

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,  
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Modificaciones del proteoma plasmático  
inducidas por el contenido graso y  
antioxidante de la dieta**

**Mónica Santos González**

**Córdoba 2010**

TITULO: *Modificaciones del proteoma plasmático inducidas por el contenido  
graso y antioxidante de la dieta*

AUTOR: *Mónica Santos González*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2010  
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: 978-84-693-4174-2



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR,  
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA**



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**Modificaciones del proteoma plasmático  
inducidas por el contenido graso y  
antioxidante de la dieta**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Mónica Santos González**,  
Licenciada en Biología, para optar al grado de **Doctor en Ciencias**.

Los Directores

**J. MANUEL VILLABA MONTORO**  
Catedrático de Biología Celular  
Universidad de Córdoba

**JOSÉ LÓPEZ MIRANDA**  
Catedrático de Medicina  
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 21 de Mayo de 2010





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**D. JOSÉ MANUEL VILLALBA MONTORO**, DOCTOR EN CIENCIAS Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA

Que D<sup>o</sup> **MÓNICA SANTOS GONZÁLEZ**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Modificaciones del proteoma plasmático inducidas por el contenido graso y antioxidante de la dieta”** que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 21 de Mayo de 2010

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.

D. JOSÉ MANUEL VILLABA MONTORO





UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

IMIBIC INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE CÓRDOBA

Hospital Universitario Reina Sofía



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

D<sup>o</sup> **JOSÉ LÓPEZ MIRANDA**, DOCTOR EN MEDICINA Y CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL ÁREA DE MEDICINA, DERMATOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA,

INFORMA

Que D<sup>o</sup> **MÓNICA SANTOS GONZÁLEZ**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“Modificaciones del proteoma plasmático inducidas por el contenido graso y antioxidante de la dieta”** que a su juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctora en Ciencias

Y para que conste, firmo la presente en Córdoba, a 21 de Mayo de 2010

D. JOSÉ LÓPEZ MIRANDA







**TÍTULO DE LA TESIS:**

**MODIFICACIONES DEL PROTEOMA PLASMÁTICO INDUCIDAS CON EL CONTENIDO GRASO Y ANTIOXIDANTE DE LA DIETA**

**DOCTORANDA:**

**MÓNICA SANTOS GONZÁLEZ**

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

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en el periodo comprendido entre abril de 2006 y marzo de 2010, la doctoranda Mónica Santos González ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma, sobre la utilización de la proteómica como una herramienta no sesgada para estudiar el efecto de dietas con distinto contenido graso (ricas en ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados) o enriquecidas con coenzima Q, tanto en modelos animales (ratas de laboratorio), como en humanos. El estudio desarrollado en ratas ha permitido poner de manifiesto el papel del coenzima Q de la dieta en la regulación de la inflamación, y otros cambios asociados al envejecimiento. Por su parte, el estudio llevado a cabo en humanos nos ha permitido evidenciar por primera vez cambios en el proteoma plasmático inducidos por el consumo de una dieta mediterránea, o una dieta mediterránea suplementada con coenzima Q. Nuestros resultados nos permitirán entender mejor la base molecular de los efectos beneficiosos demostrados para estas dietas. Además, gracias a su trabajo ha desarrollado y validado técnicas experimentales de una gran utilidad para el grupo de investigación, entre las que destacamos la proteómica. Con relación al trabajo desarrollado en su Tesis, se han realizado ya 3 publicaciones en *Experimental Gerontology* (índice de impacto: 3.28), *BMC Genomics* (índice de impacto: 3.93), y *Expert Opinion on Investigational Drugs* (índice de impacto: 4.06). Una cuarta publicación está en fase de aceptación en *The Journal of Nutrition* (índice de impacto: 3.77). Otros artículos se encuentran en fase de preparación. Su formación se ha completado con la realización de colaboraciones de investigación, que han dado lugar a una publicación en *Chemico Biological Interactions* (índice de impacto: 3.08), así como colaboraciones docentes. Por último, la doctoranda ha realizado aportaciones en congresos de ámbito nacional e internacional, y ha participado en la redacción de un capítulo de libro.

