiante e IMC > 25 Kg/m<sup>2</sup>).
3. IMC > 25 Kg/m<sup>2</sup> con una distribución centripeta de la grasa corporal (perímetro de cintura > 102 en hombres y > 88 en mujeres).
4. Historia de glucemia plasmática basal < 125 mg/dl y HbA<sub>1c</sub> < 6,5% sin tratamiento previo con antidiabéticos orales ni insulina.
5. Índice de sensibilidad a la insulina de Matsuda < 4. Este índice se calcula a partir de los valores basales de glucosa e insulina y de valores medios de glucosa e insulina obtenidos tras una SOG.  $ISIm = 10^4 / (\text{Glucosa basal} \times \text{Insulina basal}) \times (\text{Glucosa plasmática media} \times \text{Insulina plasmática media})$ .
6. En el caso de las mujeres, menopausia confirmada mediante cuantificación de los niveles de hormona folículo-estimulante (FSH) >40 UI/L y ausencia de menstruación durante un periodo superior a 1 año.

### **1.3. Criterios de exclusión**

1. Signos de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y/o neuropatía) y macrovasculares diabéticas.
2. Consumo de alcohol o tabaquismo.
3. Tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes, diuréticos, esteroides o cualquier medicación que pueda alterar el metabolismo glucídico.
4. Enfermedad renal, hepática, tiroidea o adrenal.

### **1.4. Cálculo del tamaño muestral**

El cálculo del tamaño muestral se realizó a partir de los resultados de trabajos previos descritos en la bibliografía<sup>237</sup>:

- Variable principal del estudio: Variación de la expresión génica de UCP2 en tejido graso periférico.
- Desviación estándar de la variable principal del estudio: 30
- Diferencia mínima esperada: 35% ( $H_0= 82,8$  ;  $H_1= 53,82$ )
- Riesgo alfa = 0,05
- Potencia ( $1-\beta$ ) = 0,90

En base a estas premisas se precisan como mínimo un total de 9 participantes.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía.

## **2. DISEÑO DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES**

Tras la selección inicial de los voluntarios y la obtención del consentimiento informado, los 11 participantes, de forma aleatoria y en un diseño cruzado de cuadrados latinos de Williams, siguieron tres periodos de dieta de 28 días de duración: una rica en grasa SAT con una composición del 47% HC, 15% proteínas y 38% grasas (23% SAT, 9% MONO, 6% POLI), otra pobre en grasa y rica en HC consistente en un 65% HC, 15% proteínas y 20% grasas (6% SAT, 8% MONO y 6% POLI) y una tercera rica en MONO con un 47% HC, 15% proteínas y un 38% grasas (9% SAT, 23% MONO y 6% POLI), Posteriormente, todos los pacientes fueron sometidos, secuencialmente, a las otras dos dietas hasta completar un total de 12 semanas. La composición de cada una de las dietas se detalla en la tabla 3.

**Tabla 3:** Composición de las dietas

DIETA	Grasas	Proteínas	Hidratos de carbono	Fibra
<b>SAT</b>	38% (23% SAT, 6% POLI, 9% MONO)	15%	47%	27 g/d
<b>HC</b>	20% (6% SAT, 6% POLI, 8% MONO)	15%	65%	32 g/d
<b>MONO</b>	38% (9% SAT, 6% POLI, 23% MONO)	15%	47%	29 g/d

El diseño de las dietas experimentales se basó en la sustitución de las grasas SAT por HC en la dieta pobre en grasas mientras que en la dieta alta rica en grasas, los MONO sustituyeron a las grasas SAT.

El total energético se determinó usando los factores de conversión de 16,74 KJ (4 Kcal) para el g de proteína, 16,74 KJ (4 Kcal) para el g de hidratos de carbono y 37,66 KJ (9 Kcal) para el g de grasa<sup>33</sup>. Las dietas fueron preparadas de acuerdo a las necesidades calóricas calculadas mediante un estudio de calorimetría indirecta basal y la fórmula de Harris-Benedict y sumando la actividad individual<sup>238</sup>. Durante los periodos de intervención el peso medio de los participantes de mantuvo sin cambios significativos.

El aceite de oliva constituyó la principal fuente de grasa monoinsaturada en la dieta alta en MONO. La composición de fibra dietética de las dietas enriquecidas en grasas SAT y MONO fue de 27 y 29 g/d respectivamente, siendo el contenido medio de fibra de la dieta rica en HC de 32 g/d. A los pacientes se les permitió el consumo moderado de café, té y bebidas bajas en calorías.

Las composición de las dietas experimentales se calculó usando el programa DIETSOURCE v.1.2. (Novartis, Barcelona, España). Todas ellas estaban constituidas por alimentos naturales y su composición se ajustó usando las unidades de las tablas de alimentos de United States Department of Agriculture (USDA)<sup>239</sup> y las tablas de composición de alimentos española para alimentos locales<sup>240</sup>. La ingesta energética se distribuyó entre el desayuno (22%), comida (33%), merienda (12%) y cena (33%).

Todos los pacientes fueron controlados mediante monitorización e instrucciones telefónicas semanalmente. El control y adherencia de los voluntarios a la dieta se realizó mediante el análisis de la composición en ácidos grasos en el suero al final de cada uno de los periodos de intervención dietética mediante cromatografía de gas<sup>33</sup>.

Al final de cada periodo dietético y tras 12 horas de ayuno, se administró a cada participante un desayuno de 443 Kcal que debía ingerir en 10 minutos. La composición del desayuno fue la

siguiente, basada en la dieta que consumía cada individuo en cada período de intervención dietética:

- Desayuno rico en HC: 200 ml de leche desnatada, 50 g de pan y 75 mg de mermelada
- Desayuno rico en grasa MONO: 200 ml de leche desnatada, 50 g de pan y 27 cc de aceite de oliva con un contenido del 72,5% de MONO.
- Desayuno rico en grasa SAT: 200 ml de leche entera, 50 g de pan y 25 g de mantequilla con un 72% de SAT.

### **3. CALORIMETRÍA INDIRECTA**

La producción de energía (PE) y el cociente respiratorio (QR) fueron estimados mediante calorimetría indirecta continua usando un sistema de análisis computerizado de flujo gas a través de una cánula (Deltatrac; Datex, Helsinki, Finland). El sistema fue calibrado previamente con mezclas de gases estándar, realizándose comprobaciones de su correcta calibración a lo largo de la realización de las pruebas. El sistema usado posee una precisión con una tasa de error menor del 1% para la medición de la tasa de consumo de oxígeno ( $\dot{V}O_2$ ) o la producción de dióxido de carbono ( $\dot{V}CO_2$ ). El gasto energético (GE) fue cuantificado tras un periodo de equilibrado de 10 min. El registro de la tasa de intercambio gaseoso fue realizado durante 30 minutos en estado basal. Las tasas de desaparición (TD, g/min) de glucosa, lípidos y proteínas fueron calculadas a partir de las fórmulas calorimétricas conociendo los valores de  $\dot{V}O_2$  y  $\dot{V}CO_2$  (L/min) y la excreción urinaria de nitrógeno (N, g/min)<sup>241</sup>. La tasa de oxidación de proteínas fue estimada a partir de la excreción de nitrógeno urinario (1 g nitrógeno = 6.25 g proteínas) en muestras de orina de 12 horas recogidas la noche previa a la realización del estudio.

Las ecuaciones usadas fueron las siguientes:

1. Oxidación de Glucosa ( $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ) =  $[(4.55 \times \dot{V}CO_2) - (3.21 \times \dot{V}O_2) - (2.87 \times N \text{ urinario})]$

2. Oxidación de grasas ( $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ) =  $[(1.67 \times \dot{V}O_2) - (1.67 \times \dot{V}CO_2) - (1.92 \times N \text{ urinario})]$

Donde  $\dot{V}CO_2$  y  $\dot{V}O_2$  están expresados en  $L \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$  y el N urinario en  $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ .

3. Oxidación proteica ( $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ ) =  $N \text{ urinario} \times 6.25$

Donde el N urinario es equivalente a la excreción de nitrógeno expresado en  $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ , siendo 6.25 el factor de conversión de nitrógeno a proteínas.

En general, las ecuaciones usadas están muy cercanas al cálculo exacto de las tasas netas de oxidación de lípidos, glucosa y proteínas y del cálculo de la síntesis neta de lípidos a partir de la glucosa. Estas ecuaciones deben interpretarse de forma diferente si existe lipogénesis neta a partir de HC. Cuando, por ejemplo, el QR no proteico es  $>1.0$  o existe lipogénesis neta o la

oxidación lipídica tiene un valor negativo, la medición de la estimación y el valor real de la oxidación de HC difieren en el equivalente de glucosa de la grasa sintetizada. En estas circunstancias, la oxidación real de HC es menor que el valor obtenido. También se sabe que la lipogénesis puede ocurrir en algunos tejidos con un QR <1.0. En este caso, la tasa de oxidación de HC calculada representa el valor real, la cantidad de glucosa convertida en grasa durante la lipogénesis y una contribución desconocida pero despreciable de la gluconeogénesis<sup>242</sup>.

## **4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS**

### **4.1. Extracciones sanguíneas**

Al final de cada uno de los periodos de intervención dietética, tras 12 horas de ayuno, se extrajeron 15 ml de sangre venosa empleando agujas Venoject® (Terumo™) en tubos conteniendo 1 mg.dL<sup>-1</sup> de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y tubos con citrato sódico al 3,8% (Vacutainer™) en los tiempos -5, 0, 60, 120 y 180 minutos. La orina se almacenó en botes de plástico.

### **4.2. Determinaciones bioquímicas básicas**

Inmediatamente después de la extracción sanguínea, se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación a 3.000 revoluciones por minuto (10 min, 1.500 g, 4°C). Posteriormente, las muestras de plasma y orina fueron alicuotadas, refrigeradas y congeladas posteriormente a -30°C. Para reducir las variaciones interensayo entre determinaciones, todas ellas fueron realizadas conjuntamente al finalizar el estudio. En el minuto 0 se determinaron hematimetría con fórmula leucocitaria y recuento, glucemia por el método de la glucosa-oxidasa, HbA<sub>1c</sub> medida en sangre fresca mediante cromatografía líquida de alta resolución (Bio-Rad, Paris, France), urea, creatinina, sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, magnesio, fosfatasa alcalina, GGT, y proteínas totales. Para la determinación de AST y ALT se usó un autoanalizador Hitachi PA Hitachi P-800 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) por métodos enzimáticos calorimétricos (Biosystem, Barcelona, Spain; coeficiente de variación intraensayo <6% y <2% respectivamente). El colesterol total y los triglicéridos fueron determinados mediante técnicas enzimáticas colorimétricas con los métodos CHOD-PAP y GPO-PAP (Boehringer, Mannheim, Germany) respectivamente, utilizando un calibrador universal (Roche™, Basilea, Suiza) y controles ciegos (Vitro). Los valores de HDL fueron determinados por precipitación de las proteínas que contenían ApoB con fosfotungstato/magnesio y la fracción de LDL calculado a partir de la fórmula de Friedewald<sup>243</sup>. Las concentraciones de Apo A1 y Apo B100 se determinaron por métodos inmunoturbidimétricos (Boehringer, Mannheim, Germany). Las determinaciones hormonales de TSH, T4 libre e insulinemia basal fueron medidas mediante un método de inmunoensayo enzimático de

micropartículas (Abbott Diagnostics, Matsudo-shi, Japan; CV 2,5-6%). Además, en la orina recogida en 24 horas se determinaron la microalbuminuria, creatinina, urea e iones.

### **4.3. Determinación de los ácidos grasos plasmáticos**

Los composición y cuantificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos se realizó en Instituto de la Grasa de Sevilla que pertenece al Consejo Superior de Investigaciones Científicas usando una técnica fluorimétrica<sup>244</sup>. Tras 12 horas de ayuno, se procedió a la extracción de una muestra sanguínea que fue colocada en tubos conteniendo EDTA. Las muestras fueron centrifugadas y el plasma se almacenó en alícuotas de 0,5 mL y fueron congeladas a -70 °C hasta la realización del análisis del contenido de ácidos grasos. Todos los lípidos plasmáticos se extrajeron en 0,5 mL de metanol, se añadió 1 mL de cloroformo y posteriormente, el pool de extractos disueltos fueron secados en una atmósfera de nitrógeno. Los fosfolípidos plasmáticos fueron separados mediante cromatografía de capa gruesa unidimensional en una columna de 60 - m (0.25 mm) SP-2380 (Supelco, Bellefonte, PA) y fueron medidos mediante un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard 5890 (Hewlett-Packard, Avondale, PA) equipado con un inyector automático (Agilent 6890 II), un detector de llama ionizada y el software CHEMSTATION y MUSTANG (Hewlett-Packard) para el tratamiento de datos. El hidrógeno se utilizó como transportador de gas. La cantidad relativa de cada ácido graso (% total de ácidos grasos) fue cuantificada integrando el pico en el área bajo la curva (ABC) y dividiendo el resultado entre el área total de todos los ácidos grasos. La precisión intraensayo presentó una variación del 2% al 5%, dependiendo del tamaño del pico a medir<sup>33</sup>.

### **4.4. Cuantificación de las partículas de LDL oxidada**

Para la determinación de los niveles de LDL-ox, se procedió a la extracción de sangre venosa y se anticoaguló con K<sub>3</sub>EDTA (2 mg/ml), conservándola en hielo. La concentración circulante de LDL-ox se cuantificó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utilizando un anticuerpo monoclonal murino (mAB-4E6-) comercializado (Oxidized LDL ELISA, Mecordia, Upsala, Sweden; límite de detección < 1 mU/l; coeficiente de variación intraensayo en nuestro laboratorio: 5,5 - 6,2%). El anticuerpo monoclonal está específicamente dirigido frente a un epítipo de la apoB-100 de la superficie de la LDL que se produce al sustituir los aldehídos de la apolipoproteína B-100 por, al menos, 60 residuos de lisina. Los aldehídos son liberados por las células endoteliales sometidas a estrés oxidativo por peroxidación lipídica o por las plaquetas activadas que también pueden producir modificaciones oxidativas de la apolipoproteína B-100 en ausencia de lipoperoxidación. La especificidad de la prueba es excelente. Los valores de C<sub>50</sub> (concentración necesaria para obtener una inhibición del 50% de la fijación del anticuerpo en la ELISA) son 25 mg/dl de LDL nativa obtenida mediante ultracentrifugación del plasma de

voluntarios sanos y 0,025 mg/dl de LDL-ox con un mínimo de 60 aldehídos sustituidos por lisina por apolipoproteína B-100 obtenida mediante oxidación inducida por cobre iónico de la misma LDL. De este modo, una concentración plasmática de LDL de 160 mg/dl puede contribuir a la obtención de una concentración de LDL-ox <0,2 mg/dl<sup>163</sup>.

#### **4.5. Cuantificación de Nitrotirosina**

La existencia de estrés oxidativo condiciona un aumento en la producción de  $O_2^-$  y de NO que, al reaccionar, producen ONOO<sup>-245</sup>. Esta molécula es un potente oxidante capaz de inducir la oxidación de las LDL<sup>246</sup>, causar disfunción endotelial<sup>247</sup> y producir la nitrosilación de los residuos de tirosina de las proteínas. Dada que la producción de ONOO<sup>-</sup> es difícil de medir, se ha propuesto la determinación de los niveles de nitrotirosina en las proteínas como marcador indirecto de la producción de ONOO<sup>-248</sup> y, por tanto, de estrés oxidativo. Los niveles de nitrotirosina plasmática expresados en  $\mu\text{mol/l}$  se determinaron con un kit comercial de ELISA basado en el principio del sandwich con anticuerpos monoclonales (clon HM.11) según el método descrito por Ceriello y colaboradores<sup>249</sup> (Nitrotyrosina Elisa Test Kit, HyCult Biotechnology B.V., Netherlands; límite de detección < 2nM, siendo el rango de concentraciones detectables de 2-1500 nM).

### **5. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN EL TEJIDO ADIPOSO PERIFÉRICO**

Para la obtención de las muestras de tejido adiposo periférico se empleó una pistola Bard® Magnum (ref. MG1522), con agujas Bard® Magnum Core (ref. MN1410), conservando posteriormente las muestras obtenidas en solución conservante de ARN (7020 RNA Later®, Ambios, Austin, Texas, EEUU) a -80°C. Las muestras se tomaron del cuadrante superior externo del glúteo de los participantes a los 180 minutos de la ingesta del desayuno con la proporción de nutrientes establecida en cada periodo de dieta. Para el protocolo de aislamiento de ARN del tejido graso se utilizó 1 ml de TriReagent TM® (Sigma, St. Louis, MO) por cada 50-100 mg de tejido y se homogeneizó con un Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik, Staufen, Germany). Se centrifugó el homogeneizado durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C y posteriormente se recogió el sobrenadante al cual se le añadieron 200 ml de cloroformo, mezclándolo y dejando la solución reposar durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó nuevamente a 12.000 g durante 5 min a 4 °C recogiendo el sobrenadante. A la fase acuosa obtenida se le añadieron 0,5 ml de isopropanol, mezclando suavemente y dejando reposar en hielo durante 10 min para posteriormente centrifugar durante 8 min a 12.000 x g a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se lavó

el precipitado de ARN con 1 ml de etanol al 75%, centrifugando posteriormente durante 5 min a  $7.500 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$ . El ARN obtenido se resuspendió en un volumen apropiado de agua estéril libre de RNasa (W4502 Sigma-Aldrich) y se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop® ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Para la síntesis de ADN complementario (cDNA) se empleó el kit iScript™ cDNA synthesis (Bio-Rad Laboratories, California, USA) partiendo de 100 fg a 1 µg de ARN molde. El cDNA obtenido se empleó como molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real utilizando el kit Quantitect™ SYBR® Green PCR (Quiagen, California, USA) y un sistema termociclador de alta velocidad LightCycler® (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)<sup>46</sup>.

Para el estudio de la expresión de UCP2 se emplearon las siguientes secuencias de oligonucleótidos como cebadores: 5'GCATCGGCCTGTATGATTCT3' y 5'TTGGTATCTCCGACCACCTC3'. Como control se utilizó la  $\beta$ -actina cuyos cebadores fueron: 5'GCCAGCTCACCATGGAT3' y 5'CACGATGGAGGGAAGA3'. Los productos de amplificación de dichos genes eran de 185 pares de bases (pb) y de 116 pb para UCP2 y  $\beta$ -actina, respectivamente. Las secuencias de oligonucleótidos empleadas como cebadores se diseñaron el programa computerizado RTPrimerDB® para Windows (<http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/>). El volumen total para la reacción de PCR fue de 20 µl donde se añadió 19,5 pmol de cada cebador de UCP2 y 50 pmol de cada cebador de  $\beta$ -actina. El programa utilizado para la PCR fue de 45 ciclos a  $94^\circ\text{C}$  15 seg,  $60^\circ\text{C}$  20 seg y  $75^\circ\text{C}$  20 seg seguidos de una extensión final de 8 seg a  $75^\circ\text{C}$ .

Para comprobar si los productos finales de la amplificación eran los esperados se cargó el producto obtenido en un gel de agarosa al 2% empleando como control un marcador de ADN con un rango de 100 a 2.000 pb (V-gene Biotechnology Limited, Zhejiang, China).

## **6. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL**

La evaluación de la función del endotelio vascular se realizó midiendo la vasodilatación microvascular postisquemia con un laser-doppler lineal modelo Periflux 5000 (Perimed S.A., Stockholm, Sweden) de forma similar a lo descrito en nuestros estudios previos<sup>50</sup>. Para la medición se colocó al paciente en posición supina en una habitación a temperatura ambiente mantenida (de  $20^\circ\text{C}$  a  $22^\circ\text{C}$ ), con un manguito de presión arterial situado 5 cm sobre el codo (HG Erkameter 300, Erka, Bad Tolz, Germany) y situando el transductor a la superficie palmar del segundo dedo de la mano dominante. Tras un periodo de reposo inicial de 5 minutos, se midió el flujo capilar durante 1 minuto ( $t_0$ ). Seguidamente se indujo un periodo de isquemia distal mediante el inflado del manguito hasta alcanzar una presión suprasistólica (de 200 a 220 mm Hg) durante 4 minutos, tras los cuales se desinfló, midiendo el flujo capilar durante 1 minuto ( $t_d$ ). Los datos obtenidos del proceso se grabaron y se analizaron los valores del ABC de los tiempos  $t_0$  y  $t_d$  usando el software PeriSoft® para Windows. Estos datos se utilizaron para calcular el incremento

de flujo sanguíneo postisquemia mediante la fórmula:  $IRH = \frac{ABCt_d - ABCt_0}{ABCt_0} \times 100$ . Estos cálculos fueron realizados tanto con los valores obtenidos en condiciones basales como a los 150 minutos de la ingesta de cada uno de los desayunos.

## **7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos fueron codificados, introducidos y analizados en el programa SPSS® versión 11.0 para Windows. Se usó el programa estadístico MedCalc® para el cálculo del tamaño muestral y de las ABC el método trapezoidal ajustadas a los valores basales. La normalidad en la distribución de los datos fue contrastada por el test de Kolmogorov-Smirnov. Aquellos datos que no seguían una distribución normal fueron transformados logarítmicamente. En todas las pruebas estadísticas se consideraron como significativos los valores de p inferiores a 0,05.

1. **Análisis descriptivo:** en el caso de las variables cualitativas se calcularon las frecuencias y porcentajes. Las variables cuantitativas se expresaron como media aritmética  $\pm$  desviación típica.
2. **Comparación de medias aritméticas:** Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para medidas repetidas, para determinar el efecto de los diferentes tipos de dieta consumidos en cada una de las variables estudiadas. Cuando se observan diferencias significativas se utilizó el Test de Tukey en comparación post-hoc para identificar las diferencias existentes entre cada grupo. Cuando no se cumplían los criterios de normalidad se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparar entre grupos.

Los resultados de la expresión de ARNm de UCP2 fueron sometidos a una transformación logarítmica con el fin de normalizarlos.

## **8. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA**

Para la revisión bibliográfica se usó el sistema MEDLARS (Medical Literature Analysis and Retrieval System) a través de su servicio de información informatizado PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>), utilizándose varias entradas o encabezamientos MeSH (Medical Subjects Headings) del Index Medicus. También se ha empleado Ovid Technologies que es un proveedor de información electrónica bibliográfica. El acceso a las bases de datos en este servicio se realiza por medio del Ovid Web Gateway (<http://gateway.ovid.com>).

## VI. RESULTADOS

### 1. CARACTERÍSTICAS BASALES

La media de edad de los participantes fue  $62,3 \pm 9,4$  años (rango de 41 a 70). El valor basal de IMC fue de  $32,6 \pm 7,8$  Kg/m<sup>2</sup> y el perímetro de cintura de 106,2 cm en hombres y de 112,8 cm en mujeres. Ninguno de estos parámetros cambió de forma significativa durante la realización del estudio. Los pacientes presentaron una glucosa plasmática basal de  $98,55 \pm 9$  mg/dL, una insulina plasmática basal de  $12,6 \pm 3,83$  UI/mL y una HbA<sub>1c</sub> plasmática de  $6,0 \pm 0,5\%$ . A las 2h de la realización de la SOG, la glucosa plasmática fue de  $157,65 \pm 28,82$  mg/dL y la insulina plasmática de  $138,08 \pm 69,98$  UI/mL. El valor medio del ISIm fue de  $2,9 \pm 0,9$ . El valor de la tensión arterial media fue  $103 \pm 3,7$  mm Hg. En la **tabla 4** se muestran las características basales de los participantes en el estudio.

**Tabla 4.** Características basales de los participantes.

VARIABLE	MEDIDAS BASALES
Sexo	4 hombres y 7 mujeres
Edad (años)	$62,3 \pm 9,4$
IMC (kg.m <sup>-2</sup> )	$32,6 \pm 7,8$
Perímetro de cintura (cm)	Hombres    Mujeres 106,2      112,8
Hemoglobina glicosilada (%)	$6,0 \pm 0,5$
Glucosa plasmática (mg.dL <sup>-1</sup> )	
En ayunas <sup>1</sup>	$98,55 \pm 9$
2 h tras la SOG	$157,65 \pm 28,82$
Insulina plasmática (UI.mL <sup>-1</sup> )	
En ayunas <sup>1</sup>	$12,6 \pm 3,83$
2 h tras la SOG	$138,08 \pm 69,98$
ISIm <sup>2</sup>	$2,9 \pm 0,9$
Tratamiento antihipertensivo	3 sí; 8 no.
Presión arterial (mm Hg)	
Sistólica	$136 \pm 8,6$
Diastólica	$87 \pm 5,8$
Media <sup>3</sup>	$103 \pm 3,7$

IMC: índice de masa corporal. SOG: sobrecarga oral de glucosa. ISIm: índice de sensibilidad a la insulina de Matsuda. Los valores están expresados en media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) excepto la edad que está expresada en media  $\pm$  desviación estándar (DE)

<sup>1</sup> Media de dos determinaciones basales obtenidas en dos ocasiones. Para convertir la glucosa en mmol/L multiplicar mg/dL por 0,0555; para convertir la insulina en pmol/L multiplicar por 6,945.

<sup>2</sup> ISIm =  $10^4 / (G0 \times I0) \times (MPG \times MSI)$ . Valores con un rango entre 1,49 a 3,96 (a mayor valor, menor resistencia a la insulina).

<sup>3</sup> Presión arterial media (PAM) = (Sistólica – Diastólica)/3 + Diastólica.

## 2. RESULTADOS DE LA INTERVENCION DIETÉTICA

### 2.1. Gasto energético, ingesta dietética y peso corporal

El gasto calórico basal (GCB) inicial fue  $93,01 \pm 5,02 \text{ kJ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ . Las dietas ofrecidas fueron del 125% de la energía necesitada estimada [ $12477 \pm 994 \text{ kJ/d}$  (SAT);  $12470 \pm 978 \text{ kJ/d}$  (MONO);  $12482 \pm 982 \text{ kJ/d}$  (HC);  $p=0,9$ ]. El valor energético ingerido medio consumido durante la dieta rica en SAT fue de  $9565 \pm 769 \text{ kJ/d}$ , durante la dieta rica en MONO de  $9586 \pm 743 \text{ kJ/d}$  y durante la ingesta de la dieta rica en HC de  $9526 \pm 716 \text{ kJ/d}$ . Este valor fue calculado a partir de la realización a los pacientes de dos cuestionarios de frecuencia de toma de alimentos, no apreciándose diferencias significativas entre los distintos periodos dietéticos ( $p=0,7$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Gasto calórico, ingesta dietética y peso corporal.

VARIABLE	SAT	MONO	HC	p
Peso (kg)	83.2 $\pm$ 5.7	83.6 $\pm$ 5.8	81.8 $\pm$ 6.0	0.36
GCB ( $\text{kJ} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) <sup>‡</sup>	96.33 $\pm$ 5.6	91.5 $\pm$ 6.0	89.14 $\pm$ 3.9	0.18
Dieta ofrecida (KJ/d)	12477 $\pm$ 994	12470 $\pm$ 978	12482 $\pm$ 982	0.9
Dieta consumida (KJ/d)	9565 $\pm$ 769	9586 $\pm$ 743	9526 $\pm$ 716	0.7
Grasa total (% , $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	38% 1.64 g	38% 1.64 g	20% 0.86 g	<b>0.00</b>
Grasa SAT (% , g/d)	23% 82 g	9% 32.4 g	6% 21.3 g	<b>0.00</b>
Grasa MONO (% , g/d)	9% 32.2 g	23% 81.5 g	8% 28.5 g	<b>0.00</b>
Grasa POLI (% , g/d)	6% 21.4 g	6% 21 g	6% 21.0 g	<b>0.00</b>
HC ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	47% 4.55	47% 4.52	65% 6.25	<b>0.00</b>
Proteínas ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	15% 1.45	15% 1.44	15% 1.45	0.7
Alcohol (g/sem)	< 10	< 10	< 10	0.4

GCB: Gasto calórico basal. SAT: saturada. MONO: monoinsaturada. POLI: poliinsaturada. HC: hidratos de carbono.

‡Para convertir el valor de kJ a Kcal dividir entre 4,18. Las dietas ofrecidas contenían un 125% de la energía necesaria estimada. La ingesta calórica fue calculada a partir de cuestionarios. Los datos están expresados en media  $\pm$  DE. El valor de  $p$  fue obtenido del análisis de la varianza para medidas repetidas.

## 2.2. Calorimetría indirecta tras la intervención dietética

El GCB permaneció estable a lo largo de la realización del estudio [ $93,01 \pm 5,02$  kJ  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> (basal),  $96,33 \pm 5,6$  kJ  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> (SAT),  $91,5 \pm 6$  kJ  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> (MONO),  $89,14 \pm 3,9$  kJ  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> (HC);  $p=0,18$ . Cuando se analizó el sustrato energético utilizado tras el consumo de cada una de las dietas, sólo se encontraron diferencias significativas en la oxidación de grasas al comparar los valores obtenidos tras el consumo de las dietas ricas en grasas SAT y MONO con los de la dieta rica en HC ( $1,60 \pm 0,11$  kJ/min,  $1,82 \pm 0,11$  kJ/min,  $1,38 \pm 0,13$  kJ/min;  $p<0,05$ ). Las tasas de oxidación de HC y de proteínas no mostraron diferencias significativas ( $2,45 \pm 0,18$  kJ/min,  $1,88 \pm 0,13$  kJ/min,  $1,98 \pm 0,13$  kJ/min;  $1,44 \pm 0,09$  kJ/min,  $1,53 \pm 0,12$  kJ/min,  $1,66 \pm 0,11$  kJ/min;  $p=0,5$  y  $p=0,07$ , respectivamente). El valor de la excreción urinaria de N fue significativamente mayor tras el consumo de una dieta rica en HC que tras la ingesta de una dieta rica en grasa SAT ( $144 \pm 17$  mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>,  $123,7 \pm 11$  mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>;  $p=0,04$ ). En el análisis de los valores de CR,  $\dot{V}O_2$  y  $\dot{V}CO_2$  basales con respecto a los postprandiales tras cada fase dietética no se encontraron diferencias significativas.

**Tabla 6.** Calorimetría indirecta tras los 3 periodos de intervención dietética

	Basal	SAT	MONO	HC	$p$
GCB (kJ/min)	93,01 $\pm$ 5,02	96,33 $\pm$ 5,6	91,5 $\pm$ 6	89,14 $\pm$ 3,9	0,18
Oxidación de HC (kJ/min)		2,45 $\pm$ 0,18	1,88 $\pm$ 0,13	1,98 $\pm$ 0,13	0,5
Oxidación de grasas (kJ/min)		1,60 $\pm$ 0,11	1,82 $\pm$ 0,11	1,38 $\pm$ 0,13	<b>&lt;0,05</b>
Oxidación proteica (kJ/min)		1,44 $\pm$ 0,09	1,53 $\pm$ 0,12	1,66 $\pm$ 0,11	0,07
CR	0,88 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,02	0,89 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,02	0,28
$\dot{V}O_2$ (mL $\cdot$ kg <sup>-1</sup> $\cdot$ d <sup>-1</sup> )	3,25 $\pm$ 0,23	3,30 $\pm$ 0,22	3,28 $\pm$ 0,21	3,15 $\pm$ 0,14	0,18
$\dot{V}CO_2$ (mL $\cdot$ kg <sup>-1</sup> $\cdot$ d <sup>-1</sup> )	2,89 $\pm$ 0,23	3,06 $\pm$ 0,20	2,91 $\pm$ 0,19	2,84 $\pm$ 0,18	0,16
N urinario (mg $\cdot$ kg <sup>-1</sup> $\cdot$ d <sup>-1</sup> )		123,7 $\pm$ 11	132 $\pm$ 11	144 $\pm$ 17	0,24

GCB: gasto calórico basal. SAT: saturada. MONO: monoinsaturada. HC: hidratos de carbono. CR: coeficiente respiratorio.  $\dot{V}O_2$ : tasa de consumo de oxígeno.  $\dot{V}CO_2$ : tasa de consumo de dióxido de carbono. N: nitrógeno.

Los datos están expresados en media  $\pm$  DE. El valor de  $p$  fue obtenido del análisis de la varianza para medidas repetidas.

La recogida de orina fue realizada tras las 12 h de descanso nocturno.

## 2.3. Composición en ácidos grasos de los ésteres de colesterol

La adherencia a la dieta se comprobó mediante el análisis de la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos en ayunas al final de cada uno de los periodos de intervención

dietética (tabla 7). Éstos reflejan la composición de la dieta ingerida durante las últimas semanas, siendo un buen marcador del tipo de grasas consumidas por los participantes. Las proporciones de ácido palmítico, esteárico y de ácidos grasos SAT totales fueron significativamente mayores tras el consumo de la dieta rica en SAT (ANOVA  $p<0,01$ ,  $p<0,05$  y  $p<0,01$ , respectivamente). Igualmente, se comprobó que la proporción de ácido oléico y de ácidos grasos MONO totales fueron mayores tras la ingesta de la dieta rica en MONO (ANOVA  $p<0,01$ ,  $p<0,05$ , respectivamente). El porcentaje postprandrial de ácidos grasos POLI no varió a lo largo del estudio.

**Tabla 7.** Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos en ayunas tras periodo dietético

ÁCIDOS GRASOS		% TOTAL DE ÁCIDOS GRASOS			
DIETAS		SAT	MONO	HC	P
SAT	Ácido mirístico (14:0)	0,59±0,07	0,42±0,05	0,50±0,05	<0,05
	Ácido palmítico (16:0)	23,30±0,47	21,40±0,46	23,46±0,51	<0,01
	Ácido margárico (17:0)	0,30±0,01	0,30±0,02	0,31±0,03	0,9
	Ácido esteárico (18:0)	10,00±0,27	9,23±0,28	10,07±0,37	<0,05
	Ácido araquidónico (20:0)	0,36±0,04	0,39±0,03	0,34±0,02	0,7
	Ácido behénico (22:0)	0,60±0,04	0,53±0,04	0,55±0,04	0,06
	Ácido lignocérico (24:0)	1,33±0,07	1,22±0,08	1,27±0,14	0,1
<b>Total ácidos grasos SAT</b>		<b>36,5±0,44</b>	<b>33,51±0,45</b>	<b>35,7±0,35</b>	<b>&lt;0,01</b>
MONO	Ácido palmitoleico (16:1, n-7)	1,0±0,11	1,0±0,09	1,13±0,11	0,2
	Ácido oleico (18:1, n-9)	20,37±1,22	24,91±0,67	21,83±0,59	<0,01
	Ácido vaccénico (18:1, n-7)	1,73±0,06	1,76±0,04	1,67±0,11	0,5
	Ácido erúcico (22:1)	6,17±0,44	5,53±0,39	5,73±0,43	0,2
<b>Total ácidos grasos MONO</b>		<b>29,27±1,82</b>	<b>33,20±1,19</b>	<b>31,93±1,24</b>	<b>&lt;0,05</b>
POLI	Ácido linoleico (18:2, ω-6)	23,41±1,22	22,58±0,62	22,04±0,81	0,6
	Ácido alfa-linoleico (18:3, ω-3)	0,23±0,02	0,24±0,02	0,28±0,03	0,3
	Ácido estearidónico (18:4, ω-3)	0,06±0,02	0,11±0,02	0,11±0,02	0,3
	Ácido araquidónico (20:4, ω-6)	0,28±0,02	0,28±0,02	0,28±0,02	0,6

Ácido eicosapentanoico (20:5, ω-3)	0,64±0,17	0,48±0,07	0,56±0,13	0,7
Ácido docosapentanoico (22:5)	0,43±0,09	0,29±0,02	0,35±0,02	<0,05
Ácido docosahexanoico (22:6)	2,23±0,15	2,08±0,15	2,19±0,13	0,9
<b>Total ácidos grasos POLI</b>	<b>33,28±1,67</b>	<b>32,06±0,9</b>	<b>31,81±1,16</b>	<b>0,6</b>

SAT: ácidos grasos saturados. MONO: ácidos grasos monoinsaturados. POLI: ácidos grasos poliinsaturados.

Los datos están expresados en media ± DE. El valor de *p* fue obtenido del análisis de la varianza para medidas repetidas.

## 2.4. Resultados de la intervención dietética sobre el metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono

El porcentaje de HBA<sub>1c</sub> y la concentración plasmática de glucosa en ayunas disminuyó de forma significativa tras la ingesta de las dietas ricas en grasa MONO y HC al compararlas con el consumo de grasa SAT (5,74 ± 0,137%, 5,39 ± 0,10%, 5,40 ± 0,10%, 99,09±3,42 mg/dL, 90,45±2,52 mg/dL, 90,6±2,34 mg/dL; *p*<0,01 y *p*<0,05 respectivamente) (**tabla 8**). Los valores basales de insulina plasmática no se modificaron a lo largo de la realización del estudio. El área bajo la curva (ABC) postprandial tanto de glucosa como de insulina fue significativamente mayor en respuesta a la ingesta de la dieta rica en HC comparada con la obtenida tras el consumo de las dietas ricas en grasas (105,22 ± 21,62 mg·180 min/dL, 140,90 ± 23,42 mg·180 min/dL, 214,41 ± 48,64 mg·180 min/dL, 20,5 ± 4,16 UI·180 min/mL, 16,38 ± 4,26 UI·180 min/mL, 37,33 ± 10,68 UI·180 min/mL; *p*<0,05 en ambos casos) (**tabla 8 y figura 8**). La resistencia a la insulina estimada mediante Homeostasis model assessment (HOMA) modificado para el cálculo de la resistencia insulínica (HOMA-ir)<sup>250</sup> descendió de forma estadísticamente significativa durante la fase de dieta basada en las grasas MONO, comparada con las otras dos dietas. Las concentraciones plasmáticas de colesterol total, triglicéridos y LDL permanecieron estables a lo largo de los tres periodos de dieta pero se observó una disminución de las concentraciones plasmáticas de HDL, Apo A-1 y Apo B<sub>100</sub> tras la ingesta de HC en comparación con el consumo de las dietas grasas (1,22 ± 0,12 mmol/L, 1,22 ± 0,14 mmol/L, 1,09 ± 0,11, 151±9 mg/dL, 156±9,41 mg/dL, 136±9,87, 104 ± 6 mg/dL, 100 ± 6 mg/dL, 92 ± 8 mg/dL; *p*=0,02, *p*<0,05 y *p*<0,05 respectivamente).

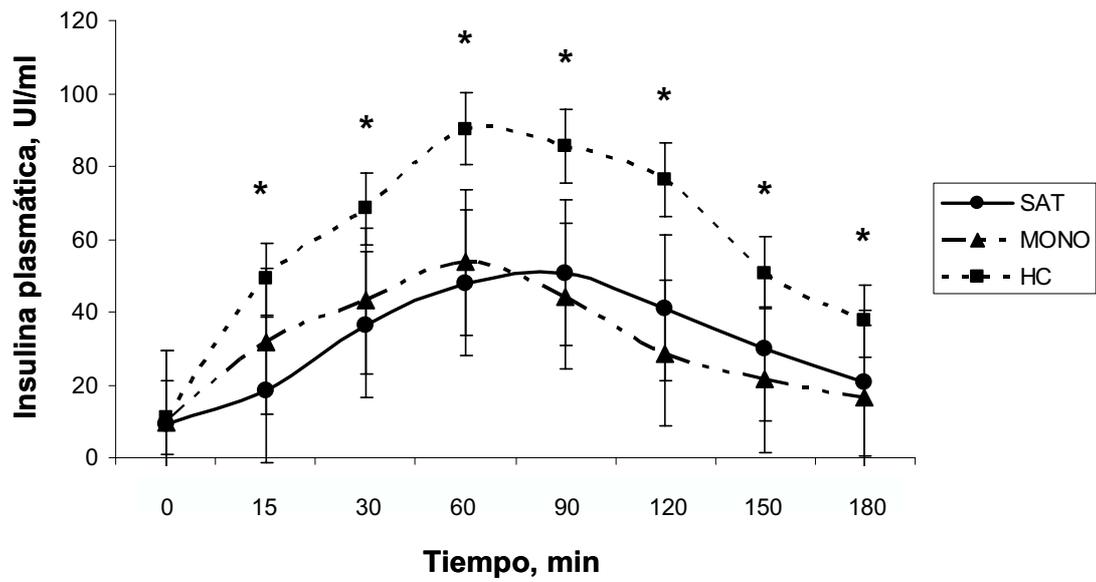
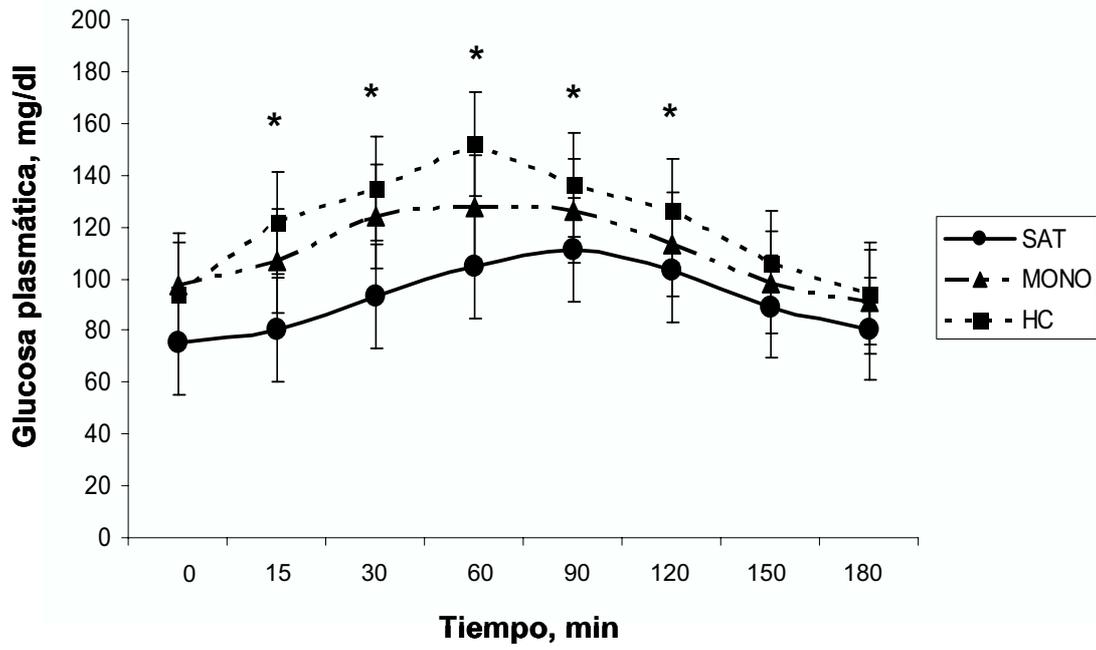
**Tabla 8.** Determinaciones bioquímicas tras los tres periodos de dieta