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

Córdoba, 21 de MAYO de 2010

Firma del/de los director/es

Fdo.: JOSÉ MANUEL VILLABA MONTORO

Fdo.: JOSÉ LÓPEZ MIRANDA



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, bajo la dirección de los Dres. José Manuel Villalba Montoro y José López Miranda. Dicho proyecto fue subvencionado mediante una beca con cargo a Proyecto de Excelencia (AGR922 2006-2009) concedida por la Junta de Andalucía.



# RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso endógeno que está caracterizado por una pérdida progresiva de funciones con una disminución de la fertilidad, un incremento de la mortalidad y un aumento a la susceptibilidad de padecer enfermedades relacionadas con la edad [1]. Se han postulado muchas teorías para explicar las causas del envejecimiento, siendo la teoría de los radicales libres una de las más aceptadas a día de hoy (Hipótesis Oxidativa del Envejecimiento). Los ácidos grasos y otros componentes de la dieta como los antioxidantes, ejercen un papel muy importante en este sentido, ya que son varios los estudios realizados en humanos que han demostrado la relación existente entre un estado pro-oxidante y el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad. Por lo tanto, su prevención mediante la instauración de hábitos de vida y nutrición adecuados (‘‘alimentos funcionales’’) constituye la principal estrategia que en la actualidad disponemos para conseguir lo que denominamos un envejecimiento saludable. Para el desarrollo de nuestro estudio, y por ser una herramienta con un gran potencial de análisis, hemos utilizado técnicas -ómicas de nueva generación para el análisis comparativo de proteínas plasmáticas que nos puedan aportar nuevas pistas para entender mejor los mecanismos por los que los alimentos ejercen su acción.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este trabajo es la identificación de biomarcadores plasmáticos que nos ayuden a entender el mecanismo de acción del componente graso y antioxidante de la dieta sobre procesos relacionados con el envejecimiento.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Optimizar una metodología proteómica para estudiar cambios sobre los niveles de proteínas plasmáticas tras la ingesta de diferentes dietas experimentales.
- 2) Determinar el efecto que tiene el consumo prolongado de dietas con diferente

contenido graso sobre las proteínas plasmáticas de una población de animales de laboratorio (ratas) a lo largo del envejecimiento, y de una población de personas mayores de 65 años.

- 3) Estudiar el efecto que tiene la ingesta de una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados suplementada con CoQ<sub>10</sub> sobre las proteínas plasmáticas en una población de ratas a lo largo del envejecimiento.
- 4) Estudiar el efecto que tiene la ingesta de una dieta Mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> sobre proteínas plasmáticas en una población de personas mayores de 65 años.
- 5) Determinar los niveles plasmáticos de CoQ alcanzados tras el consumo de diferentes dietas suplementadas con CoQ<sub>10</sub>, tanto en animales de laboratorio (ratas) como en una muestra de personas mayores de 65 años.
- 6) Determinar si los cambios observados sobre algunas de las proteínas plasmáticas son reproducibles *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este trabajo, se han utilizado tanto animales (ratas de laboratorio) como humanos. En el caso de las ratas, 240 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) fueron alimentadas *ad libitum* desde el destete con diferentes dietas experimentales, que se diferenciaban en el contenido graso (grasa monoinsaturada ó poliinsaturada de la serie omega 6) ó en la suplementación o no de la dieta con CoQ<sub>10</sub>. Para la obtención de las muestras, las ratas fueron sacrificadas a los 6 y 24 meses desde el comienzo del experimento, momento en el que se recolectaron muestras de sangre para posteriormente aislar de ellas la fase plasmática. Para los estudios realizados en humanos, se seleccionaron personas (hombres y mujeres) de edad superior a 65 años y homocigóticas para el alelo E3 de la apolipoproteína E. Todos los individuos se sometieron, de forma randomizada y cruzada siguiendo un diseño de cuadrados latinos, a cuatro periodos de intervención dietética de 16 semanas de duración en total, los cuales se diferenciaban en la ingesta de dietas con diferente contenido graso (grasa monoinsaturada, poliinsaturada de la serie omega 3 o saturada) suplementadas o no con CoQ<sub>10</sub>. Finalizados los períodos establecidos, se les extrajo sangre venosa de la cual se aisló la fase plasmática. La concentraciones plasmáticas de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub>, tanto de

ratas como de humanos, se determinaron mediante HPLC (*High performance liquid chromatography*) de fase reversa con monitorización en un detector electroquímico y ultravioleta; y la integración de las áreas de pico y las correspondientes comparaciones con estándar externos. Para la detección de biomarcadores plasmáticos asociados a la ingesta de diferentes dietas, se realizaron estudios de análisis proteómico de las muestras de plasma, utilizando previamente métodos de depleción ó normalización del rango dinámico de proteínas. El análisis de los geles bidimensionales se llevó a cabo utilizando un *software* específico (PD-Quest. Bio-Rad) para detectar posibles cambios de expresión sobre los spots presentes en los geles, que posteriormente fueron extraídos y analizados mediante espectrometría de masas para su identificación. Con el fin de validar algunos de los cambios observados en los análisis proteómicos, se realizaron *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos para las proteínas identificadas. Finalmente, se han desarrollado estudios *in vitro* empleando una línea celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) para estudiar si el tratamiento con Coenzima Q reproduce los cambios observados en los organismos estudiados.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En general, el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional de muestras de plasma, tanto de ratas como de humanos, nos ha permitido encontrar varias proteínas diferencialmente expresadas tras la administración de dietas con diferente contenido graso y suplementos de CoQ<sub>10</sub>.

Hemos comprobado la importancia que tiene la elección de un buen método de procesamiento en este tipo de muestras, previo al desarrollo de la técnica de análisis bidimensional, ya que la enorme complejidad que presenta el plasma sanguíneo limita mucho el rango de estudio y dificulta la elección adecuada del método que nos permita determinar correctamente biomarcadores implicados en nuestro estudio. Por otro lado, los cambios observados en las ratas fueron mucho más acusados que los encontrados en humanos. Durante el desarrollo de esta tesis hemos comprobado la importancia que tiene el componente graso y el suplemento de la dieta con antioxidantes sobre procesos oxidativos, condicionando la susceptibilidad celular a sufrir estrés. En este caso se han visto alteradas proteínas relacionadas con estos procesos como la peroxirredoxina tipo



1, la ceruloplasmina o la transferrina, las cuales han sufrido modificaciones en mayor o menor medida en ambos organismos. Por otro lado, hemos comprobado el papel de la dieta en el desarrollo de la aterosclerosis, y en la modulación de procesos implicados en la integridad del endotelio, como los estados antiinflamatorios o antitrombóticos. En este sentido hemos encontrado modificaciones significativas de proteínas asociadas a estos procesos, entre las que destacamos la fetuína, la proteína C reactiva o los factores del complemento; así como el fibrinógeno, la antitrombina o la apolipoproteína H, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran una vez más el beneficio que aporta la ingesta de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados, al compararse con otro tipo de dietas ricas en ácidos grasos saturados, tanto a edades tempranas como a edades más avanzadas. Por otro lado, el suplemento de la dieta con Coenzima Q<sub>10</sub> ha potenciado aún más los efectos potencialmente beneficiosos, siendo un posible candidato para prevenir o paliar enfermedades asociadas a la edad, disminuyendo el estado prooxidante y modulando la síntesis de proteínas implicadas en procesos tromboticos, destacándose los cambios observados sobre los niveles de fibrinógeno, o manteniendo la integridad de tejidos, modificando los niveles de alfa 1 antitripsina. Finalmente, hemos comprobado cómo los modelos *in vitro* pueden reproducir algunos de los resultados obtenidos *in vivo*. En este sentido, hemos observado cómo la secreción de apolipoproteína J/clusterina disminuía tras suplementar células HepG2 con la misma concentración de CoQ<sub>10</sub> observada en los sujetos que consumieron la dieta suplementada con el antioxidante. Ello indica que las alteraciones encontradas sobre los niveles de algunas de las proteínas plasmáticas, en este caso de la clusterina, pueden ser resultado de un efecto directo del CoQ<sub>10</sub> sobre las células hepáticas y no de una respuesta indirecta a nivel sistémico.