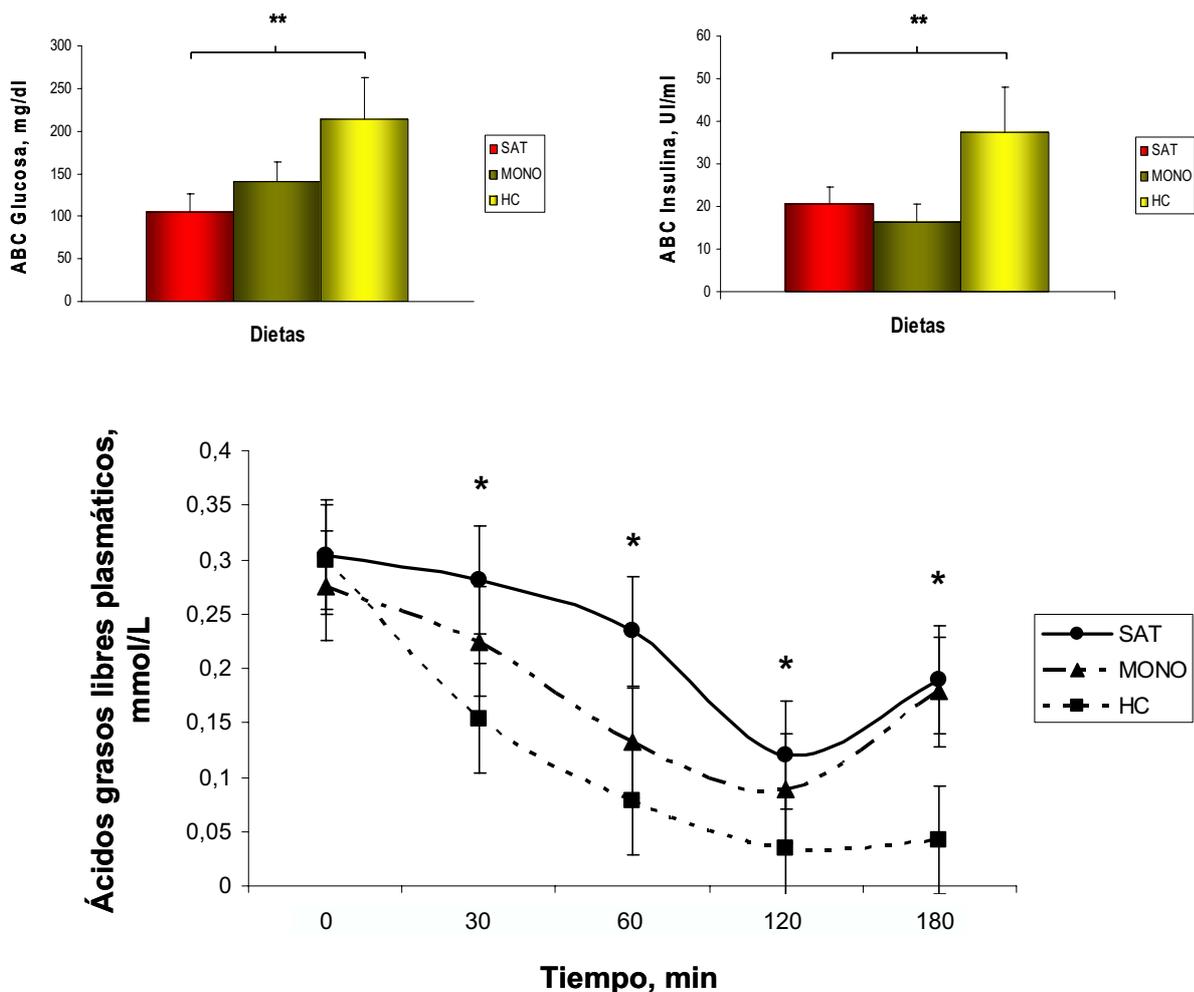
	SAT	MONO	HC	P
HBA <sub>1c</sub> , %	5,74±0,137	5,39±0,10	5,40±0,10	<b>&lt; 0.01</b>
Glucosa				
Basal, mg/dL	99,09±3,42	90,45±2,52	90,6±2,34	<b>&lt; 0.05</b>
ABC, mg·180 min/dL	105,22±21,62	140,90±23,42	214,41±48,64	<b>&lt; 0.05</b>
Insulina				
Basal, UI/mL	9,22±1,38	8,74±1,78	10,82±1,77	0.3
ABC, UI·180 min/mL	20,5±4,16	16,38±4,26	37,33±10,68	<b>&lt; 0.05</b>
HOMA-ir, mmol/L x µU/mL	2,72±0,37	2.32±0,35	2.52±0.37	< 0.01
HOMA-i%β	103,1±12,2	109,1±12,5	126,6±18,4	0.2
Colesterol total, mmol/L	6,24±0,31	5,96±0,31	5,58±0,30	0,2
Triglicéridos, mmol/L	1,36±0,15	1,31±0,12	1,39±0,17	0,37
HDL, mmol/L	1,22±0,12	1,22±0,14	1,09±0,11	<b>0,02</b>
LDL, mmol/L	4,24±0,25	3,99±0,22	3,85±0,28	0,6
Apo A-1, mg/dL	151±9	156±9,41	136±9,87	<b>&lt;0,05</b>
Apo B <sub>100</sub> , mg/dL	104±6	100±6	92 ±8	<b>&lt;0,05</b>

SAT: ácidos grasos saturados. MONO: ácidos grasos monoinsaturados. ABC: área bajo la curva. HOMA-ir: índice de resistencia insulínica. HDL: colesterol vehiculado mediante lipoproteínas de alta densidad. LDL: colesterol vehiculado mediante lipoproteínas de baja densidad. Apo A-1: apolipoproteína A-1, Apo B<sub>100</sub>: apolipoproteína B<sub>100</sub>.

La concentración de LDL fué calculada a partir de los valores de colesterol total, triglicéridos y HDL mediante la fórmula de Friedewald. Para convertir los valores de glucosa a mmol/L hay que multiplicar por 0,0555 y los de colesterol y triglicéridos a mg/dl hay que dividir los mmol entre 0,02586 y 0,01129, respectivamente. Para transformar los valores de insulina a pmol/L, multiplicar por 6,945. El cálculo del HOMA-ir se hizo a partir de esta fórmula:  $HOMA-ir = (insulina_{ayunas} \times glucosa_{ayunas}) / 405$ , expresada la insulina en µU/ml y la glucosa en mg/dl (405 debe ser reemplazado por 22,5 cuando la glucosa es expresada en mmol/L).

Los datos están expresados en media ± DE. El valor de *p* fue obtenido del análisis de la varianza para medidas repetidas.





**Figura 8.** Niveles de glucosa, insulina y ácidos grasos libres postprandiales en respuesta a los tres modelos de dieta y áreas bajo la curva (ABC) de glucosa e insulina plasmáticas calculadas con el método trapezoidal con ajuste a las concentraciones plasmáticas basales. ANOVA y test de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

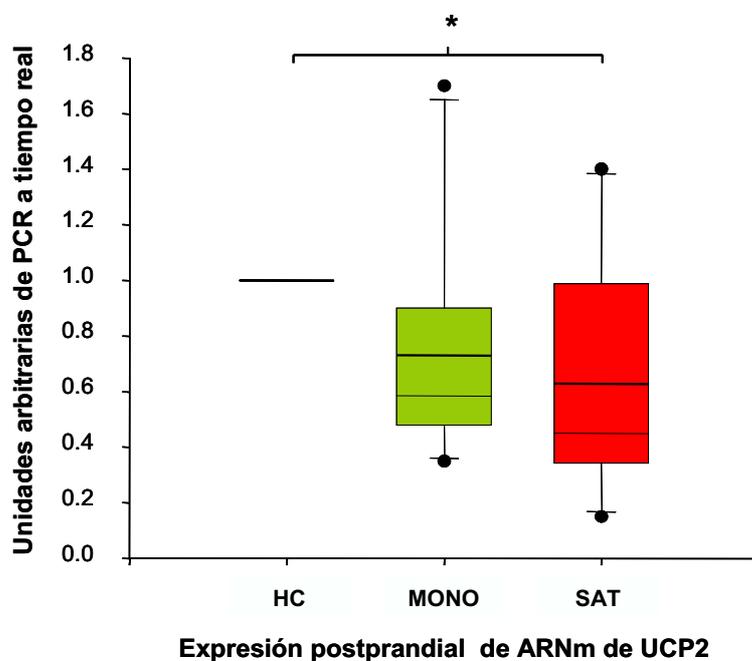
### 3. EXPRESIÓN POSTPRANDIAL DE UCP2 EN TEJIDO GRASO PERIFÉRICO

La expresión génica postprandial de UCP2 medida mediante cuantificación de ARNm en el tejido adiposo periférico fue significativamente menor tras la ingesta aguda de las dietas ricas en grasas SAT y MONO al compararlas con el consumo de HC ( $0,6912 \pm 0,36545$ ,  $0,557 \pm 0,46777$  y  $1, p=0,026$  y  $p=0,019$  respectivamente).

**Tabla 9.** Expresión postprandial de ARNm de UCP2 a los 180 minutos de la ingesta de los tres modelos de desayunos isocalóricos expresado en unidades arbitrarias (U.A.). Los valores se expresan en media  $\pm$  DE.

PACIENTE	HC	SAT	MONO
1	1,00	0,55	1,27
2	.	1,00	1,25
3	1,00	0,79	0,69
4	1,00	0,40	0,15
5	1,00	0,64	0,27
6	1,00	1,62	0,63
7	1,00	0,26	0,13
8	1,00	0,83	0,28
9	1,00	0,57	1,47
10	1,00	0,60	0,26
11	1,00	0,67	0,62
<b>MEDIA ± DE</b>	<b>1,00*</b>	<b>0,6912 ± 0,36545*</b>	<b>0,557 ± 0,46777*</b>

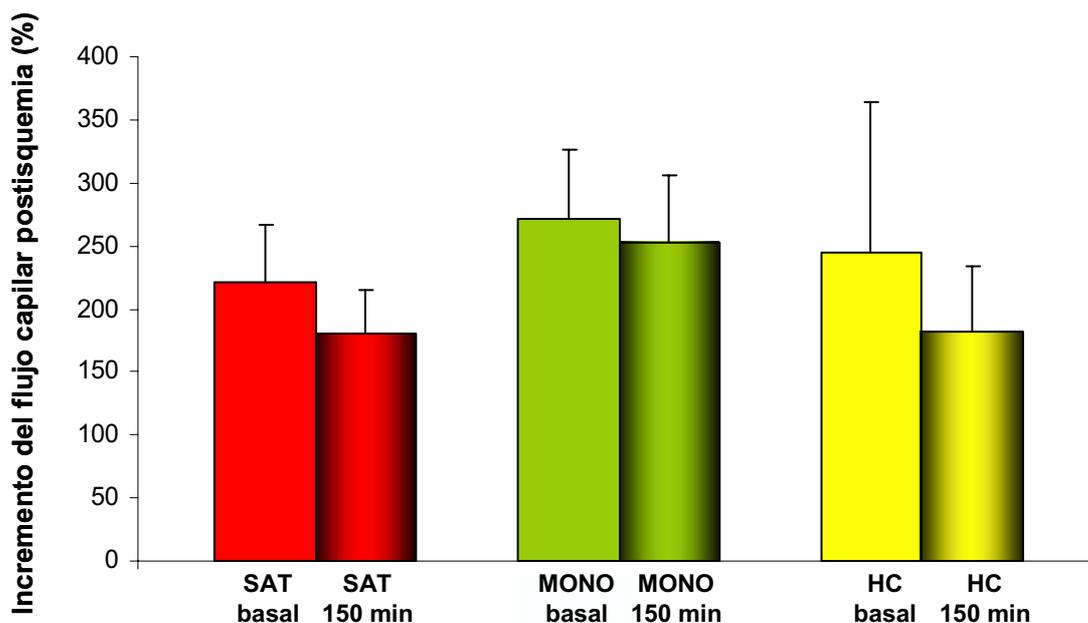
Los valores de las concentraciones de ARNm de UCP2 tras la ingesta del desayuno rico en HC se establecieron arbitrariamente con el valor de 1. Los valores marcados con \* son estadísticamente diferentes entre sí (ANOVA  $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Expresión postprandial de ARNm de UCP2 expresado en unidades arbitrarias de PCR a tiempo real. \* $p < 0,05$ .

#### 4. VASODILATACIÓN MICROVASCULAR POSTISQUEMIA

Cuando se analizó el efecto de las tres dietas sobre los incrementos de flujo capilar postisquemia antes y después del desayuno, se comprobó que el aumento de la vasodilatación microvascular en estado postprandial era menor que en estado basal, produciéndose una menor reducción de la misma tras la ingesta de la dieta rica en MONO que no llegó a ser estadísticamente significativa ( $220,87 \pm 45,34$ ,  $180,14 \pm 35,15$ ,  $271,12 \pm 55,15$ ,  $251,98 \pm 54,23$ ,  $244,91 \pm 119,44$ ,  $181,42 \pm 51,98$ ;  $p=0,539$ ,  $p=0,054$  y  $p=0,829$  respectivamente) (figura 10 y tabla 10).



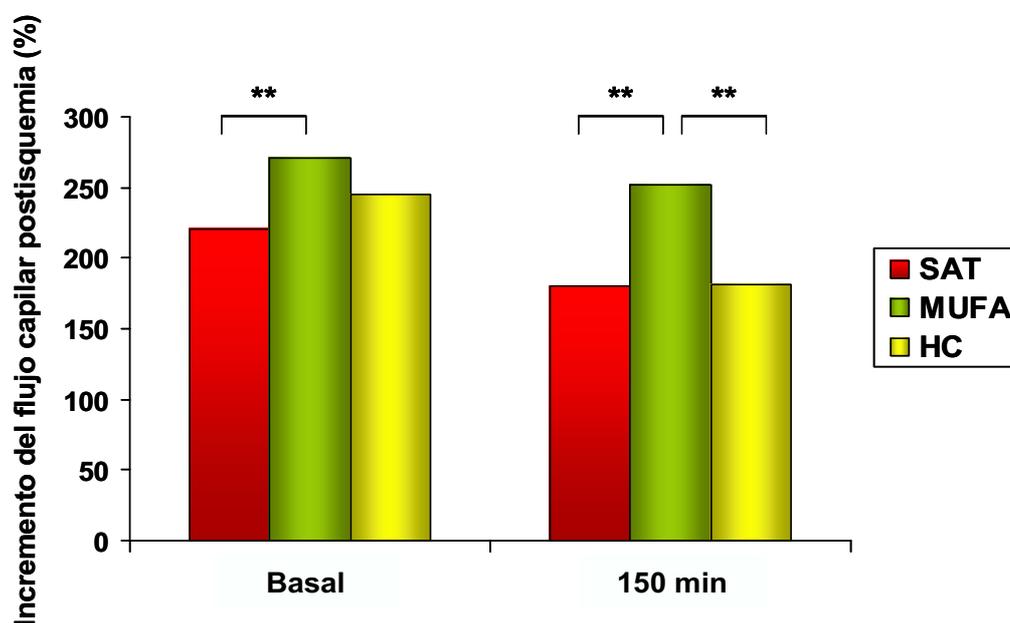
**Figura 10.** Representación de la variación de la vasodilatación dependiente del endotelio en estado basal y tras 150 minutos del desayuno tras la ingesta de cada una de las dietas. ANOVA para muestras repetidas.

**Tabla 10.** Porcentaje de cambio del flujo capilar postisquemia en situación basal y a los 150 minutos del desayuno. ANOVA para muestras repetidas.

% cambio (td - t0) x100/ t0	DIETA	0 min	150 min	P ANOVA
	SAT		220,87 ± 45,34	180,14 ± 35,15
MONO		271,12 ± 55,15	251,98 ± 54,23	0,054
HC		244,91 ± 119,44	181,42 ± 51,98	0,829

Al estudiar las variaciones del de flujo capilar en situación basal y a los 150 minutos del desayuno tras la ingesta de cada una de las dietas, se observó que tras el consumo de la dieta rica en MONO se produjo un menor descenso del mismo que fue significativo tanto en situación basal al

compararlo con la dieta rica en SAT ( $p=0,006$ ) como a los 150 minutos del desayuno en relación con las otras dos dietas ( $p=0,011$  en ambos casos) (**figura 11**).



**Figura 11.** Representación de la variación del incremento del flujo capilar postisquemia en situación basal y 150 minutos después del desayuno. ANOVA para muestras repetidas.  $**p<0,01.6$ .

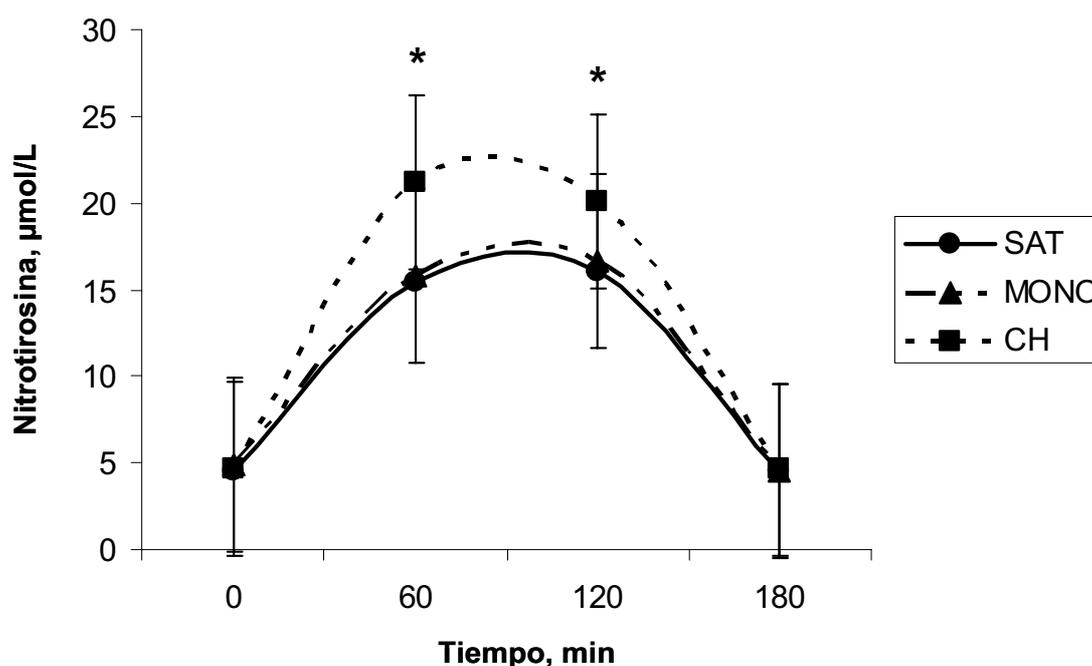
## 5. NITROTIROSINA

Cuando se analizaron las concentraciones plasmáticas de NT en situación basal y a los 60, 120 y 180 minutos, se comprobó que en situación basal, la concentración plasmática de NT era significativamente mayor tras la ingesta de grasas MONO en comparación con SAT ( $p=0,041$ ). Al evaluar los valores a los 60 minutos se observó una reducción significativa de los mismos al comparar la toma de una dieta rica en grasas SAT y MONO frente a la rica en HC ( $p=0,002$  y  $p=0,035$  respectivamente). Finalmente, al evaluar la respuesta a los 120 min únicamente se apreció una reducción significativa de la concentración plasmática de NT al comparar la ingesta de la dieta rica en grasas SAT frente a la toma de HC ( $p=0,015$ ) (**figura 12 y tabla 11**).

**Tabla 11.** Valores medios antes y a los 60, 120 y 180 min del desayuno y área bajo la curva de nitrotirosina plasmática. ANOVA para muestras repetidas.