En definitiva, la presente Tesis Doctoral muestra que el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional combinada con espectrometría de masas es una herramienta útil en el estudio de la expresión proteica en la sangre de diferentes organismos sometidos a estudios de intervención dietética. Los datos presentados abren la puerta a futuros estudios para elucidar la relevancia de estas variaciones en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, o bien para evaluar su posible utilidad como biomarcadores pronósticos y/o de evolución de enfermedades asociadas con la edad que estén ligadas al estado nutricional.

## ABREVIATURAS

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial
2-DE	Electroforesis bidimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Ácidos grasos esenciales
AGL	Ácidos grasos libres
ALA	Ácido alfa-linolénico
AMBP	Proteína precursora de la $\alpha$ -1-Microglobulina y Bikunina
ANOVA	Análisis de varianza
ApoA-I	Apolipoproteína A-I
ApoA-IV	Apolipoproteína A-IV
ApoE	Apolipoproteína E
ApoJ	Apolipoproteína J
APS	Persulfato amónico
B-2-GP1	Beta 2 Glicoproteína 1
BDNF	Factor neurotrópico derivado del cerebro
C.S.	Cobertura de secuencia
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil) dimetilamonio]-1 propanosulfonato]
CID	Disociación inducida por colisión
CVD	Enfermedad cardiovascular
CoA	Coenzima A
CoQ	Coenzima Q
Da	Dalton
DHA	Ácido docosahecanoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
DTT	Ditiotreitol
EC	Ésteres de colesterol
ECL	Quimioluminiscencia acentuada
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESI	Electronebulización o electroespray
FGG	Gamma Fibrinógeno
h.	Horas
HC	Hidratos de carbono
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HDL-c	Colesterol vehiculizado por HDL
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAA	Iodoacetamida
ICAT	Etiqueta de afinidad codificada por isótopo
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
IT	Trampa iónica

ITIH4	Inhibidor Inter Alfa H4P
iTRAQ	Etiqueta isotópica para cuantificación relativa y absoluta
LC	Cromatografía líquida
LCAT	Lecitín Acil Colesterol Transferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDL-c	Colesterol vehiculizado por LDL
LTQ-FT-ICR	Trampa lineal-Resonancia iónica ciclotrón transformada de Fourier
m/z	Masa / Carga
mV.	Minivoltios
MALDI	Desorción / ionización mediante láser inducida por matriz
Min.	minutos
MM	Masa molecular
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MudPIT	Tecnología multidimensional de identificación de proteínas
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
n-3	Precursor de la serie omega 3
n-6	Precursor de la serie omega 6
n-9	Precursor de la serie omega 9
NF-Kb	Factor de transcripción nuclear-Kb
NO	Óxido nítrico
OD	Densidad óptica
p v	Peso / volumen
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
PL	Fosfolípido
PMSF	<i>Phentylmethanesulfonyl fluoride</i>
PON I	Paraoxonasa I
Prxs-2	Peroxirredoxina 2
PUFA-CL	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Q	Cuadrupolo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPM	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SELDI	Desorción / ionización mediante láser realizada por superficie
SFA	Ácidos grasos saturados
T <sup>a</sup>	Temperatura
TEMED	N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina
TG	Triglicérido
T-KG	T Kininógeno
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TOF	Tiempo de vuelo
Tris	2-amino-2-hydroximetil-1,3-propanodiol

V	Voltios
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular-1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
v/v	Volumen / volumen
VDBP	Proteína de unión a Vitamina D
Vh.	Voltios por hora