SAT: ácidos grasos saturados. MONO: ácidos grasos monoinsaturados. HC: hidratos de carbono. ABC: área bajo la curva. Los datos están expresados en media  $\pm$  DE. El valor de  $p$  fue obtenido del análisis de la varianza para medidas repetidas.

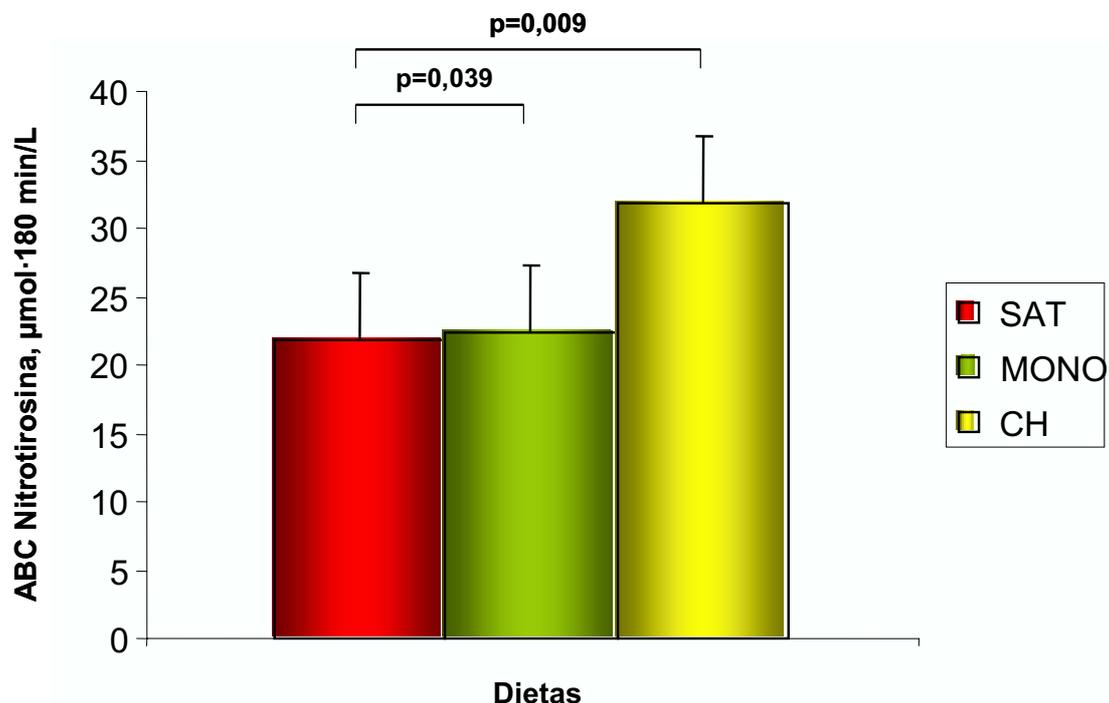
TIEMPO (min)	VALORES MEDIOS DE NITROTIROSINA ( $\mu\text{mol/L}$ )			
	SAT	MONO	HC	P ANOVA
Basal	4,47 $\pm$ 0,27	4,87 $\pm$ 0,18	4,69 $\pm$ 0,29	0,097
60 min	14,73 $\pm$ 0,94	15,80 $\pm$ 1,76	21,22 $\pm$ 1,22	0,005
120 min	15,08 $\pm$ 1,04	16,07 $\pm$ 1,45	20,07 $\pm$ 1,15	0,024
180 min	4,53 $\pm$ 0,28	4,53 $\pm$ 0,25	4,60 $\pm$ 0,24	0,97
ABC	20,9 $\pm$ 2,08	21,79 $\pm$ 3,26	31,81 $\pm$ 1,54	0,039



**Figura 12.** Representación de los valores medios de nitrotirosina basal y a los 60, 120 y 180 minutos del desayuno. ANOVA para muestras repetidas. \* $p < 0,05$ .

Al analizar el ABC de las concentraciones plasmáticas de NT se observó que ésta era mayor tras el consumo de la dieta rica en HC que tras la ingesta de las dietas ricas en grasas tanto saturadas como monoinsaturadas (20,9 $\pm$ 2,08  $\mu\text{mol}\cdot 180 \text{ min/L}$ , 21,79 $\pm$ 3,26  $\mu\text{mol}\cdot 180 \text{ min/L}$ , 31,81 $\pm$ 1,54  $\mu\text{mol}\cdot 180 \text{ min/L}$ ;  $p=0,009$  y  $p=0,039$  respectivamente) (**figura 13 y tabla 11**). Estos valores fueron obtenidos al calcular el área bajo la curva partiendo de las concentraciones plasmáticas de NT en

estado basal y tras 60, 120 y 180 minutos de la ingesta del desayuno correspondiente a cada periodo dietético.



**Figura 13.** Representación del área bajo la curva postprandial de las concentraciones plasmáticas de nitrotirosina tras la ingesta de cada una de las dietas. ANOVA para muestras repetidas.

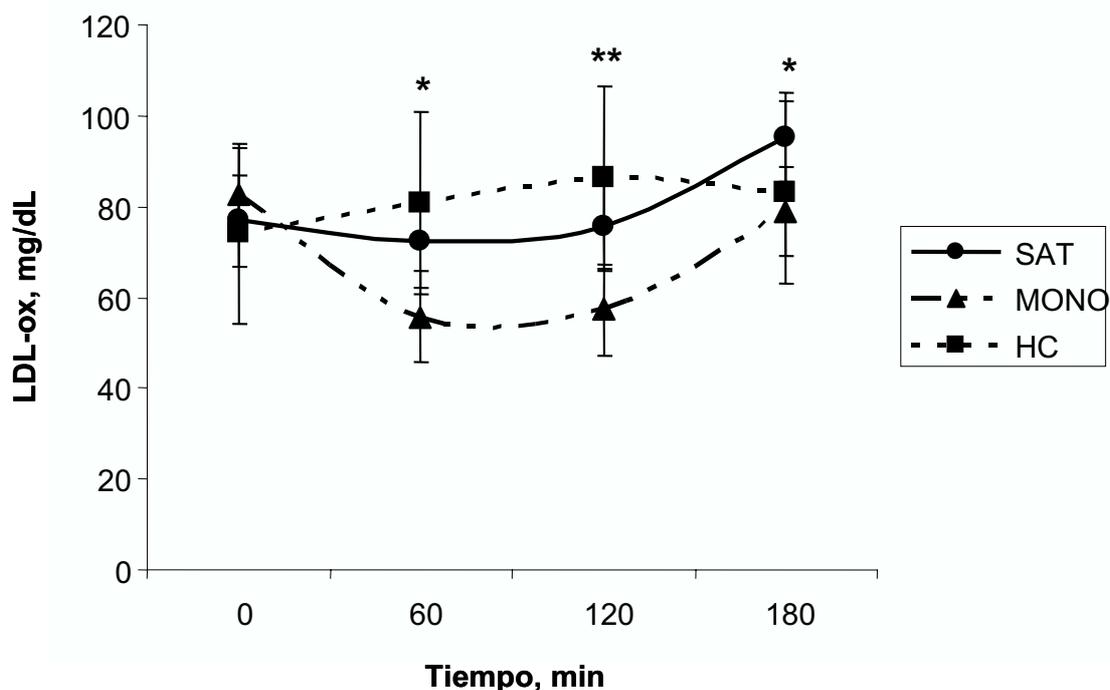
## 6. LDL OXIDADA

En el análisis de los valores medios de LDL-ox postprandial se comprobó que en situación de ayuno, la concentración de LDL-ox plasmática fue mayor tras el consumo de la dieta rica en grasa MONO que tras la ingesta de las dietas ricas en grasa SAT y CH ( $82,74\pm 21,41$ ,  $76,91\pm 14,26$ ,  $74,07\pm 19,67$  respectivamente,  $p=0,046$ ) pero que tras la ingesta aguda de los diferentes modelos dietéticos los valores eran significativamente menores a los 120 min que tras de las dietas ricas en grasas SAT y HC y a los 180 min al compararlos con los obtenidos tras la ingesta de grasas SAT (tabla 12 y figura 14).

**Tabla 12.** Valores medios antes y a los 60, 120 y 180 min del desayuno y área bajo la curva de LDL-ox. ANOVA para muestras repetidas.

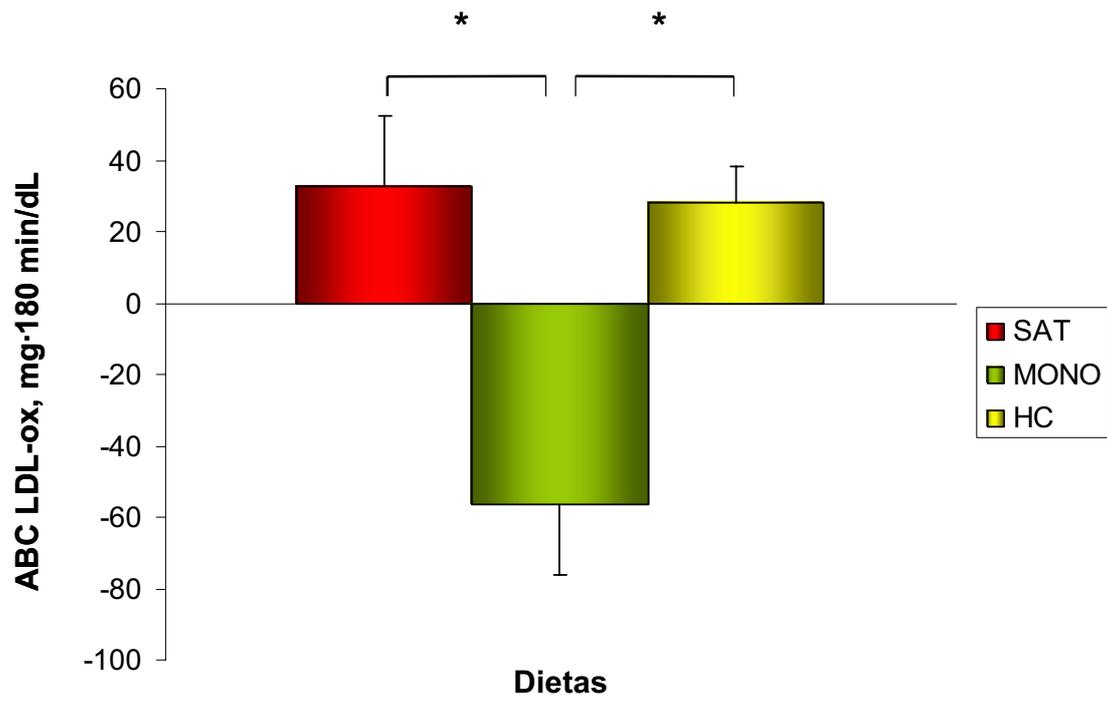
TIEMPO (min)	VALORES MEDIOS DE LDL-ox (mg/dL)			
	SAT	MONO	HC	P ANOVA
Basal	76,91±/4,94	82,74±/6,97	74,07±/4,23	0,046
60 min	72,27±/6,12	55,71±/4,28	80,79±/11,41	0,012
120 min	75,72±/6,36	57,24±/5,59	86,35±/6,55	0,001
180 min	95,22±/9,7	78,90±/3,73	83,25±/6,97	0,032
ABC	32,46±/3,1	-56,36±/5,9	28,24±/3,0	0,046

SAT: ácidos grasos saturados. MONO: ácidos grasos monoinsaturados. HC: hidratos de carbono. ABC: área bajo la curva. Los datos están expresados en media ± DE. El valor de *p* fue obtenido del análisis de la varianza para medidas repetidas.



**Figura 14.** Representación de los valores medios de LDL-ox basal y a los 60, 120 y 180 minutos del desayuno. ANOVA para muestras repetidas. \**p*<0,05, \*\**p*<0,01.

Al estudiar los valores del ABC se observó que los obtenidos tras la ingestión aguda del desayuno rico en grasas MONO eran significativamente menores que aquellos alcanzados tras el consumo de las otras dos dietas ( $32,46 \pm 3,1$  mg·180 min/dL;  $-56,36 \pm 5,9$  mg·180 min/dL,  $28,24 \pm 3,0$  mg·180 min/dL; *p*=0,040 y *p*=0,011 respectivamente) (tabla 12 y figura 15).



**Figura 15.** Representación del área bajo la curva (ABC) postprandial de las concentraciones plasmáticas de LDL-ox tras la ingesta de cada una de las dietas. ANOVA para muestras repetidas. \*p<0,05.



## VII. DISCUSIÓN

Nuestro estudio demuestra que tras el consumo de una dieta de tipo mediterránea, rica en grasas MONO, se produce menos estrés oxidativo durante el periodo postprandial, que se relaciona con una menor expresión de UCP2 en el tejido adiposo periférico. Este trabajo es un pequeño ensayo que evalúa los efectos de tres modelos de dietas isocalóricas en mantenimiento de peso con diferente composición en ácidos grasos e HC en voluntarios con resistencia a la insulina. Estas personas presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y DM2 y el tratamiento en la fase inicial de la enfermedad está basado en la modificación de los hábitos alimentarios, la pérdida de peso y la realización de ejercicio físico. El debate que se plantea es la composición de la dieta recomendada en personas con sobrepeso y resistencia a la insulina, durante las fases de mantenimiento de peso.

Una característica fundamental de este estudio es la homogeneidad del grupo de voluntarios estudiados, con obesidad de distribución central y resistencia a la insulina, sin tratamiento previo hipoglucemiante, e hijos de padres con DM2 y obesidad. Además, en el diseño del estudio el grupo fue expuesto secuencialmente a las tres dietas. Los voluntarios no presentaban factores de riesgo cardiovascular, complicaciones micro y/o macrovasculares previas ni enfermedades crónicas. Durante todo el estudio no hubo toma de medicamentos, suplementos vitamínicos ni otros compuestos que pudiesen alterar el metabolismo glucídico ni los efectos de la intervención nutricional.

La mayoría de los estudios de este tipo presentan resultados diversos, probablemente debidos a diferencias en el diseño de los mismos. Entre estos factores cabe destacar la presencia de modificaciones del peso corporal y el no conseguir un control estricto de la ingesta calórica. Con el objeto de evitar estos posibles factores de confusión, el presente trabajo fue diseñado para evaluar los efectos producidos por cambios en la composición nutricional, pero manteniendo la misma ingesta calórica con el fin de conservar un peso estable a lo largo del estudio. Otro de los problemas que se plantea es que la mayoría de los trabajos están realizados tras un periodo de ayuno, no evaluando los efectos agudos del consumo de nutrientes durante la fase postprandial y suelen limitarse a describir fenómenos postingesta, de una sobrecarga aislada de glucosa o tras la ingesta oral de preparados que aportan las sustancias en forma de mezclas lipídicas, no estando basadas en el consumo de las dietas habituales. Por tanto, este tipo de intervenciones no son una forma natural de alimentación y sus resultados difícilmente pueden dar lugar a recomendaciones alimentarias, ya que no se puede saber el efecto que poseen en conjunto los alimentos que contienen. Por último, para asegurar el seguimiento y adherencia de los voluntarios, durante la realización de las dietas, se les sometió a seguimiento telefónico semanal y visitas protocolizadas<sup>33</sup> y, finalmente, se determinó la composición de ácidos grasos en los fosfolípidos

plasmáticos en ayunas, que son un buen marcador de la composición grasa de la dieta ingerida en las semanas y meses previos a la determinación<sup>34</sup>.

Nuestros resultados muestran que tras la ingesta aguda de una dieta mediterránea, rica en aceite de oliva virgen, y en otra rica en grasa saturada, durante la fase postprandial se induce una menor expresión génica de UCP2 a los 180 minutos de la ingesta, en pacientes con sobrepeso y resistencia insulínica, al compararlas con la expresión observada tras la ingesta de dietas con un alto contenido en HC. Ésto puede estar relacionado con una oferta postprandial diferente de macronutrientes a los tejidos diana, relacionados con el tipo de alimentos consumidos. Tras analizar los datos, creemos que este efecto sobre la expresión de UCP2 se prolonga más en el postprandio tras el consumo de la dieta rica en MONO que tras la enriquecida en SAT debido al efecto antioxidante que le confieren al aceite de oliva ciertos micronutrientes como los compuestos fenólicos, al inducir un menor estrés oxidativo postprandial. Desafortunadamente, en este estudio sólo se realizó el estudio de expresión genética a los 180 minutos, por lo que serán necesarios nuevos trabajos más prolongados en el tiempo para verificar nuestra hipótesis.

Cuando se consume una dieta rica en HC se produce una hiperglucemia con hiperinsulinemia, que provoca una rápida captación de glucosa, principal nutriente consumido en estas dietas, produciendo una rápida oxidación de la misma, probablemente más rápida que la inducida por los ácidos grasos, principal nutriente aportado en las dietas con un alto contenido graso. Esto se asociaría a un mayor estrés oxidativo en el postprandio precoz y, por lo tanto, indirectamente, a una respuesta más rápida de la expresión de UCP2, inducida por el  $O_2^-$  generado y como mecanismo que intenta evitar el daño celular. Este proceso podría alcanzar su pico máximo a las 3-4 horas de la exposición a la glucosa, según los datos obtenidos en estudios previos con cultivos celulares en modelos animales. Este papel protector del sistema de activación de proteínas desacoplantes, cobra especial interés en enfermedades como la diabetes y la obesidad en las que existe una mayor expresión de estas proteínas en los tejidos metabólicamente más activos, pudiendo jugar un papel relevante en el equilibrio de la oxidación en estos tejidos<sup>251</sup>. En estado basal, el macronutriente más usado serían los ácidos grasos almacenados, induciendo la lipólisis<sup>252</sup>, hecho basado en la existencia de una correlación directa entre la expresión de ARNm de UCP2 y UCP3<sup>253, 254</sup> muscular y los niveles plasmáticos basales de ácidos grasos<sup>255</sup>. Además, en múltiples estudios se ha establecido la relación inversa entre las concentraciones de glucosa y la expresión de UCP2, apoyando el papel de esta proteína en la homeostasis de la glucosa<sup>256</sup>. Finalmente, en nuestro estudio hemos observado que durante la fase de dieta alta en HC la sensibilidad a la insulina era menor que cuando la dieta era rica en grasa MONO, relacionando indirectamente la activación de UCP2 con la sensibilidad periférica a la insulina de los voluntarios.

Cuando se comenzaron a realizar estudios sobre el significado de la expresión de estas proteínas se plantearon diferentes diseños que intentaban evaluar fundamentalmente su funcionalidad. Se crearon modelos animales transgénicos que sobreexpresaban o que carecían del gen que codificaban las UCPs, se incorporaron las proteínas a estudiar a los proteolisosomas y se comenzó a cuantificar la expresión de ARNm de la proteína en diferentes tejidos con resultados discrepantes. Este hecho puede ser debido a varios factores como son la cercanía de las regiones genéticas que codifican las diferentes UCPs (fundamentalmente UCP2 y UCP3) por lo que dificulta la determinación de las funciones específicas de cada una de ellas, la alta variabilidad intersujeto a la hora de cuantificar la expresión de ARNm de las distintas UCPs y la escasa reproducibilidad de los estudios, al estar realizados sobre muestras pequeñas, en diferentes tejidos obtenidos de diversos modos y con distintas dietas. Además, a todo esto se añade la dificultad para estimar la contribución genética de cada una de ellas en enfermedades poligénicas como son la obesidad y la DM2<sup>257</sup> y la existencia de distintos polimorfismos de UCPs que parecen estar asociados con estas enfermedades, por lo que serían necesarios estudios en los que se incluyeran un gran número de participantes para identificar los posibles patrones asociados a cada enfermedad<sup>141, 258-260</sup>.

Diferentes estudios tanto en modelos animales como en humanos apoyan que la composición de la dieta influye sobre la cantidad de kilocalorías consumida y, por tanto, sobre los cambios en el peso corporal<sup>256</sup>. Nuestros resultados muestran que aunque no se observaron diferencias en la cantidad de grasa total ni en el peso, se originó una redistribución de la grasa corporal aumentando su localización central tras el consumo de la dieta rica en HC frente a las dietas con alto contenido graso. Una posible explicación de estos resultados puede ser que a diferencia de otros estudios en los que se sustituye la grasa SAT por MONO “ad libitum”<sup>261</sup>, en nuestro trabajo esta sustitución fue isocalórica no causando de este modo una modificación en el gasto energético. En trabajos previos se plantea que dependiendo del tipo de grasa ingerida, se podría modificar la oxidación de ácidos grasos y el consumo energético a través de la regulación génica de su metabolismo<sup>262</sup>. En el estudio realizado por Piers y colaboradores demostraron que la ingesta aguda de aceite de oliva estimulaba la oxidación lipídica postprandial<sup>261</sup> y ésta, a su vez, podría afectar el depósito lipídico muscular influyendo de este modo en la sensibilidad a la insulina<sup>263, 264</sup>. Además, el acúmulo de grasa abdominal supone un factor de riesgo importante para el desarrollo de la DM2<sup>265, 266</sup> aunque aún no se saben con exactitud los mecanismos involucrados. Entre ellos cabría destacar el papel del tejido adiposo, como órgano metabólico y endocrino<sup>267</sup> secretando sustancias como las adipokinas y los AGLs. Estos últimos inhiben la secreción insulínica mediada por la glucosa en el músculo esquelético y estimulan la gluconeogénesis hepática promoviendo una exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa y AGLs que llevarán al desarrollo de la resistencia a la insulina<sup>268</sup>.

En nuestro estudio hemos analizado la expresión postabsortiva en un tejido diana, como es el tejido adiposo periférico, y cada paciente ha servido de propio control, estudiando la expresión de UCP2 en forma de ARNm, en unidades arbitrarias con respecto a una situación basal, minimizado estos condicionantes de variabilidad. En nuestro trabajo hemos analizado la influencia de tres modelos dietéticos, con diferente composición en grasas y HC, sobre la expresión de UCP2 en personas con obesidad central y resistencia a la insulina. El incremento de las concentraciones basales de ácidos grasos se considera como un potente estímulo de la expresión basal de esta proteína en diversos tejidos<sup>122</sup>; sin embargo, nuestros datos muestran que la inducción con dietas ricas en ácidos grasos es menor que con las dietas enriquecidas en HC simples.

La influencia de la dieta sobre la expresión de estas proteínas ha sido objeto de estudio en los últimos años con resultados diversos realizados, fundamentalmente, en modelos animales. Se sabe que en situación de ayuno aumenta la expresión de UCP2 en el músculo esquelético de las ratas, probablemente por inducción lipolítica<sup>269</sup>. Este hecho se ha comprobado también en humanos, detectándose niveles superiores de ARNm de UCP2 y UCP3 en el tejido muscular tras el ayuno<sup>270</sup>. Al evaluar el efecto de la ingesta de una dieta rica en grasa en ratas sobre la expresión de UCP2 en diferentes tejidos, se comprobó que ésta aumentaba tanto en el tejido adiposo marrón como en el blanco<sup>271</sup>. Para estudiar el efecto de las distintas grasas, Rodríguez y colaboradores<sup>118</sup> compararon el efecto de 4 tipos de dietas grasas, administradas durante 4 semanas, sobre la expresión de las diferentes UCPs en diversos tejidos (tejido adiposo marrón y blanco y tejido muscular) en ratas. Este grupo examinó la transcripción génica tras someter a los animales a un periodo de ayuno la noche previa a ser sacrificados, encontrando que aunque la ingesta de aceite de oliva aumentaba la expresión de UCP2 en el tejido graso marrón, no existían diferencias significativas en la expresión de dicha proteína al analizar el tejido adiposo blanco y muscular. Recientemente, el estudio publicado por Ribot y colaboradores en el que evalúan el efecto de una ingesta de una dieta enriquecida en ácido linoleico en ratones no encontraron modificaciones en la expresión de UCP2 en el tejido adiposo blanco<sup>272</sup>. En contraposición, el estudio del grupo japonés de Fudaka y colaboradores, mostró que tras colocar adipocitos de ratas, obtenidos tras 16 horas de ayuno, y cultivarlos en un medio enriquecido con triglicéridos y ácidos grasos, se producía un incremento significativo en la expresión de UCP1, UCP2 y UCP3 a las 4 horas de añadir los ácidos grasos insaturados (tanto MONO como POLI) pero no con las grasas SAT<sup>273</sup>.

Igualmente, se han planteado multitud de estudios en animales en relación con diferentes enfermedades. En ratones transgénicos obesos (ob/ob) se ha comprobado que existe una mayor expresión de UCP2 en la grasa<sup>274</sup> que podría interpretarse como un mecanismo compensatorio a un trastorno metabólico subyacente en el metabolismo energético<sup>275</sup>. En otro trabajo realizado con

ratones AKR/J, particularmente predispuestos a la obesidad inducida por la dieta, se les administró tras un periodo previo de adaptación de 10 días con una dieta rica en grasas, una dieta con un alto contenido graso pero enriquecida con un 1% de ácido linoleico durante 5 semanas. Transcurrido este tiempo, se examinaron diferentes tejidos (tejido graso marrón y blanco, riñón y músculo), no encontrándose diferencias significativas en la transcripción de ARNm de las distintas UCPs<sup>276</sup>. Por último, en el estudio llevado a cabo por Hidaka y colaboradores<sup>122</sup> en ratas diabéticas obtenidas mediante la administración de estreptozotocina, comprobaron que existía una mayor cantidad de ARNm de UCP2 en todos los tejidos estudiados (tejidos adiposos blanco y marrón y músculo esquelético) que en los animales controles.

Sin embargo, el efecto de diferentes modelos dietéticos sobre la expresión de UCP2 en el tejido adiposo central y periférico en humanos ha sido escasamente evaluado y aporta resultados en muchos casos discrepantes. El trabajo publicado recientemente por grupo de Nazare en el que se evaluaba la respuesta a la ingesta de yogures enriquecidos en ácido linoleico durante 14 semanas, en voluntarios sanos, no detectó cambios en la expresión de UCP2 en el tejido adiposo<sup>277</sup>. En estudios previos realizados para valorar la expresión de UCP2 en tejido adiposo los resultados son discordantes. Mientras parece existir una disminución de la expresión de UCP2 en la grasa intraperitoneal en pacientes obesos frente a aquellos con normopeso<sup>278</sup>, estos resultados no son aplicables al analizar la grasa subcutánea<sup>270, 278</sup> ni al estudiar mujeres obesas tras ser sometidas a una dieta muy hipocalórica durante 4 semanas<sup>279</sup>.

Los efectos beneficiosos de la ingesta de una dieta mediterránea rica en aceite de oliva virgen han sido demostrados en multitud de estudios tanto en personas sanas<sup>25, 30, 60, 280-283</sup> como en pacientes con enfermedad cardiovascular previa<sup>284</sup>, hipertensos<sup>28, 39, 285-287</sup>, dislipémicos<sup>288, 289</sup> y diabéticos. En estos últimos e incluso en pacientes con alto riesgo de desarrollar diabetes y tras arduos debates sobre las recomendaciones dietéticas<sup>290</sup>, parece recomendable potenciar la sustitución de las grasas SAT o HC por MONO en la dieta<sup>45, 291-296</sup> llegándose a considerar por el National Cholesterol Education Program (NECP) que la ingesta de grasas dietéticas suponga hasta el 35% del aporte energético total<sup>297</sup>. Los mecanismos por los cuales las grasas MONO mejoran el control glucémico no son del todo conocidos en la actualidad<sup>298</sup> aunque parece existir una relación entre distintos compuestos nutricionales y la modulación de la inflamación<sup>299, 300</sup>.

Al realizar el análisis de los parámetros de control glucídico observamos que la dieta de tipo mediterránea, rica en grasa aportada fundamentalmente en forma de aceite de oliva, mejora el metabolismo hidrocarbonato disminuyendo las concentraciones plasmáticas basales de glucosa e insulina y mejorando la resistencia insulínica determinada mediante HOMA-ir al compararla con la dieta enriquecida en SAT. Estos datos son concordantes con estudios previos en los que la ingesta mantenida de una dieta de tipo mediterránea mejora los parámetros relacionados con el

metabolismo hidrocbonato<sup>40, 44, 301</sup>. Este efecto se mantiene durante la fase postprandial observándose menores áreas bajo las curvas de ambos parámetros. Estos hallazgos son consistentes con el hecho de que los niveles séricos de glucosa tras la ingesta están determinados fundamentalmente por la cantidad y la composición de ácidos grasos<sup>32</sup> e HC consumidos<sup>290, 302</sup> que podría estar relacionado, entre otros factores, con la secreción de péptido tipo 1 similar al glucagón (GLP-1)<sup>303</sup>.

Cuando se analizó el efecto de la intervención dietética sobre el perfil lipídico se comprobó que tras la ingesta de una dieta rica en MONO se observaron mayores concentraciones de HDL, tanto en estado basal como durante toda la fase postprandial, comparadas con las obtenidas tras el consumo de la dieta alta en HC. Este hecho puede estar íntimamente relacionado con la existencia de una menor resistencia insulínica comprobada mediante el HOMA-ir y una menor elevación de la insulinemia postprandial tras el consumo de la dieta mediterránea y es concordante con los hallazgos encontrados en estudios previos. En ellos se muestran mayores concentraciones plasmáticas de HDL e incluso un descenso de las cifras de TG basales<sup>34, 304</sup> así como de remanentes de colesterol y TG tras la ingesta de una dieta rica en grasas MONO al compararla con una dieta rica en grasas SAT<sup>32, 305</sup>.

En los últimos años ha cobrado especial relevancia el concepto de lipemia postprandial, debido al patrón alimentario existente en los países occidentales en los que a excepción del desayuno, el resto de las comidas se realizan cuando aún no se han alcanzado los niveles basales de triglicéridos de la ingesta previa. Tras la ingesta, los AGLs son absorbidos en el intestino y se incorporan a las moléculas de quilomicrones en las células epiteliales intestinales. Posteriormente, pasan al plasma a través del sistema linfático vehiculizadas por la Apo-B48 y mediante la acción de la LPL son hidrolizados en glicerol y ácidos grasos que pueden ser captados por las células musculares para la obtención de energía ( $\beta$ -oxidación) o para su almacenamiento. Los remanentes de quilomicrones son capturados por el hígado a través de los receptores de LDL, sintetizándose VLDL que es nuevamente liberada al plasma e hidrolizada por la LPL. Los nuevos remanentes de VLDL, también llamados lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) pueden seguir dos rutas: escapar a la internalización hepática perdiendo la Apo E y transformándose en LDL o unirse nuevamente a los receptores hepáticos a través de la Apo E y una vez en el interior de la célula, liberan el colesterol que transportan que puede ser almacenado en la propia célula o ser eliminado al exterior mediante la lipasa de membrana que cede a las HDL nacientes el colesterol sobrante. Estas HDL se cargan de colesterol, Apo E y Apo CII además de la proteína A1 que las caracteriza y llevan el colesterol de vuelta al hígado donde será procesado o eliminado.

Los alimentos con un alto contenido graso aumentan las concentraciones plasmáticas tanto de TG como de remanentes de quilomicrones, pero este fenómeno depende del tipo de grasa ingerida<sup>42</sup>. Aunque tanto la ingesta de una dieta rica en grasas POLI como MONO han demostrado ser comparables en cuanto a la respuesta lipoproteica en ayunas, pueden comportarse funcionalmente de distinta manera y presentar una respuesta postprandial diferente<sup>306</sup>. Esto es debido a que en este proceso no sólo influye la absorción, sino también la capacidad de lipólisis y de aclaramiento hepático de los remanentes de quilomicrones<sup>307</sup>. Con respecto a la composición grasa de la dieta se sabe que los quilomicrones formados tras la ingesta de aceite de oliva, tras ser absorbidos en el intestino, entran más rápidamente a la circulación portal por lo que son aclarados más precozmente y que, además, son de mayor tamaño que aquellos obtenidos tras consumir grasas SAT o POLI<sup>36, 37, 308</sup>. Estos factores relacionados con el metabolismo lipídico postprandial están involucrados con la enfermedad cardiovascular. Los datos aportados en multitud de estudios establecen una asociación entre un los niveles de TG plasmáticos tanto en situación de ayuno como postprandial, el retraso en el aclaramiento de las lipoproteínas ricas en TG durante el postprandio y la progresión de la aterosclerosis tanto en la población normal<sup>309, 310</sup>, pacientes con cardiopatía isquémica como en familiares sanos de estos enfermos<sup>311</sup> y este hecho podría explicarse por la existencia de un estado de intolerancia grasa determinada genéticamente y que no podría detectarse mediante una determinación sencilla de los TG ayunas<sup>312</sup>. La relación entre el aumento de los TG tras la ingesta y el desarrollo de aterosclerosis se ha relacionado tanto con los efectos directos como indirectos de lipoproteínas ricas en TG o sus componentes. De este modo, los quilomicrones y las VLDL ejercen un efecto negativo directo de citotoxicidad sobre las células endoteliales<sup>313</sup> o a través de cambios en el tono vascular que condicionan la VDE<sup>57</sup>.

Igualmente, el análisis los valores de NT postprandiales y el valor obtenido al calcular el área bajo la curva mostró mayores concentraciones tras la ingesta aguda de una dieta rica en HC que tras la toma de las dietas con alto contenido graso. En nuestra opinión, este hecho podría estar asociado con la metabolización precoz de los HC (glicolisis) en la fase postprandial generando mayor estrés oxidativo que la utilización lipolítica de las grasas. Creemos que si el estudio se hubiese prolongado más durante el postprandio, los valores de NT tras la ingesta de la dieta pobre en grasa se irían reduciendo coincidiendo con un aumento de los valores obtenidos tras el consumo de las dietas grasas que, en el caso de la dieta rica en MONO, se vería amortiguado por el papel antioxidante de algunos micronutrientes presentes en el aceite de oliva virgen. Finalmente, al evaluar la oxidación de la LDL, mediante la cuantificación directa por ELISA de moléculas de LDL-ox, comprobamos que los niveles eran significativamente menores tras la ingesta aguda de la dieta mediterránea rica en aceite de oliva. El aceite de oliva ha demostrado ser un potente antioxidante<sup>51, 314</sup> y se ha comprobado que ejerce una acción protectora frente a la oxidación molecular, entre ellas de la LDL<sup>315-320</sup>. Nuestro grupo ha realizado diferentes estudios a este

respecto corroborando la existencia de una relación directa entre la resistencia a la oxidación y el consumo de aceite de oliva, sugiriendo un papel protagonista de los micronutrientes existentes en el aceite de oliva virgen, fundamentalmente los compuestos fenólicos, como responsables de este efecto<sup>49, 50, 321</sup>. El papel de la LDL-ox en el inicio de la formación de la placa de ateroma es bien conocido al provocar su fagocitosis por los macrófagos que al no poder eliminarlas, se acumulan, transformándose en células espumosas e iniciando el proceso aterosclerótico<sup>142, 322</sup>. Estas células inflamatorias activadas en la pared arterial liberan diferentes sustancias y enzimas oxidantes que perpetúan este proceso. Una de ellas es la mieloperoxidasa<sup>323</sup> que induce la formación de ERNs (fundamentalmente ONOO<sup>-</sup>) a partir de la oxidación del NO y entre los metabolitos producidos se encuentra la NT que es un marcador indirecto de la producción de ONOO<sup>-249</sup>. Esta molécula es un excelente indicador de daño oxidativo que va a intervenir en las modificaciones oxidativas de las moléculas de LDL, indispensables para que éstas sean reconocidas y fagocitadas por los macrófagos<sup>246</sup> y, a diferencia del NO, es una molécula estable y tiene una vida media más prolongada (el tiempo de vida media de las proteínas nitrosiladas es de alrededor de 1,6 horas)<sup>324</sup>. Otra de sus características importantes es que generalmente no es detectable en el plasma de personas sanas<sup>249, 325, 326</sup>, característica que la hace muy útil para detectar la presencia de inflamación. En los últimos años, se han llevado a cabo múltiples estudios con el fin de validar la importancia clínica de la NT y se han encontrado una relación entre las concentraciones plasmáticas elevadas de esta proteína y el grado de inflamación. Además, parece que los residuos de tirosina modificados pueden jugar un papel fundamental en el inicio de la formación de la estría grasa, así como en los fenómenos de ruptura de la placa y el desarrollo de trombosis<sup>327</sup>. De este modo, se han encontrado altos niveles de NT en pacientes fumadores<sup>328</sup>, con enfermedades vasculares como la presencia de un aneurisma en la aorta abdominal<sup>329</sup>, en enfermos sometidos a hemodiálisis<sup>330</sup> y en diabéticos<sup>331</sup> en los que además, los valores de esta proteína se correlacionan de forma directa con las concentraciones de glucosa plasmática, sugiriendo que la NT podría ser, al menos, un marcador de daño oxidativo por hiperglucemia en pacientes diabéticos<sup>163, 249</sup> y, aún más, un marcador de daño directo de las células endoteliales<sup>332</sup>. En éstos últimos, en condiciones de hiperglucemia se crea un ambiente prooxidante que condiciona una gran producción de moléculas de O<sub>2</sub><sup>-</sup> generadas en la cadena respiratoria<sup>233, 333</sup> que al interactuar con el NO llevan a la producción de ERNs y a la reducción de los efectos biológicos del NO<sup>249</sup> que contribuyen a la aparición de la disfunción endotelial<sup>163, 334</sup> y, en última instancia, de las complicaciones vasculares de la diabetes<sup>249</sup>.

Por último, cuando analizamos la funcionalidad del endotelio, encontramos que tanto el consumo mantenido de una dieta rica en MONO como una ingesta aguda, mejoran la actividad hiperémica microvascular dependiente del endotelio tanto de forma basal como a las 3 horas tras la ingesta, en individuos con resistencia a la insulina. La valoración de la función endotelial ha sido objeto de

estudio en multitud de situaciones y patologías, entre ellas la existencia de resistencia insulínica y en la DM2 demostrándose la presencia de una alteración en la VDE independientemente del método de evaluación elegido<sup>335</sup>. El desarrollo de la disfunción endotelial en la resistencia insulínica es debido a distintos mecanismos que finalmente desencadenan la producción de inflamación<sup>336</sup> y estrés oxidativo<sup>337-339</sup> reduciendo la biodisponibilidad de NO y promoviendo, en última instancia, la apoptosis de las células endoteliales<sup>340</sup>. Aún así, no está establecido si la resistencia insulínica es un factor desencadenante o una consecuencia de la alteración en la VDE ya que la propia resistencia a la insulina induce una mayor producción de citoquinas inflamatorias como consecuencia de una disminución del efecto antiinflamatorio de esta hormona en esta situación<sup>40, 341, 342</sup>.

Nuestro objetivo de trabajo era evaluar si en estos pacientes en los que ya existe una disfunción del endotelio, la administración tanto aguda como crónica de distintos modelos dietéticos podría modificarla.

Tras la ingesta de alimentos, se produce un incremento de los parámetros inflamatorios, de las moléculas de adhesión y se genera la presencia de estrés oxidativo que culminará provocando una disfunción del endotelio y finalmente el desarrollo de aterogénesis<sup>343</sup>. Este efecto puede ser causado tanto por las grasas como por los HC y en pacientes diabéticos este proceso se magnifica debido a la presencia de una mayor hiperglucemia e hiperinsulinemia postprandial, que determinan una mayor producción de EROs y, por tanto, más estrés oxidativo<sup>344, 345</sup>. A pesar de ello, el grado de estrés oxidativo y por tanto, de disfunción endotelial depende del tipo de alimento ingerido. Los datos obtenidos en personas sanas, demuestran que la ingesta de una dieta grasa rica en grasas SAT provoca la aparición de una mayor alteración de la función endotelial durante el postprandio<sup>57, 346-348</sup> que cuando se consumen grasas dentro de una dieta mediterránea, observándose una atenuación del descenso de la funcionalidad del endotelio postprandial<sup>40, 57, 281, 349-352</sup>. Este resultado también se produce en pacientes hipercolesterolémicos<sup>52</sup> y con síndrome metabólico en los que se observa una mejora de la disfunción endotelial postprandial que se correlaciona con una disminución significativa en los marcadores inflamatorios vasculares como la PCR ultrasensible y ciertas citoquinas proinflamatorias<sup>40</sup> y en pacientes diabéticos en los que tras consumir durante 2 meses una dieta rica en MONO se objetivó una mayor respuesta VDE que tras la ingesta mantenida de POLI<sup>353</sup>.

Por tanto, hemos demostrado que la dieta mediterránea basada en el consumo de aceite de oliva posee propiedades antioxidantes que disminuyen la disfunción endotelial postprandial al reducir los niveles de EROs y, de este modo, disminuir la producción de eicosanoides y moléculas de adhesión que perpetúan el proceso. Este efecto antioxidante no es sólo debido a su composición

de ácidos grasos basados fundamentalmente en el ácido oléico, sino también a la presencia de micronutrientes de los que carecen otros aceites vegetales.

## **VIII. CONCLUSIONES**

### **CONCLUSIÓN PRINCIPAL:**

La ingesta aguda de una dieta alta en hidratos de carbono incrementa la expresión génica postprandial de UCP2 en el tejido adiposo periférico, en personas con resistencia a la insulina y obesidad central, comparada con el consumo isocalórico de una dieta alta en grasa monoinsaturada.

### **CONCLUSIONES SECUNDARIAS:**

1º Tras la ingesta de un desayuno rico en aceite de oliva, se observa un menor incremento plasmático de los niveles de nitrotirosina y LDL oxidada.

2º La respuesta vasodilatadora microvascular dependiente del endotelio basal es mayor tras el consumo de una dieta rica en grasas monoinsaturadas observándose, además, un menor descenso de la misma tras la ingesta del desayuno basado en la dieta mediterránea.

3º La ingesta de una dieta mediterránea mejora el metabolismo hidrocarbonado, disminuyendo los niveles basales y postprandiales de glucosa e insulina y mejorando la resistencia a la insulina.