# Índice



<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>1</b>
<b>1. INTERÉS</b> -----	<b>1</b>
<b>2. EL ENVEJECIMIENTO</b> -----	<b>2</b>
<b>3. LA DIETA COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES</b> -----	<b>3</b>
3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS-----	3
3.2. EL COENZIMA CoQ <sub>10</sub> -----	4
<b>4. LOS ÁCIDOS GRASOS</b> -----	<b>6</b>
4.1. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN-----	6
4.2. BIOSÍNTESIS-----	7
4.2.1. ÁCIDOS GRASOS SATURADOS-----	7
4.2.2. ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS-----	7
4.2.3. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS-----	8
4.2.4. ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES-----	8
4.2.4.1. ÁCIDO LINOLEICO, PRECURSOR DE LA SERIE n-6-----	9
4.2.4.2. ÁCIDO $\alpha$ LINOLÉNICO, PRECURSOR DE LA SERIE n-3-----	9
4.3. IMPORTANCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA-----	10
4.4. ÁCIDOS GRASOS Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (CVD)-----	11
4.5. ÁCIDOS GRASOS Y CÁNCER-----	16
4.6. ÁCIDOS GRASOS Y ARTRÍTIS REUMATOIDE-----	17
4.7. ÁCIDOS GRASOS Y DEPRESIÓN-----	18
4.8. ÁCIDOS GRASOS Y ASMA-----	19
<b>5. LA PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE TRABAJO</b> -----	<b>19</b>
5.1. MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS-----	20
5.1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-----	20
5.1.2. ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL-----	21
5.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS-----	22
5.2.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS-----	22
5.2.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS-----	25
5.3. APLICACIONES DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO-----	26
5.3.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE 2D y MALDI-TOF-----	28
5.3.1.1. ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL-----	28
5.3.1.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA PRIMERA DIMENSIÓN--	28
5.3.1.1.2. PRIMERA DIMENSIÓN: ISOELECTROENFOQUE (IEF)-----	29
5.3.1.1.3. SEGUNDA DIMENSIÓN (SDS-PAGE)-----	29
5.3.1.1.4. VISUALIZACIÓN. TINCIÓN DE GELES BIDIMENSIONALES-----	30
5.3.1.1.5. ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN Y ANÁLISIS DE GELES 2-DE-----	31
5.3.1.2. MALDI-TOF-----	31
5.4. LA COMPLEJIDAD DEL PROTEOMA DEL PLASMA-----	32
<b>HIPÓTESIS</b> -----	<b>35</b>
<b>OBJETIVOS</b> -----	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> -----	<b>43</b>



1. GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN	45
1.1. ESTUDIOS SOBRE UNA POBLACIÓN DE RATAS WISTAR	45
1.2. ESTUDIOS SOBRE UNA POBLACIÓN DE SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS	45
1.2.1. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	45
1.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	46
1.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	46
1.2.4. ASPECTOS ÉTICOS	47
2. INTERVENCIONES DIETÉTICAS	47
2.1. POBLACIÓN DE RATAS WISTAR	47
2.2. SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS	48
3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA	50
3.1. POBLACIÓN DE RATAS WISTAR	50
3.2. POBLACIÓN DE SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS	51
4. AISLAMIENTO DE ADN Y DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE APO E	52
5. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA	53
6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ <sub>10</sub> TOTAL, OXIDADO Y REDUCIDO	54
6.1. EXTRACCIÓN DE LA FASE LIPÍDICA	54
6.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ <sub>10</sub>	54
6.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO	55
7. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLASMA	55
7.1. DEPLECIÓN DE INMUNOGLOBULINAS Y ALBÚMINA	56
7.2. DEPLECIÓN DE 20 PROTEÍNAS MAYORITARIAS	56
7.3. NORMALIZACIÓN DEL RANGO DINÁMICO DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS	58
8. DELIPIDACIÓN, DESALACIÓN DEL PLASMA Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	60
8.1. DELIPIDACIÓN Y DESALACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLASMA	60
8.2. LIMPIEZA Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	61
9. ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL	61
9.1. ISOELECTROENFOQUE (IEF)	62
9.2. EQUILIBRADO DE LAS IPGs	63
9.3. ELECTROFORÉISIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	63
10. TINCIÓN DE GELES	64
10.1. COOMASIE COLOIDAL BRILLIANT BLUE G250	64
10.2. COOMASIE COLOIDAL BIO-SAFE-COOMASIE (BIO-RAD)	65
10.3. SYPRO RUBY PROTEIN STAINS (BIO-RAD)	65
11. CAPTURA DE IMÁGENES Y ANÁLISIS	65
12. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	66