4º La dieta rica en aceite de oliva incrementó los niveles basales y postprandiales de HDL, no observándose diferencias en el resto de parámetros del perfil lipídico.



## IX. ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico  
AAPH: hidrocloreuro 2-aminopropano  
ABC: área bajo la curva  
Acetil-CoA: acetil coenzima A  
Acil-CoA: acil coenzima A  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADP: adenosina difosfato  
AGLs: ácidos grasos libres  
AGNEs: ácidos grasos no esterificados  
AKT: proteín-kinasa B  
ALT: alanino aminotransferasa  
ANC: transportador de nucleótidos de adenina  
ANOVA: análisis de la varianza  
ApoA-I: apolipoproteína A-I  
ApoA-II: apolipoproteína A-II  
ApoB: apolipoproteína B  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
AST: aspartato aminotransferasa  
ATP: adenosina trifosfato  
BH<sub>4</sub>: tetrahidropterina  
BMCP1: proteína transportadora mitocondrial cerebral tipo 1  
cDNA: ADN complementario  
CEPT: proteína transportadora de ésteres de colesterol  
CO<sub>3</sub><sup>-</sup>: carbonato  
COX: ciclooxigenasa  
DE: Desviación estándar  
DM: diabetes mellitus  
DM2: diabetes mellitus tipo 2  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EEUU: Estados Unidos  
ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas  
ERK: kinasas relacionadas con la señalización extracelular  
ERNs: especies reactivas de nitrógeno  
EROs: especies reactivas de oxígeno  
F-1, 6-P: fructosa 1-6 bifosfato

F6P: fructosa 6-fosfato  
FAD: dinucleótido de flavina  
FADH<sub>2</sub>: flavina adenina dinucleótido  
FAOOH: hidroperóxidos de ácidos grasos  
FCVE: factor de crecimiento vascular endotelial  
FMN: mononucleótido de flavina  
FSH: hormona folículo-estimulante  
FSM: flujo sanguíneo miocárdico  
ft: fentogramos  
GCB: gasto calórico basal  
GDP: guanina difosfato  
GE: gasto energético  
GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa  
GIM: grosor íntima-media  
GLP-1: péptido tipo 1 similar al glucagón  
G6p: glucosa 6-fosfato  
G-1-P: glucosa 1-fosfato  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HO<sub>2</sub><sup>-</sup>: hidroperoxilo  
HbA<sub>1c</sub>: hemoglobina glicosilada  
HC: hidratos de carbono  
HDL: colesterol vehiculazo en lipoproteínas de alta densidad  
HMG-CoA: hidroximetil-glutaril Coenzima A  
HOMA: Homeostasis model assessment  
HOMA-ir: índice de resistencia insulínica  
HTA: hipertensión arterial  
IDL: lipoproteínas de densidad intermedia  
IGFBP-1: proteína fijadora del factor de crecimiento insulínico tipo 1  
IκB: proteína inhibidora κB  
IKκB: kinasa B que degrada a la proteína inhibidora κB  
ILD: iontoforesis asociada a imágenes mediante laser doppler  
IL-1: interleukina 1  
IL-8: interleukina 8  
IMC: índice de masa corporal  
IRS-1: sustrato 1 del receptor de la insulina  
ISIm: índice de sensibilidad insulínica de Matsuda  
JNK/SAPK: kinasas Jun NH<sub>2</sub>-terminal/proteín kinasas activadas por estrés

KPAM: kinasa de la proteína activada por mitógeno  
LDL: colesterol vehiculazo en lipoproteínas de baja densidad  
LDL-ox: lipoproteína de baja densidad oxidada  
LpA: lipoproteína A  
LPL: lipoproteín-lipasa  
MEDLARS: Medical literature analysis and retrieval system  
MeSH: Medical subjects headings  
MONO: ácidos grasos monoinsaturados  
MPO: mieloperoxidasa  
N: nitrógeno  
NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido  
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido  
NECP: National Cholesterol Education Programme  
NF-κB: factor nuclear κB  
N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: óxido nítrico  
NO: óxido nítrico  
NO<sup>+</sup>: catión nitroso  
NO<sup>-</sup>: anión nitroxilo  
NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrógeno  
NOS: óxido nítrico sintetasa  
NT (= NO<sub>2</sub>-Tyr) : nitrotirosina  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxígeno singlete  
O<sub>2</sub>: oxígeno  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superóxido  
OH<sup>-</sup>: radicales hidroxilo  
ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito  
ONOOH: ácido peroxinitroso  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
p38 MAPK: proteín-kinasa activadora mitogénica p38  
PAI-1: factor inhibidor de la activación del plasminógeno  
pb: pares de bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
PE: producción energética  
PET: tomografía mediante emisión de positrones  
PGC 1α y 1β: coactivadores 1α y 1β del receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma  
PH: dominio homólogo a la plectrina

Pi: fosfato inorgánico  
PIP2: fosfatidil inositol difosfato  
PIP3: fosfatidil inositol 3,4,5-trifosfato  
PI3K: fosfatidil inositol 3-kinasa  
PKB: proteín kinasa B  
PKC: proteín kinasa C  
POLI: ácidos grasos poliinsaturados  
POV: pletismografía mediante oclusión venosa  
PTB: dominio de unión a la fosfotirosina  
QR: cociente respiratorio  
RI: receptor de insulina  
RO<sup>•</sup>: alcoxilo  
RO<sub>2</sub><sup>•</sup>: peroxilo  
RPF: receptores de los productos finales de la glicación  
SAPK: proteín-quinasas activadas por estrés  
SAT: ácidos grasos saturados  
SH2: dominio homólogo a la SRC  
SOG: sobrecarga oral de glucosa  
SRI: substrato del receptor de insulina  
T4: tiroxina  
T<sup>a</sup>: temperatura  
TA: tensión arterial  
TBE: solución tampón de tris base, ácido bórico y EDTA  
TD: Tasa de desaparición  
TG: Triacilglicéridos  
TNF-α: factor de necrosis tumoral α  
TSH: hormona estimulante del tiroides  
TTNPB: receptor de retinoides selectivo para el ácido retinoico  
UCPs: proteínas desacoplantes  
UCP1: proteína desacoplante 1  
UCP2: proteína desacoplante 2  
UCP3: proteína desacoplante 3  
UCP4: proteína desacoplante 4  
UCP5: proteína desacoplante 5  
UQ<sup>•</sup>: ubisemiquinona  
UQH<sub>2</sub>: ubiquinol  
USDA: United States Department of Agriculture

$\dot{V}CO_2$ : tasa de consumo de dióxido de carbono

VDE: vasodilatación dependiente del endotelio

VIE: vasodilatación independiente del endotelio

VLDL: colesterol vehiculazo en lipoproteínas de muy baja densidad

$\dot{V}O_2$ : tasa de consumo de oxígeno



## IX. ABREVIATURAS

- <sup>1</sup> **Diabetes Programme for 2004-2006.** WHO (World Health Organisation). 2004-2006:
- <sup>2</sup> Lipton RB, Drum M, Burnet D, Rich B, Cooper A, Baumann E and Hagopian W. **Obesity at the onset of diabetes in an ethnically diverse population of children: what does it mean for epidemiologists and clinicians?** *Pediatrics* 2005;115:e553-60.
- <sup>3</sup> Mazza CS, Ozuna B, Krochik AG and Araujo MB. **Prevalence of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in obese Argentinean children and adolescents.** *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18:491-8.
- <sup>4</sup> Gungor N and Arslanian S. **Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents: treatment implications.** *Treat Endocrinol* 2002;1:359-71.
- <sup>5</sup> McKnight-Menci H, Sababu S and Kelly SD. **The care of children and adolescents with type 2 diabetes.** *J Pediatr Nurs* 2005;20:96-106; quiz 7-8.
- <sup>6</sup> Elbein SC, Hasstedt SJ, Wegner K and Kahn SE. **Heritability of pancreatic beta-cell function among nondiabetic members of Caucasian familial type 2 diabetic kindreds.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1398-403.
- <sup>7</sup> Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J and Salonen JT. **The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men.** *Jama* 2002;288:2709-16.
- <sup>8</sup> Kannel WB and McGee DL. **Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study.** *Jama* 1979;241:2035-8.
- <sup>9</sup> Polonsky KS, Sturis J and Bell GI. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance.** *N Engl J Med* 1996;334:777-83.
- <sup>10</sup> Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, Cantin B, Dagenais GR, Moorjani S and Lupien PJ. **Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease.** *N Engl J Med* 1996;334:952-7.
- <sup>11</sup> Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Jansen S, Zambrana JL, Lopez Segura F, Jimenez Pereperez JA and Perez-Jimenez F. **Increased high-density lipoprotein-3 binding to leukocytes following weight loss and improved glycemic control in type 2 diabetic patients.** *Metabolism* 2000;49:692-7.
- <sup>12</sup> Haffner SM. **Epidemiology of insulin resistance and its relation to coronary artery disease.** *Am J Cardiol* 1999;84:11J-4J.
- <sup>13</sup> Reaven GM. **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.** *Diabetes* 1988;37:1595-607.
- <sup>14</sup> Reaven GM. **Pathophysiology of insulin resistance in human disease.** *Physiol Rev* 1995;75:473-86.
- <sup>15</sup> Pinkney JH, Stehouwer CD, Coppack SW and Yudkin JS. **Endothelial dysfunction: cause of the insulin resistance syndrome.** *Diabetes* 1997;46 Suppl 2:S9-13.
- <sup>16</sup> Laight DW, Carrier MJ and Anggard EE. **Antioxidants, diabetes and endothelial dysfunction.** *Cardiovasc Res* 2000;47:457-64.
- <sup>17</sup> Zimmet P, Alberti KG and Shaw J. **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** *Nature* 2001;414:782-7.

- <sup>18</sup> Tounian P, Aggoun Y, Dubern B, Varille V, Guy-Grand B, Sidi D, Girardet JP and Bonnet D. **Presence of increased stiffness of the common carotid artery and endothelial dysfunction in severely obese children: a prospective study.** *Lancet* 2001;358:1400-4.
- <sup>19</sup> Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C and Celermajer DS. **Overweight in children is associated with arterial endothelial dysfunction and intima-media thickening.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:852-7.
- <sup>20</sup> Woo KS, Chook P, Yu CW, Sung RY, Qiao M, Leung SS, Lam CW, Metreweli C and Celermajer DS. **Effects of diet and exercise on obesity-related vascular dysfunction in children.** *Circulation* 2004;109:1981-6.
- <sup>21</sup> Raitakari OT and Celermajer DS. **Testing for endothelial dysfunction.** *Ann Med* 2000;32:293-304.
- <sup>22</sup> **Globalization, diets and noncommunicable diseases.** WHO Report QT. 2002:235.
- <sup>23</sup> Kafatos A and Codrington CA. **Nutrition and diet for healthy lifestyles in Europe: the 'Eurodiet' Project.** *Public Health Nutr* 1999;2:327-8.
- <sup>24</sup> Marshall JA, Bessesen DH and Hamman RF. **High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: the San Luis Valley Diabetes Study.** *Diabetologia* 1997;40:430-8.
- <sup>25</sup> Perez-Jimenez F, Fernandez Duenas A, Lopez-Miranda J and Jimenez-Pereperez JA. **Olive oil: healthy food since caliphal time to the threshold of the new millennium.** *Med Clin (Barc)* 2000;114:219-21.
- <sup>26</sup> Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Keys MH and et al. **The diet and 15-year death rate in the seven countries study.** *Am J Epidemiol* 1986;124:903-15.
- <sup>27</sup> de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P and Delaye J. **Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease.** *Lancet* 1994;343:1454-9.
- <sup>28</sup> Trichopoulou A, Bamia C, Norat T, Overvad K, Schmidt EB, Tjonneland A, Halkjaer J, Clavel-Chapelon F, Vercambre MN, Boutron-Ruault MC, Linseisen J, Rohrmann S, Boeing H, Weikert C, Benetou V, Psaltopoulou T, Orfanos P, Boffetta P, Masala G, Pala V, Panico S, Tumino R, Sacerdote C, Bueno-de-Mesquita HB, Ocke MC, Peeters PH, Van der Schouw YT, Gonzalez C, Sanchez MJ, Chirlaque MD, Moreno C, Larranaga N, Van Guelpen B, Jansson JH, Bingham S, Khaw KT, Spencer EA, Key T, Riboli E and Trichopoulos D. **Modified Mediterranean diet and survival after myocardial infarction: the EPIC-Elderly study.** *Eur J Epidemiol* 2007;22:871-81.
- <sup>29</sup> Trichopoulou A, Bamia C and Trichopoulos D. **Mediterranean diet and survival among patients with coronary heart disease in Greece.** *Arch Intern Med* 2005;165:929-35.
- <sup>30</sup> Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C and Trichopoulos D. **Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population.** *N Engl J Med* 2003;348:2599-608.
- <sup>31</sup> Grundy SM and Denke MA. **Dietary influences on serum lipids and lipoproteins.** *J Lipid Res* 1990;31:1149-72.
- <sup>32</sup> Thomsen C, Storm H, Holst JJ and Hermansen K. **Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 responses in patients with type 2 diabetes.** *Am J Clin Nutr* 2003;77:605-11.
- <sup>33</sup> Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sanchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, Escribano A, Moyano MJ, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J and Perez-Jimenez F. **A MUFA-Rich Diet Improves Postprandial Glucose, Lipid and GLP-1 Responses in Insulin-Resistant Subjects.** *J Am Coll Nutr* 2007;26:434-44.

- <sup>34</sup> Mensink RP, Zock PL, Kester AD and Katan MB. **Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials.** *Am J Clin Nutr* 2003;77:1146-55.
- <sup>35</sup> Thijssen MA and Mensink RP. **Small differences in the effects of stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on the serum lipoprotein profile of humans.** *Am J Clin Nutr* 2005;82:510-6.
- <sup>36</sup> Silva KD, Kelly CN, Jones AE, Smith RD, Wootton SA, Miller GJ and Williams CM. **Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids.** *Atherosclerosis* 2003;166:73-84.
- <sup>37</sup> Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, Webb D, Brooks C, Jackson KG, Wright JW, Gould BJ, Kafatos A, Gibney MJ and Williams CM. **Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism.** *Am J Clin Nutr* 1998;68:552-60.
- <sup>38</sup> Sawada M, Washizuka K and Okumura H. **Synthesis and biological activity of a novel squalene epoxidase inhibitor, FR194738.** *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:633-7.
- <sup>39</sup> Salas J, Lopez Miranda J, Jansen S, Zambrana JL, Castro P, Paniagua JA, Blanco A, Lopez Segura F, Jimenez Pereperez JA and Perez Jimenez F. **The diet rich in monounsaturated fat modifies in a beneficial way carbohydrate metabolism and arterial pressure.** *Med Clin (Barc)* 1999;113:765-9.
- <sup>40</sup> Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F and Giugliano D. **Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial.** *Jama* 2004;292:1440-6.
- <sup>41</sup> Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti J, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, Marrugat J, Bruguera J, Lopez-Sabater MC, Vila J and Covas MI. **Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial.** *Atherosclerosis* 2005;181:149-58.
- <sup>42</sup> Thomsen C, Rasmussen O, Christiansen C, Pedersen E, Vesterlund M, Storm H, Ingerslev J and Hermansen K. **Comparison of the effects of a monounsaturated fat diet and a high carbohydrate diet on cardiovascular risk factors in first degree relatives to type-2 diabetic subjects.** *Eur J Clin Nutr* 1999;53:818-23.
- <sup>43</sup> Garg A. **High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis.** *Am J Clin Nutr* 1998;67:577S-82S.
- <sup>44</sup> Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Pinillos MD, Gomez P, Paz-Rojas E, Montilla P, Marin C, Velasco MJ, Blanco-Molina A, Jimenez Pereperez JA and Ordovas JM. **A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons.** *Diabetologia* 2001;44:2038-43.
- <sup>45</sup> Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nansen C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB and Storlien LH. **Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study.** *Diabetologia* 2001;44:312-9.
- <sup>46</sup> Paniagua JA, Gallego de la Sacristana A, Romero I, Vidal-Puig A, Latre JM, Sanchez E, Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J and Perez-Jimenez F. **Monounsaturated fat-rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects.** *Diabetes Care* 2007;30:1717-23.
- <sup>47</sup> Shah M, Adams-Huet B, Brinkley L, Grundy SM and Garg A. **Lipid, glycemic, and insulin responses to meals rich in saturated, cis-monounsaturated, and polyunsaturated (n-3 and n-6) fatty acids in subjects with type 2 diabetes mellitus.** *Diabetes Care* 2007;

- <sup>48</sup> Charo IF and Ransohoff RM. **The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation.** *N Engl J Med* 2006;354:610-21.
- <sup>49</sup> Lopez-Miranda J, Gomez P, Castro P, Marin C, Paz E, Bravo MD, Blanco J, Jimenez-Pereperez J, Fuentes F and Perez-Jimenez F. **[Mediterranean diet improves low density lipoprotein susceptibility to oxidative modifications].** *Med Clin (Barc)* 2000;115:361-5.
- <sup>50</sup> Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, Lozano A, Gomez P, Jimenez Y and Perez Jimenez F. **Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients.** *J Am Coll Cardiol* 2005;46:1864-8.
- <sup>51</sup> Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albaladejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J and Covas MI. **Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men.** *J Nutr* 2004;134:2314-21.
- <sup>52</sup> Fuentes F, Lopez-Miranda J, Sanchez E, Sanchez F, Paez J, Paz-Rojas E, Marin C, Gomez P, Jimenez-Pereperez J, Ordovas JM and Perez-Jimenez F. **Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men.** *Ann Intern Med* 2001;134:1115-9.
- <sup>53</sup> Gomez P, Fernandez de la Puebla RA, Castro P, Lopez-Miranda J, Marin C, Fuentes F, Perez-Martinez P, Velasco F, Moreno JA, Torres A and Perez-Jimenez F. **[Effect of the Mediterranean diet on fasting concentrations of activated factor VII in healthy persons].** *Rev Esp Cardiol* 2005;58:285-9.
- <sup>54</sup> Fernandez de la Puebla RA, Perez-Martinez P, Carmona J, Lopez-Miranda Carmen Marin J, Paniagua JA, Fuentes F and Perez-Jimenez F. **Factor VII polymorphisms influence the plasma response to diets with different fat content, in a healthy Caucasian population.** *Mol Nutr Food Res* 2007;51:618-24.
- <sup>55</sup> Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J and Mata P. **Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol.** *Atherosclerosis* 2002;163:385-98.
- <sup>56</sup> Raitakari OT, Lai N, Griffiths K, McCredie R, Sullivan D and Celermajer DS. **Enhanced peripheral vasodilation in humans after a fatty meal.** *J Am Coll Cardiol* 2000;36:417-22.
- <sup>57</sup> Vogel RA, Corretti MC and Plotnick GD. **Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects.** *Am J Cardiol* 1997;79:350-4.
- <sup>58</sup> Plotnick GD, Corretti MC and Vogel RA. **Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium-dependent brachial artery vasoactivity following a single high-fat meal.** *Jama* 1997;278:1682-6.
- <sup>59</sup> McCarty MF. **Does postprandial storage of triglycerides in endothelial cells contribute to the endothelial dysfunction associated with insulin resistance and fatty diets?** *Med Hypotheses* 2003;61:167-72.
- <sup>60</sup> Perez-Jimenez F. **International conference on the healthy effect of virgin olive oil.** *Eur J Clin Invest* 2005;35:421-4.
- <sup>61</sup> Bartsch H, Nair J and Owen RW. **Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers.** *Carcinogenesis* 1999;20:2209-18.
- <sup>62</sup> La Vecchia C and Bosetti C. **Diet and cancer risk in Mediterranean countries: open issues.** *Public Health Nutr* 2006;9:1077-82.
- <sup>63</sup> Ricquier D. **Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure.** *Proc Nutr Soc* 2005;64:47-52.
- <sup>64</sup> Gerich JE. **Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus.** *Mayo Clin Proc* 2003;78:447-56.

- <sup>65</sup> Nicholls DG and Locke RM. **Thermogenic mechanisms in brown fat.** *Physiol Rev* 1984;64:1-64.
- <sup>66</sup> Jezek P, Zackova M, Ruzicka M, Skobisova E and Jaburek M. **Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies.** *Physiol Res* 2004;53 Suppl 1:S199-211.
- <sup>67</sup> Langin D. **Diabetes, insulin secretion, and the pancreatic beta-cell mitochondrion.** *N Engl J Med* 2001;345:1772-4.
- <sup>68</sup> Porter RK, Hulbert AJ and Brand MD. **Allometry of mitochondrial proton leak: influence of membrane surface area and fatty acid composition.** *Am J Physiol* 1996;271:R1550-60.
- <sup>69</sup> St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ and Brand MD. **Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain.** *J Biol Chem* 2002;277:44784-90.
- <sup>70</sup> Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL and Parker N. **Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins.** *Free Radic Biol Med* 2004;37:755-67.
- <sup>71</sup> DeFronzo RA, Bonadonna RC and Ferrannini E. **Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview.** *Diabetes Care* 1992;15:318-68.
- <sup>72</sup> Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS and Kahn CR. **Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents.** *Ann Intern Med* 1990;113:909-15.
- <sup>73</sup> Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA and Butler PC. **Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2003;52:102-10.
- <sup>74</sup> Lazar MA. **How obesity causes diabetes: not a tall tale.** *Science* 2005;307:373-5.
- <sup>75</sup> Randle PJ, Garland PB, Hales CN and Newsholme EA. **The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.** *Lancet* 1963;1:785-9.
- <sup>76</sup> Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF and Shulman GI. **Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity.** *J Clin Invest* 1999;103:253-9.
- <sup>77</sup> Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW and Shulman GI. **Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance.** *Science* 2003;300:1140-2.
- <sup>78</sup> Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R and Shulman GI. **Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes.** *N Engl J Med* 2004;350:664-71.
- <sup>79</sup> Shulman GI. **Cellular mechanisms of insulin resistance.** *J Clin Invest* 2000;106:171-6.
- <sup>80</sup> Hanak P and Jezek P. **Mitochondrial uncoupling proteins and phylogenesis--UCP4 as the ancestral uncoupling protein.** *FEBS Lett* 2001;495:137-41.
- <sup>81</sup> Polonsky KS and Semenkovich CF. **The pancreatic beta cell heats up: UCP2 and insulin secretion in diabetes.** *Cell* 2001;105:705-7.
- <sup>82</sup> Esteves TC and Brand MD. **The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3.** *Biochim Biophys Acta* 2005;1709:35-44.
- <sup>83</sup> Cannon B and Nedergaard J. **Brown adipose tissue: function and physiological significance.** *Physiol Rev* 2004;84:277-359.

- <sup>84</sup> Brand MD and Esteves TC. **Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3.** *Cell Metab* 2005;2:85-93.
- <sup>85</sup> Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC and Brand MD. **Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins.** *Nature* 2002;415:96-9.
- <sup>86</sup> Brand MD, Buckingham JA, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Murphy MP, Pakay JL, Talbot DA and Echtay KS. **Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production.** *Biochem Soc Symp* 2004;203-13.
- <sup>87</sup> Himms-Hagen J and Harper ME. **Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:78-84.
- <sup>88</sup> Goglia F and Skulachev VP. **A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet.** *Faseb J* 2003;17:1585-91.
- <sup>89</sup> Krauss S, Zhang CY and Lowell BB. **The mitochondrial uncoupling-protein homologues.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:248-61.
- <sup>90</sup> Hong Y, Fink BD, Dillon JS and Sivitz WI. **Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells.** *Endocrinology* 2001;142:249-56.
- <sup>91</sup> Wang MY, Shimabukuro M, Lee Y, Trinh KY, Chen JL, Newgard CB and Unger RH. **Adenovirus-mediated overexpression of uncoupling protein-2 in pancreatic islets of Zucker diabetic rats increases oxidative activity and improves beta-cell function.** *Diabetes* 1999;48:1020-5.
- <sup>92</sup> Suh YH, Kim SY, Lee HY, Jang BC, Bae JH, Sohn JN, Bae JH, Suh SI, Park JW, Lee KU and Song DK. **Overexpression of short heterodimer partner recovers impaired glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta-cells overexpressing UCP2.** *J Endocrinol* 2004;183:133-44.
- <sup>93</sup> Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Becard D, Gjinovci A, Keller PA, Wollheim CB, Herrera P, Muzzin P and Assimakopoulos-Jeannet F. **Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species.** *Diabetologia* 2007;50:84-93.
- <sup>94</sup> Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marban E and Wheeler MB. **Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets.** *Diabetes* 1999;48:1482-6.
- <sup>95</sup> Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM and Wheeler MB. **Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action.** *Diabetes* 2001;50:1302-10.
- <sup>96</sup> Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S and Ricquier D. **Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production.** *Nat Genet* 2000;26:435-9.
- <sup>97</sup> Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K and Klingenberg M. **Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1416-21.

- <sup>98</sup> Esteves TC, Echtay KS, Jonassen T, Clarke CF and Brand MD. **Ubiquinone is not required for proton conductance by uncoupling protein 1 in yeast mitochondria.** *Biochem J* 2004;379:309-15.
- <sup>99</sup> Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST and Lowell BB. **Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction.** *J Clin Invest* 2003;112:1831-42.
- <sup>100</sup> Rial E, Aguirregoitia E, Jimenez-Jimenez J and Ledesma A. **Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism.** *Biochim Biophys Acta* 2004;1608:122-30.
- <sup>101</sup> Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ and Brand MD. **A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling.** *Embo J* 2003;22:4103-10.
- <sup>102</sup> Shabalina IG, Jacobsson A, Cannon B and Nedergaard J. **Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids.** *J Biol Chem* 2004;279:38236-48.
- <sup>103</sup> Klingenberg M and Echtay KS. **Uncoupling proteins: the issues from a biochemist point of view.** *Biochim Biophys Acta* 2001;1504:128-43.
- <sup>104</sup> Klingenberg M and Huang SG. **Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue.** *Biochim Biophys Acta* 1999;1415:271-96.
- <sup>105</sup> Garlid KD, Jaburek M and Jezek P. **Mechanism of uncoupling protein action.** *Biochem Soc Trans* 2001;29:803-6.
- <sup>106</sup> Saleh MC, Wheeler MB and Chan CB. **Uncoupling protein-2: evidence for its function as a metabolic regulator.** *Diabetologia* 2002;45:174-87.
- <sup>107</sup> Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D and Warden CH. **Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia.** *Nat Genet* 1997;15:269-72.
- <sup>108</sup> Lentjes KU, Tu N, Chen H, Winnikes U, Reinert I, Marmann G and Pirke KM. **Genomic organization and mutational analysis of the human UCP2 gene, a prime candidate gene for human obesity.** *J Recept Signal Transduct Res* 1999;19:229-44.
- <sup>109</sup> Krauss S, Zhang CY and Lowell BB. **A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:118-22.
- <sup>110</sup> Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB and Lowell BB. **Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes.** *Cell* 2001;105:745-55.
- <sup>111</sup> Prentki M, Joly E, El-Assaad W and Roduit R. **Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes.** *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S405-13.
- <sup>112</sup> Barbe P, Millet L, Larrouy D, Galitzky J, Berlan M, Louvet JP and Langin D. **Uncoupling protein-2 messenger ribonucleic acid expression during very-low-calorie diet in obese premenopausal women.** *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2450-3.
- <sup>113</sup> Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, Ebenbichler C, Paulweber B, Sandhofer F, Ladurner G, Hell E, Strosberg AD, Patsch JR, Krempler F and Patsch W. **A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans.** *Nat Genet* 2001;28:178-83.

- <sup>114</sup> Schrauwen P and Hesselink M. **UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism.** *J Exp Biol* 2002;205:2275-85.
- <sup>115</sup> Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RA and Brand MD. **Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron.** *J Biol Chem* 2003;278:48534-45.
- <sup>116</sup> Boivin M, Camirand A, Carli F, Hoffer LJ and Silva JE. **Uncoupling protein-2 and -3 messenger ribonucleic acids in adipose tissue and skeletal muscle of healthy males: variability, factors affecting expression, and relation to measures of metabolic rate.** *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1975-83.
- <sup>117</sup> Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F and Miroux B. **Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation.** *J Biol Chem* 2001;276:8705-12.
- <sup>118</sup> Rodriguez VM, Portillo MP, Pico C, Macarulla MT and Palou A. **Olive oil feeding up-regulates uncoupling protein genes in rat brown adipose tissue and skeletal muscle.** *Am J Clin Nutr* 2002;75:213-20.
- <sup>119</sup> Faggioni R, Shigenaga J, Moser A, Feingold KR and Grunfeld C. **Induction of UCP2 gene expression by LPS: a potential mechanism for increased thermogenesis during infection.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998;244:75-8.
- <sup>120</sup> Khalfallah Y, Fages S, Laville M, Langin D and Vidal H. **Regulation of uncoupling protein-2 and uncoupling protein-3 mRNA expression during lipid infusion in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue.** *Diabetes* 2000;49:25-31.
- <sup>121</sup> Lanni A, Moreno M, Lombardi A and Goglia F. **Thyroid hormone and uncoupling proteins.** *FEBS Lett* 2003;543:5-10.
- <sup>122</sup> Hidaka S, Yoshimatsu H, Kakuma T, Sakino H, Kondou S, Hanada R, Oka K, Teshima Y, Kurokawa M and Sakata T. **Tissue-specific expression of the uncoupling protein family in streptozotocin-induced diabetic rats.** *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224:172-7.
- <sup>123</sup> Wang HJ, Jin YX, Shen W, Neng J, Wu T, Li YJ and Fu ZW. **Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression.** *Asia Pac J Clin Nutr* 2007;16 Suppl 1:412-7.
- <sup>124</sup> Niki E. **Antioxidants and atherosclerosis.** *Biochem Soc Trans* 2004;32:156-9.
- <sup>125</sup> Harper ME and Gerrits MF. **Mitochondrial uncoupling proteins as potential targets for pharmacological agents.** *Curr Opin Pharmacol* 2004;4:603-7.
- <sup>126</sup> Mattiasson G and Sullivan PG. **The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics.** *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1-38.
- <sup>127</sup> Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS and Lowell BB. **UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue.** *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:79-82.
- <sup>128</sup> Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM and Lowell BB. **Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice.** *J Biol Chem* 2000;275:16258-66.
- <sup>129</sup> Mills EM, Banks ML, Sprague JE and Finkel T. **Pharmacology: uncoupling the agony from ecstasy.** *Nature* 2003;426:403-4.

- <sup>130</sup> Schrauwen P, Hesselink MK, Blaak EE, Borghouts LB, Schaart G, Saris WH and Keizer HA. **Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes.** *Diabetes* 2001;50:2870-3.
- <sup>131</sup> Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, Smith SA, Beeley LJ, Godden RJ, Herrity N, Skehel M, Changani KK, Hockings PD, Reid DG, Squires SM, Hatcher J, Trail B, Latcham J, Rastan S, Harper AJ, Cadenas S, Buckingham JA, Brand MD and Abuin A. **Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean.** *Nature* 2000;406:415-8.
- <sup>132</sup> Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH and Pan G. **UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells.** *FEBS Lett* 1999;443:326-30.
- <sup>133</sup> Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Gubern M, Huang Q, Neverova M, Gregoire F, Easlick J, Raimbault S, Levi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin M, Richard D, Warden C, Bouillaud F and Ricquier D. **BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast.** *J Biol Chem* 1998;273:34611-5.
- <sup>134</sup> Yu XX, Mao W, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH and Pan G. **Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation.** *Faseb J* 2000;14:1611-8.
- <sup>135</sup> Kim-Han JS, Reichert SA, Quick KL and Dugan LL. **BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production.** *J Neurochem* 2001;79:658-68.
- <sup>136</sup> Nagai N, Sakane N, Ueno LM, Hamada T and Moritani T. **The -3826 A-->G variant of the uncoupling protein-1 gene diminishes postprandial thermogenesis after a high fat meal in healthy boys.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:5661-7.
- <sup>137</sup> Yanovski JA, Diament AL, Sovik KN, Nguyen TT, Li H, Sebring NG and Warden CH. **Associations between uncoupling protein 2, body composition, and resting energy expenditure in lean and obese African American, white, and Asian children.** *Am J Clin Nutr* 2000;71:1405-20.
- <sup>138</sup> Dulloo AG, Seydoux J and Jacquet J. **Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance.** *Physiol Behav* 2004;83:587-602.
- <sup>139</sup> Gong DW, He Y and Reitman ML. **Genomic organization and regulation by dietary fat of the uncoupling protein 3 and 2 genes.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:27-32.
- <sup>140</sup> Argyropoulos G and Harper ME. **Uncoupling proteins and thermoregulation.** *J Appl Physiol* 2002;92:2187-98.
- <sup>141</sup> Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA and Elbein SC. **Uncoupling protein-2 polymorphisms in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286:E1-7.
- <sup>142</sup> Ross R. **The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** *Nature* 1993;362:801-9.
- <sup>143</sup> Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK and Deanfield JE. **Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis.** *Lancet* 1992;340:1111-5.
- <sup>144</sup> Luscher TF and Barton M. **Biology of the endothelium.** *Clin Cardiol* 1997;20:II-3-10.
- <sup>145</sup> Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J and Vogel R. **Guidelines for**

**the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.** *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.

<sup>146</sup> Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G and del Soldato P. **Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4202-8.

<sup>147</sup> Beck KF, Eberhardt W, Frank S, Huwiler A, Messmer UK, Muhl H and Pfeilschifter J. **Inducible NO synthase: role in cellular signalling.** *J Exp Biol* 1999;202:645-53.

<sup>148</sup> Moncada S, Palmer RM and Higgs EA. **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.

<sup>149</sup> Woodman RJ, Chew GT and Watts GF. **Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy.** *Drugs* 2005;65:31-74.

<sup>150</sup> Singleton JR, Smith AG, Russell JW and Feldman EL. **Microvascular complications of impaired glucose tolerance.** *Diabetes* 2003;52:2867-73.

<sup>151</sup> Sun D, Huang A, Smith CJ, Stackpole CJ, Connetta JA, Shesely EG, Koller A and Kaley G. **Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar dilation in eNOS knockout mice.** *Circ Res* 1999;85:288-93.

<sup>152</sup> Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM. **Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation.** *Nature* 1999;399:601-5.

<sup>153</sup> Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR, Jr. and Lerman A. **Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction.** *Circulation* 2000;101:948-54.

<sup>154</sup> Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T and Munzel T. **Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease.** *Circulation* 2001;104:2673-8.

<sup>155</sup> Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberardino P, Verdecchia P and Schillaci G. **Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients.** *Circulation* 2001;104:191-6.

<sup>156</sup> Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A and Deanfield JE. **Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults.** *N Engl J Med* 1996;334:150-4.

<sup>157</sup> Raitakari OT and Celermajer DS. **Flow-mediated dilatation.** *Br J Clin Pharmacol* 2000;50:397-404.

<sup>158</sup> Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI, Haber HE, Uprichard AC, Pepine CJ and Pitt B. **Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study.** *Circulation* 1996;94:258-65.

<sup>159</sup> Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R and Dagenais G. **Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.** *N Engl J Med* 2000;342:145-53.

<sup>160</sup> Celermajer DS. **Statins, skin, and the search for a test of endothelial function.** *J Am Coll Cardiol* 2003;42:78-80.

- <sup>161</sup> Vapaatalo H and Mervaala E. **Clinically important factors influencing endothelial function.** *Med Sci Monit* 2001;7:1075-85.
- <sup>162</sup> Taniwaki H, Kawagishi T, Emoto M, Shoji T, Kanda H, Maekawa K, Nishizawa Y and Morii H. **Correlation between the intima-media thickness of the carotid artery and aortic pulse-wave velocity in patients with type 2 diabetes. Vessel wall properties in type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 1999;22:1851-7.
- <sup>163</sup> Paniagua JA, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Vida JM, Fuentes F, Fernandez de la Puebla RA and Perez-Jimenez F. **Oxidized-LDL levels are changed during short-term serum glucose variations and lowered with statin treatment in early Type 2 diabetes: a study of endothelial function and microalbuminuria.** *Diabet Med* 2005;22:1647-56.
- <sup>164</sup> Mott JD, Khalifah RG, Nagase H, Shield CF, 3rd, Hudson JK and Hudson BG. **Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility.** *Kidney Int* 1997;52:1302-12.
- <sup>165</sup> Wilkinson IB, Qasem A, McEniery CM, Webb DJ, Avolio AP and Cockcroft JR. **Nitric oxide regulates local arterial distensibility in vivo.** *Circulation* 2002;105:213-7.
- <sup>166</sup> Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G and Baron AD. **Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance.** *J Clin Invest* 1996;97:2601-10.
- <sup>167</sup> Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ and King GL. **Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin.** *Circulation* 2000;101:676-81.
- <sup>168</sup> Cardillo C, Kilcoyne CM, Nambi SS, Cannon RO, 3rd, Quon MJ and Panza JA. **Vasodilator response to systemic but not to local hyperinsulinemia in the human forearm.** *Hypertension* 1998;32:740-5.
- <sup>169</sup> Shinozaki K, Ayajiki K, Kashiwagi A, Masada M and Okamura T. **Malfunction of vascular control in lifestyle-related diseases: mechanisms underlying endothelial dysfunction in the insulin-resistant state.** *J Pharmacol Sci* 2004;96:401-5.
- <sup>170</sup> Lyon CJ, Law RE and Hsueh WA. **Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis.** *Endocrinology* 2003;144:2195-200.
- <sup>171</sup> Tack CJ, Ong MK, Lutterman JA and Smits P. **Insulin-induced vasodilatation and endothelial function in obesity/insulin resistance. Effects of troglitazone.** *Diabetologia* 1998;41:569-76.
- <sup>172</sup> Beckman KB and Ames BN. **The free radical theory of aging matures.** *Physiol Rev* 1998;78:547-81.
- <sup>173</sup> Lambert AJ and Merry BJ. **Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:R71-9.
- <sup>174</sup> Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ and Packer L. **The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society.** *Diabetes Metab Res Rev* 2001;17:189-212.
- <sup>175</sup> Bian K, Davis K, Kuret J, Binder L and Murad F. **Nitrotyrosine formation with endotoxin-induced kidney injury detected by immunohistochemistry.** *Am J Physiol* 1999;277:F33-40.
- <sup>176</sup> Bian K and Murad F. **Diversity of endotoxin-induced nitrotyrosine formation in macrophage-endothelium-rich organs.** *Free Radic Biol Med* 2001;31:421-9.

- <sup>177</sup> Jezek P and Hlavata L. **Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism.** *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:2478-503.
- <sup>178</sup> Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM. **Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?** *Diabetes* 2003;52:1-8.
- <sup>179</sup> Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR and Mandarino LJ. **Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle.** *J Clin Invest* 2000;105:311-20.
- <sup>180</sup> Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I and Brownlee M. **Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.** *Nature* 2000;404:787-90.
- <sup>181</sup> Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S and Baeuerle PA. **Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli.** *Embo J* 1995;14:2876-83.
- <sup>182</sup> Kaneto H, Xu G, Fujii N, Kim S, Bonner-Weir S and Weir GC. **Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression.** *J Biol Chem* 2002;277:30010-8.
- <sup>183</sup> Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T and Matsuoka TA. **Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity.** *Rev Diabet Stud* 2004;1:165-74.
- <sup>184</sup> Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M and Hotamisligil GS. **A central role for JNK in obesity and insulin resistance.** *Nature* 2002;420:333-6.
- <sup>185</sup> Thompson MP and Kim D. **Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs.** *FEBS Lett* 2004;568:4-9.
- <sup>186</sup> Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV and Rossetti L. **Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake.** *J Clin Invest* 1994;93:2438-46.
- <sup>187</sup> Birnbaum MJ. **Turning down insulin signaling.** *J Clin Invest* 2001;108:655-9.
- <sup>188</sup> Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H and Zick Y. **A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation.** *J Biol Chem* 1997;272:29911-8.
- <sup>189</sup> Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ and Draznin B. **Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells.** *J Biol Chem* 2002;277:1794-9.
- <sup>190</sup> Hartge MM, Unger T and Kintscher U. **The endothelium and vascular inflammation in diabetes.** *Diab Vasc Dis Res* 2007;4:84-8.
- <sup>191</sup> Perticone F, Sciacqua A, Scozzafava A, Ventura G, Laratta E, Pujia A, Federici M, Lauro R and Sesti G. **Impaired endothelial function in never-treated hypertensive subjects carrying the Arg972 polymorphism in the insulin receptor substrate-1 gene.** *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3606-9.
- <sup>192</sup> Baroni MG, D'Andrea MP, Montali A, Pannitteri G, Barilla F, Campagna F, Mazzei E, Lovari S, Seccareccia F, Campa PP, Ricci G, Pozzilli P, Urbinati G and Arca M. **A common mutation of the insulin receptor substrate-1 gene is a risk factor for coronary artery disease.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2975-80.
- <sup>193</sup> Sjöholm A and Nystrom T. **Endothelial inflammation in insulin resistance.** *Lancet* 2005;365:610-2.