12.1. PICADO Y DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS -----	67
12.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE MALDI-TOF/TOF -----	67
<b>13. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS -----</b>	<b>68</b>
13.1. ELECTROFORÉISIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA -----	68
13.2. ELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT) -----	69
13.3. INMUNOTINCIÓN Y REVELADO CON ECL-PLUS -----	69
13.4. ANÁLISIS DE IMAGEN -----	70
<b>14. EXPERIMENTOS IN VITRO -----</b>	<b>71</b>
14.1. LINEA CELULAR Y CULTIVOS -----	71
14.2. TRATAMIENTOS CON COENZIMA CoQ <sub>10</sub> -----	71
<b>15. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA -----</b>	<b>72</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO I: ESTUDIO EN RATAS WISTAR -----</b>	<b>75</b>
<b>1. DISEÑO EXPERIMENTAL -----</b>	<b>75</b>
<b>2. DEPLECIÓN DE PROTEÍNAS MAYORITARIAS Y 2-DE -----</b>	<b>76</b>
<b>3. CAMBIOS EN EL PROTEOMA PLASMÁTICO: EFECTOS DEL CONTENIDO GRASO Y     ANTIOXIDANTE -----</b>	<b>77</b>
3.1. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE RATAS JÓVENES Y VIEJAS -----	78
3.1.1. RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 -----	78
3.1.2. RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 SUPLEMENTADA CON CoQ <sub>10</sub> -----	79
3.1.3. RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS OMEGA 9 -----	81
3.2. EFECTOS DEL COMPONENTE GRASO Y ANTIOXIDANTE EN GRUPOS DE EDAD ----	81
3.2.1. PROTEOMA PLASMÁTICO DE RATAS JÓVENES (6 MESES) -----	81
3.2.1.1. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA MUFA OMEGA 9 -----	82
3.2.1.2. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 SUPLEMENTADA CON CoQ <sub>10</sub> -----	83
3.2.2. PROTEOMA PLASMÁTICO DE RATAS VIEJAS (24 MESES) -----	83
3.2.2.1. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA MUFA OMEGA 9 -----	84
3.2.2.2. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 SUPLEMENTADA CON CoQ <sub>10</sub> -----	84
<b>4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ<sub>9</sub> Y CoQ<sub>10</sub> -----</b>	<b>86</b>
<b>5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS -----</b>	<b>89</b>
5.1. EFECTOS OCASIONADOS POR LAS DIETAS EN ANIMALES JÓVENES Y VIEJOS ----	92

5.2. EFECTOS DEL COMPONENTE GRASO Y ANTIOXIDANTE DE LA DIETA EN RATAS JÓVENES (6 MESES) -----	93
5.3. EFECTOS DEL COMPONENTE GRASO Y ANTIOXIDANTE DE LA DIETA EN RATAS VIEJAS (24 MESES)-----	94
6. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE WESTERN BLOT -----	103
7. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS -----	110
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	113
<b>CAPÍTULO II: ESTUDIO EN UNA POBLACIÓN DE SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS</b> -----	123
1. DISEÑO EXPERIMENTAL -----	123
2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ <sub>10</sub> MEDIANTE HPLC -----	125
3. ESTUDIO PROTEÓMICO. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO-----	129
4. CAMBIOS EN EL PROTEOMA TRAS LA DEPLECIÓN DE 20 PROTEÍNAS MAYORITARIAS-----	131
4.1. EFECTOS TRAS LA INGESTA DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO GRASO Y SUPLEMENTOS CON CoQ <sub>10</sub> -----	132
5. CAMBIOS EN EL PROTEOMA PLASMÁTICO TRAS LA NORMALIZACIÓN DEL RANGO DINÁMICO-----	134
5.1. EFECTOS TRAS LA INGESTA DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO GRASO Y SUPLEMENTOS CON CoQ <sub>10</sub> -----	135
6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS-----	138
6.1. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA MEDITERRÁNEA FRENTE A UNA DIETA MEDITERRÁNEA SUPLEMENTADA CON CoQ <sub>10</sub> -----	142
6.2. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA MEDITERRÁNEA FRENTE A UNA DIETA SATURADA-----	143
6.3. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA MEDITERRÁNEA FRENTE A UNA DIETA POLIINSATURADA-----	144
6.4. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA POLIINSATURADA FRENTE A UNA DIETA SATURADA-----	145
7. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE WESTERN BLOT -----	152
8. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS -----	168
9. SECRECIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA J AL MEDIO TRAS EL TRATAMIENTO CON CoQ <sub>10</sub> -----	172
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	176
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> -----	200
<b>CONCLUSIONES</b> -----	203
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> -----	207

# **Introducción**



## 1. INTERÉS

En la actualidad el interés nutricional del envejecimiento se justifica por diversos hechos. El primero de ellos es el aumento espectacular del colectivo de edad avanzada, el cual va a alcanzar en las dos próximas décadas el 30% de la población mundial. El segundo hecho es que, habiéndose alcanzado prácticamente la edad máxima, se necesita una reducción de la morbilidad que, además de aumentar la esperanza de vida, proporcione calidad a lo largo de los años.