- <sup>194</sup> Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, King GL, LoGerfo FW, Horton ES and Veves A. **Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes.** *Diabetes* 1999;48:1856-62.
- <sup>195</sup> Balletshofer BM, Rittig K, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S, Matthaer S, Rett K and Haring HU. **Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance.** *Circulation* 2000;101:1780-4.
- <sup>196</sup> Campia U, Sullivan G, Bryant MB, Waclawiw MA, Quon MJ and Panza JA. **Insulin impairs endothelium-dependent vasodilation independent of insulin sensitivity or lipid profile.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H76-82.
- <sup>197</sup> Fan J, Unoki H, Iwasa S and Watanabe T. **Role of endothelin-1 in atherosclerosis.** *Ann N Y Acad Sci* 2000;902:84-93; discussion -4.
- <sup>198</sup> Piatti P and Monti LD. **Insulin resistance, hyperleptinemia and endothelial dysfunction in coronary restenosis.** *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:160-4.
- <sup>199</sup> Poitout V and Robertson RP. **Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity.** *Endocrinology* 2002;143:339-42.
- <sup>200</sup> Son SM. **Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes.** *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77 Suppl 1:S65-70.
- <sup>201</sup> Ceriello A. **New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy.** *Diabetes Care* 2003;26:1589-96.
- <sup>202</sup> Brownlee M. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** *Nature* 2001;414:813-20.
- <sup>203</sup> Esmatjes E and Vidal J. **[Heart pathology of extracardiac origin. XI. Cardiac repercussions of diabetes mellitus].** *Rev Esp Cardiol* 1998;51:661-70.
- <sup>204</sup> Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R and Channon KM. **Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase.** *Circulation* 2002;105:1656-62.
- <sup>205</sup> Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M, Takahashi M, Wenyi C, Higashiyama S, Fujii J, Suzuki K and Kayanoki Y. **Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy.** *Diabetes* 1996;45 Suppl 3:S81-3.
- <sup>206</sup> Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H and Yasue H. **Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery.** *J Am Coll Cardiol* 1999;34:146-54.
- <sup>207</sup> Elchebly M, Porokhov B, Pulcini T, Berthezene F and Ponsin G. **Alterations in composition and concentration of lipoproteins and elevated cholesteryl ester transfer in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM).** *Atherosclerosis* 1996;123:93-101.
- <sup>208</sup> Borggreve SE, De Vries R and Dullaart RP. **Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins.** *Eur J Clin Invest* 2003;33:1051-69.
- <sup>209</sup> Nofer JR, Kehrel B, Fobker M, Levkau B, Assmann G and von Eckardstein A. **HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport.** *Atherosclerosis* 2002;161:1-16.
- <sup>210</sup> Krentz AJ. **Lipoprotein abnormalities and their consequences for patients with type 2 diabetes.** *Diabetes Obes Metab* 2003;5 Suppl 1:S19-27.
- <sup>211</sup> Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D and Bode-Boger SM. **LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human**

**endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases.** *Circ Res* 2000;87:99-105.

<sup>212</sup> Liao JK, Shin WS, Lee WY and Clark SL. **Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase.** *J Biol Chem* 1995;270:319-24.

<sup>213</sup> Mukherjee S, Coaxum SD, Maleque M and Das SK. **Effects of oxidized low density lipoprotein on nitric oxide synthetase and protein kinase C activities in bovine endothelial cells.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2001;47:1051-8.

<sup>214</sup> Parhami F, Fang ZT, Yang B, Fogelman AM and Berliner JA. **Stimulation of Gs and inhibition of Gi protein functions by minimally oxidized LDL.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2019-24.

<sup>215</sup> Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML, Hahn AW, Werner A and Luscher TF. **Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium.** *Circ Res* 1992;70:1191-7.

<sup>216</sup> Takahara N, Kashiwagi A, Nishio Y, Harada N, Kojima H, Maegawa H, Hidaka H and Kikkawa R. **Oxidized lipoproteins found in patients with NIDDM stimulate radical-induced monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in cultured human endothelial cells.** *Diabetologia* 1997;40:662-70.

<sup>217</sup> Bist A, Fielding PE and Fielding CJ. **Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:10693-8.

<sup>218</sup> Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A and Frenneaux MP. **The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes.** *Atherosclerosis* 2001;154:475-83.

<sup>219</sup> Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G, Molinari AM, Paolisso G, Marfella R and Giugliano D. **Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals.** *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1145-50.

<sup>220</sup> Grieve DJ, Avella MA, Elliott J and Botham KM. **The influence of chylomicron remnants on endothelial cell function in the isolated perfused rat aorta.** *Atherosclerosis* 1998;139:273-81.

<sup>221</sup> Kugiyama K, Doi H, Motoyama T, Soejima H, Misumi K, Kawano H, Nakagawa O, Yoshimura M, Ogawa H, Matsumura T, Sugiyama S, Nakano T, Nakajima K and Yasue H. **Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries.** *Circulation* 1998;97:2519-26.

<sup>222</sup> Kusterer K, Pohl T, Fortmeyer HP, Marz W, Scharnagl H, Oldenburg A, Angermuller S, Fleming I, Usadel KH and Busse R. **Chronic selective hypertriglyceridemia impairs endothelium-dependent vasodilatation in rats.** *Cardiovasc Res* 1999;42:783-93.

<sup>223</sup> Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ and Durrington PN. **Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1812-8.

<sup>224</sup> Barter PJ and Rye KA. **High density lipoproteins and coronary heart disease.** *Atherosclerosis* 1996;121:1-12.

<sup>225</sup> Syvanne M, Kahri J, Virtanen KS and Taskinen MR. **HDLs containing apolipoproteins A-I and A-II (LpA-I:A-II) as markers of coronary artery disease in men with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Circulation* 1995;92:364-70.

<sup>226</sup> Bakker SJ, RG IJ, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO and Heine RJ. **Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction, and beta-cell failure?** *Atherosclerosis* 2000;148:17-21.

- <sup>227</sup> Boden G and Chen X. **Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes.** *J Clin Invest* 1995;96:1261-8.
- <sup>228</sup> Randle PJ, Garland PB, Newsholme EA and Hales CN. **The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus.** *Ann N Y Acad Sci* 1965;131:324-33.
- <sup>229</sup> Steinberg HO, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B and Baron AD. **Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation.** *J Clin Invest* 1997;100:1230-9.
- <sup>230</sup> Steinberg HO, Paradisi G, Hook G, Crowder K, Cronin J and Baron AD. **Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production.** *Diabetes* 2000;49:1231-8.
- <sup>231</sup> Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H and Nawata H. **High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells.** *Diabetes* 2000;49:1939-45.
- <sup>232</sup> Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E and Smith C. **Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men.** *J Clin Invest* 1991;88:960-6.
- <sup>233</sup> Paolisso G and Giugliano D. **Oxidative stress and insulin action: is there a relationship?** *Diabetologia* 1996;39:357-63.
- <sup>234</sup> Yu Y, Suo L, Yu H, Wang C and Tang H. **Insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes patients with or without microalbuminuria.** *Diabetes Res Clin Pract* 2004;65:95-104.
- <sup>235</sup> Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW and Steiner G. **Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals.** *Diabetes* 1993;42:833-42.
- <sup>236</sup> Matsuda M and DeFronzo RA. **Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp.** *Diabetes Care* 1999;22:1462-70.
- <sup>237</sup> Vettor R, Mingrone G, Manco M, Granzotto M, Milan G, Scarda A, Lombardi A, Greco AV and Federspil G. **Reduced expression of uncoupling proteins-2 and -3 in adipose tissue in post-obese patients submitted to biliopancreatic diversion.** *Eur J Endocrinol* 2003;148:543-50.
- <sup>238</sup> Harris J and Benedict F. **A biometric study of basal metabolism in man.** Carnegie Institute of Washington. Washington D.C.; 1919:
- <sup>239</sup> Agriculture HNISDo. **Composition of foods.** US Government Printing Office. Washington DC; 1987:
- <sup>240</sup> Varela G. **Food composition tables.** Instituto de Nutrición CSIC. Madrid; 1980:
- <sup>241</sup> Ferrannini E. **The theoretical bases of indirect calorimetry: a review.** *Metabolism* 1988;37:287-301.
- <sup>242</sup> Livesey G and Elia M. **Estimation of energy expenditure, net carbohydrate utilization, and net fat oxidation and synthesis by indirect calorimetry: evaluation of errors with special reference to the detailed composition of fuels.** *Am J Clin Nutr* 1988;47:608-28.
- <sup>243</sup> Friedewald WT, Levy RI and Fredrickson DS. **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.** *Clin Chem* 1972;18:499-502.

- <sup>244</sup> Wang ST and Peter F. **Gas-liquid chromatographic determination of fatty acid composition of cholesteryl esters in human serum using silica Sep-Pak cartridges.** *J Chromatogr* 1983;276:249-56.
- <sup>245</sup> Ischiropoulos H. **Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species.** *Arch Biochem Biophys* 1998;356:1-11.
- <sup>246</sup> Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V and Moncada S. **Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor.** *FEBS Lett* 1993;330:181-5.
- <sup>247</sup> Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA and Freeman BA. **Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1620-4.
- <sup>248</sup> Beckman JS and Koppenol WH. **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** *Am J Physiol* 1996;271:C1424-37.
- <sup>249</sup> Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L and Taboga C. **Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress.** *Diabetologia* 2001;44:834-8.
- <sup>250</sup> Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF and Turner RC. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** *Diabetologia* 1985;28:412-9.
- <sup>251</sup> Bao S, Kennedy A, Wojciechowski B, Wallace P, Ganaway E and Garvey WT. **Expression of mRNAs encoding uncoupling proteins in human skeletal muscle: effects of obesity and diabetes.** *Diabetes* 1998;47:1935-40.
- <sup>252</sup> Nagy TR, Blaylock ML and Garvey WT. **Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity.** *Nutrition* 2004;20:139-44.
- <sup>253</sup> Boss O, Bobbioni-Harsch E, Assimacopoulos-Jeannet F, Muzzin P, Munger R, Giacobino JP and Golay A. **Uncoupling protein-3 expression in skeletal muscle and free fatty acids in obesity.** *Lancet* 1998;351:1933.
- <sup>254</sup> Bezaire V, Spriet LL, Campbell S, Sabet N, Gerrits M, Bonen A and Harper ME. **Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation.** *Faseb J* 2005;19:977-9.
- <sup>255</sup> Weigle DS, Selfridge LE, Schwartz MW, Seeley RJ, Cummings DE, Havel PJ, Kuijper JL and BeltrandelRio H. **Elevated free fatty acids induce uncoupling protein 3 expression in muscle: a potential explanation for the effect of fasting.** *Diabetes* 1998;47:298-302.
- <sup>256</sup> Petzke KJ, Riese C and Klaus S. **Short-term, increasing dietary protein and fat moderately affect energy expenditure, substrate oxidation and uncoupling protein gene expression in rats.** *J Nutr Biochem* 2007;18:400-7.
- <sup>257</sup> Dalgaard LT and Pedersen O. **Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes.** *Diabetologia* 2001;44:946-65.
- <sup>258</sup> Gable DR, Stephens JW, Cooper JA, Miller GJ and Humphries SE. **Variation in the UCP2-UCP3 gene cluster predicts the development of type 2 diabetes in healthy middle-aged men.** *Diabetes* 2006;55:1504-11.
- <sup>259</sup> Bulotta A, Ludovico O, Coco A, Di Paola R, Quattrone A, Carella M, Pellegrini F, Prudente S and Trischitta V. **The common -866G/A polymorphism in the promoter region of the UCP-2 gene is associated with reduced risk of type 2 diabetes in Caucasians from Italy.** *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1176-80.

- <sup>260</sup> Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R, Ebenbichler C, Patsch JR, Miller K, Xie M, Linnemayr V, Oberkofler H and Patsch W. **A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans.** *Diabetes* 2002;51:3331-5.
- <sup>261</sup> Piers LS, Walker KZ, Stoney RM, Soares MJ and O'Dea K. **Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men.** *Br J Nutr* 2003;90:717-27.
- <sup>262</sup> Muoio DM, MacLean PS, Lang DB, Li S, Houmard JA, Way JM, Winegar DA, Corton JC, Dohm GL and Kraus WE. **Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta.** *J Biol Chem* 2002;277:26089-97.
- <sup>263</sup> Lowell BB and Shulman GI. **Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.** *Science* 2005;307:384-7.
- <sup>264</sup> Adams JM, 2nd, Pratipanawat T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC and Mandarino LJ. **Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans.** *Diabetes* 2004;53:25-31.
- <sup>265</sup> Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Colditz G, Liu S, Solomon CG and Willett WC. **Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women.** *N Engl J Med* 2001;345:790-7.
- <sup>266</sup> Koh-Banerjee P, Wang Y, Hu FB, Spiegelman D, Willett WC and Rimm EB. **Changes in body weight and body fat distribution as risk factors for clinical diabetes in US men.** *Am J Epidemiol* 2004;159:1150-9.
- <sup>267</sup> Ahima RS and Flier JS. **Adipose tissue as an endocrine organ.** *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:327-32.
- <sup>268</sup> Ahima RS. **Central actions of adipocyte hormones.** *Trends Endocrinol Metab* 2005;16:307-13.
- <sup>269</sup> Boss O, Samec S, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P and Giacobino JP. **Tissue-dependent upregulation of rat uncoupling protein-2 expression in response to fasting or cold.** *FEBS Lett* 1997;412:111-4.
- <sup>270</sup> Millet L, Vidal H, Andreelli F, Larrouy D, Riou JP, Ricquier D, Laville M and Langin D. **Increased uncoupling protein-2 and -3 mRNA expression during fasting in obese and lean humans.** *J Clin Invest* 1997;100:2665-70.
- <sup>271</sup> Rippe C, Berger K, Boiers C, Ricquier D and Erlanson-Albertsson C. **Effect of high-fat diet, surrounding temperature, and enterostatin on uncoupling protein gene expression.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279:E293-300.
- <sup>272</sup> Ribot J, Portillo MP, Pico C, Macarulla MT and Palou A. **Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in hamsters fed an atherogenic diet.** *Br J Nutr* 2007;97:1074-82.
- <sup>273</sup> Fukuda H, Hirakawa T and Iritani N. **Nutritional and hormonal regulation of uncoupling protein gene expression in rat adipocytes.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2007;53:426-31.
- <sup>274</sup> Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA and Tartaglia LA. **Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis.** *Diabetes* 1997;46:900-6.
- <sup>275</sup> Memon RA, Hotamisligil GS, Wiesbrock SM, Uysal KT, Faggioni R, Moser AH, Feingold KR and Grunfeld C. **Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF-alpha.** *Biochim Biophys Acta* 2000;1484:41-50.

- <sup>276</sup> West DB, Blohm FY, Truett AA and DeLany JP. **Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression.** *J Nutr* 2000;130:2471-7.
- <sup>277</sup> Nazare JA, de la Perriere AB, Bonnet F, Desage M, Peyrat J, Maitrepierre C, Louche-Pelissier C, Bruzeau J, Goudable J, Lassel T, Vidal H and Laville M. **Daily intake of conjugated linoleic acid-enriched yoghurts: effects on energy metabolism and adipose tissue gene expression in healthy subjects.** *Br J Nutr* 2007;97:273-80.
- <sup>278</sup> Oberkofler H, Liu YM, Esterbauer H, Hell E, Krempler F and Patsch W. **Uncoupling protein-2 gene: reduced mRNA expression in intraperitoneal adipose tissue of obese humans.** *Diabetologia* 1998;41:940-6.
- <sup>279</sup> Pedersen SB, Borglum JD, Kristensen K, Norrelund H, Otto J, Jorgensen L and Richelsen B. **Regulation of uncoupling protein (UCP) 2 and 3 in adipose and muscle tissue by fasting and growth hormone treatment in obese humans.** *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:968-75.
- <sup>280</sup> Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F and Lopez-Miranda J. **The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone.** *Mol Nutr Food Res* 2007;51:1199-208.
- <sup>281</sup> Serra-Majem L, Roman B and Estruch R. **Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review.** *Nutr Rev* 2006;64:S27-47.
- <sup>282</sup> Hu FB. **The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond.** *N Engl J Med* 2003;348:2595-6.
- <sup>283</sup> Trichopoulou A and Critselis E. **Mediterranean diet and longevity.** *Eur J Cancer Prev* 2004;13:453-6.
- <sup>284</sup> Mead A, Atkinson G, Albin D, Alphey D, Baic S, Boyd O, Cadigan L, Clutton L, Craig L, Flanagan C, Greene P, Griffiths E, Lee NJ, Li M, McKechnie L, Ottaway J, Paterson K, Perrin L, Rigby P, Stone D, Vine R, Whitehead J, Wray L and Hooper L. **Dietetic guidelines on food and nutrition in the secondary prevention of cardiovascular disease - evidence from systematic reviews of randomized controlled trials (second update, January 2006).** *J Hum Nutr Diet* 2006;19:401-19.
- <sup>285</sup> Alonso A, Ruiz-Gutierrez V and Martinez-Gonzalez MA. **Monounsaturated fatty acids, olive oil and blood pressure: epidemiological, clinical and experimental evidence.** *Public Health Nutr* 2006;9:251-7.
- <sup>286</sup> Panagiotakos DB, Pitsavos CH, Chrysoshoou C, Skoumas J, Papadimitriou L, Stefanadis C and Toutouzas PK. **Status and management of hypertension in Greece: role of the adoption of a Mediterranean diet: the Attica study.** *J Hypertens* 2003;21:1483-9.
- <sup>287</sup> Kokkinos P, Panagiotakos DB and Polychronopoulos E. **Dietary influences on blood pressure: the effect of the Mediterranean diet on the prevalence of hypertension.** *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2005;7:165-70; quiz 71-2.
- <sup>288</sup> Cullinen K. **Olive oil in the treatment of hypercholesterolemia.** *Med Health R I* 2006;89:113.
- <sup>289</sup> Jula A, Marniemi J, Huupponen R, Virtanen A, Rastas M and Ronnema T. **Effects of diet and simvastatin on serum lipids, insulin, and antioxidants in hypercholesterolemic men: a randomized controlled trial.** *Jama* 2002;287:598-605.
- <sup>290</sup> Hung T, Sievenpiper JL, Marchie A, Kendall CW and Jenkins DJ. **Fat versus carbohydrate in insulin resistance, obesity, diabetes and cardiovascular disease.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:165-76.
- <sup>291</sup> Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Fuentes F, Delgado J and Perez-Jimenez F. **Dietary fat, genes and insulin sensitivity.** *J Mol Med* 2007;85:209-22.

- <sup>292</sup> Katsilambros N, Liatis S and Makrilakis K. **Critical review of the international guidelines: what is agreed upon--what is not?** *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 2006;11:207-18; discussion 18.
- <sup>293</sup> Samaha FF. **Effect of very high-fat diets on body weight, lipoproteins, and glycemic status in the obese.** *Curr Atheroscler Rep* 2005;7:412-20.
- <sup>294</sup> Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, Chrysohoou C, Zampelas A, Toussoulis D and Stefanadis C. **The association between adherence to the Mediterranean diet and fasting indices of glucose homeostasis: the ATTICA Study.** *J Am Coll Nutr* 2007;26:32-8.
- <sup>295</sup> Manco M, Calvani M and Mingrone G. **Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion.** *Diabetes Obes Metab* 2004;6:402-13.
- <sup>296</sup> Biesalski HK. **Diabetes preventive components in the Mediterranean diet.** *Eur J Nutr* 2004;43 Suppl 1:1/26-30.
- <sup>297</sup> Expert Panel on Detection E, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults. **Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III).** *Jama* 2001;285:2486-97.
- <sup>298</sup> Perona JS, Cabello-Moruno R and Ruiz-Gutierrez V. **The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function.** *J Nutr Biochem* 2006;17:429-45.
- <sup>299</sup> Paoletti R, Poli A and Cignarella A. **The emerging link between nutrition, inflammation and atherosclerosis.** *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4:385-93.
- <sup>300</sup> Browning LM and Jebb SA. **Nutritional influences on inflammation and type 2 diabetes risk.** *Diabetes Technol Ther* 2006;8:45-54.
- <sup>301</sup> Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, Portugal H, Planells R, Grolier P, Amiot-Carlin MJ, Vague P and Lairon D. **The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet.** *Am J Clin Nutr* 2005;82:964-71.
- <sup>302</sup> Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M and Stein TP. **Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes.** *Ann Intern Med* 2005;142:403-11.
- <sup>303</sup> Rocca AS, LaGreca J, Kalitsky J and Brubaker PL. **Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1.** *Endocrinology* 2001;142:1148-55.
- <sup>304</sup> Kris-Etherton PM, Pearson TA, Wan Y, Hargrove RL, Moriarty K, Fishell V and Etherton TD. **High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations.** *Am J Clin Nutr* 1999;70:1009-15.
- <sup>305</sup> Abbasi F, McLaughlin T, Lamendola C, Kim HS, Tanaka A, Wang T, Nakajima K and Reaven GM. **High carbohydrate diets, triglyceride-rich lipoproteins, and coronary heart disease risk.** *Am J Cardiol* 2000;85:45-8.
- <sup>306</sup> Lopez-Miranda J, Badimon L, Bonanome A, Lairon D, Kris-Etherton PM, Mata P and Pérez-Jiménez F. **Monounsaturated fat and cardiovascular risk.** *Nutrition Reviews* 2006;64:S2-S12.
- <sup>307</sup> Paglialunga S and Cianflone K. **Regulation of postprandial lipemia: an update on current trends.** *Appl Physiol Nutr Metab* 2007;32:61-75.
- <sup>308</sup> Jackson KG, Wolstencroft EJ, Bateman PA, Yaqoob P and Williams CM. **Greater enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with apolipoproteins E and C-III after meals rich in saturated fatty acids than after meals rich in unsaturated fatty acids.** *Am J Clin Nutr* 2005;81:25-34.