Por todo ello, los resultados de esta investigación podrían tener:

- 1.- Interés científico, por la contribución al estudio del efecto de los aceites con diferente contenido graso en el envejecimiento y profundización en el conocimiento de los mecanismos implicados en dicho fenómeno.
- 2.- Interés social, ya que el envejecimiento es uno de los grandes problemas sociales que se plantean en la actualidad y en un futuro inmediato.
- 3.- Interés económico, por la utilización de la fuente grasa monoinsaturada por excelencia, aceite de oliva virgen, con lo que contribuimos a ampliar los conocimientos que sobre la misma tenemos. Ello tiene más importancia en la actualidad puesto que en los mercados internacional y nacional está surgiendo la competencia con aceites de semillas muy ricos en ácidos monoinsaturados. Por lo tanto, este estudio contribuye a potenciar su valor económico.

Para el desarrollo de este estudio, y por ser una herramienta con un gran potencial de análisis, vamos a utilizar técnicas -ómicas de nueva generación para el análisis comparativo de proteínas plasmáticas que nos puedan aportar nuevas pistas para entender mejor los mecanismos por los que los alimentos ejercen su acción.

## 2. EL ENVEJECIMIENTO

El envejecimiento de la población es un fenómeno mundial que se ha ido produciendo paulatina y progresivamente a lo largo de las últimas décadas especialmente en los países más desarrollados, generando interrogantes sobre la sostenibilidad de los servicios socio-sanitarios que una población envejecida requiere.

Varios estudios de la Organización de Naciones Unidas han estimado que en el año 1995 este grupo de población (personas mayores de 60 años) representaba más de un 10% del total de población mundial y que esta proporción aumentará hasta un 20% en el año 2050. Este envejecimiento es más acentuado en los países desarrollados, de forma que en la actualidad Europa y Japón cuentan ya con un 30% de su población mayor de 60 años, estimándose que dicho porcentaje irá en aumento en los próximos años. Dentro de la Comunidad Europea, el crecimiento en España será mucho más pronunciado que en el resto de países europeos, alcanzando hasta un 36%.

El envejecimiento es un proceso endógeno que está caracterizado por una pérdida progresiva de funciones con una disminución de la fertilidad, un incremento de la mortalidad y un aumento a la susceptibilidad de padecer enfermedades relacionadas con la edad [1].

Se han postulado muchas teorías para explicar las causas del envejecimiento, siendo la teoría de los radicales libres una de las más aceptadas a día de hoy (HIPÓTESIS OXIDATIVA DEL ENVEJECIMIENTO). Esta teoría postula que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de daños en células y tejidos debido a la generación endógena y continua de especies reactivas del oxígeno (ROS) como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilo, principalmente generados como consecuencia de la actividad redox mitocondrial [2-8]

Los ácidos grasos y otros componentes de la dieta como los antioxidantes, ejercen un papel muy importante en este sentido, ya que son varios los estudios realizados en humanos que han demostrado la relación existente entre un estado pro-oxidante y el desarrollo de algunas enfermedades como las coronarias, neurodegenerativas, cáncer o el envejecimiento prematuro [9, 10]. Por ello, es de gran interés el estudio del comportamiento de los distintos aceites frente a la maquinaria

antioxidante del organismo, ya sea por el número de dobles enlaces que presentan o por la existencia de distintas sustancias con actividad antioxidante, con el fin de instaurar hábitos de vida y nutrición adecuados (‘‘alimentos funcionales’’) y prevenir enfermedades asociadas a la edad.

Uno de los hallazgos ya descritos en relación a esto es el efecto que ocasiona la restricción calórica y el suplemento de la dieta con antioxidantes, sobre el envejecimiento y las enfermedades asociadas a la edad [4, 11, 12].

### **3. LA DIETA COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES**

A lo largo de los años, se han ido atribuyendo efectos beneficiosos a algunos alimentos, ya sea por el contenido en ácidos grasos de un determinado tipo o por su contenido en antioxidantes como la vitamina E, coenzima Q<sub>10</sub> o compuestos fenólicos. Algunos estudios han demostrado la asociación entre el consumo de alimentos ricos en vitamina E y una reducción de la mortalidad cardiovascular [13, 14] o el uso de coenzima Q en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas durante el envejecimiento [15], como los evaluados sobre la enfermedad de Alzheimer [16, 17]. Por otro lado, el consumo de compuestos fenólicos, como los flavonoides, se ha asociado a una reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares en diversos estudios [18, 19]. Estos compuestos presentan un carácter antioxidante y cardioprotector, lo cual ha sido confirmado y aceptado por la comunidad científica en el estudio Zutphen [20] realizado con una cohorte de 800 individuos, en el que se describió una correlación inversa entre la cantidad de flavonoides procedentes de la dieta y la incidencia de cardiopatía isquémica.

#### **3.1. COMPUESTOS FENÓLICOS**

Entre los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva, tienen especial interés aquellos que poseen grupos orto-difenólicos, principalmente el hidroxitirosol y la oleuropeína, por ser grandes inhibidores de la oxidación de las LDL *in vivo* [21-23].



La actividad antioxidante del hidroxitirosol, se debe tanto a un efecto quelante de iones de metales como a un efecto secuestrador de radicales libres [19]. Con relación a la oleuropeína, varios estudios han demostrado que este compuesto incrementa la producción de óxido nítrico e induce su expresión en macrófagos murinos activados con lipopolisacárido [24].

Se observó, que entre los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva, los lignanos han mostrado ser potentes antioxidantes *in vitro* [25, 26]. Paralelamente, se ha asociado la ingestión de alimentos ricos en precursores de lignanos con una protección frente a neoplasias de colon, próstata y mama [27, 28]. Paralelamente, Owen y cols. postularon que los lignanos presentes en la dieta, podrían intervenir en la prevención de cáncer reduciendo el estrés oxidativo [29, 30] o inhibiendo la actividad de la xantina oxidasa [25].

Por otro lado, se ha demostrado una mejora del perfil lipídico plasmático en ratas tras una dieta rica en compuestos fenólicos. Aunque no se conoce el mecanismo exacto, se han propuesto como posibles explicaciones un incremento del transporte reverso del colesterol, una reducción de la absorción de colesterol, y/o un aumento de la excreción de ácidos biliares [31, 32].

### **3.2. EL COENZIMA CoQ<sub>10</sub>**

El coenzima Q (CoQ, ubiquinona) (2,3-dimetoxi-5-metil-6-poliprenil-1,4-benzoquinona) es una quinona liposoluble aislada y caracterizada por Festenstein *et al.* en 1955 [33]. En 1957 Crane *et al.* [34] establecieron que este compuesto actúa como un transportador de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial, por lo que tiene funciones de gran importancia para el metabolismo celular. Además, está presente en todas las células, membranas y lipoproteínas plasmáticas. Fue en 1958 cuando Wolf *et al.* [35] determinaron su estructura, constituida por un anillo benzoquinónico activo en el transporte redox, el cual está unido a una cadena lateral larga de isoprenos, responsable de su elevada hidrofobicidad. Esta disposición hace posible su disposición en el interior de las membranas biológicas. En los inicios, el concepto de síntesis y distribución del CoQ<sub>10</sub> fue atribuido solamente a la membrana mitocondrial interna, lo

cual era razonable ya que la única función conocida hasta el momento era el bombeo de electrones desde el complejo I y II al complejo III en el sistema mitocondrial de transferencia de electrones. En los años 60 se comprobó la necesidad del lípido para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria, ya que la ausencia o presencia de éste, causaba la inactivación o reactivación respectivamente de las actividades NADH y succinato deshidrogenasa [36]. Fue en el año 1975 cuando Mitchell [37] propuso el ciclo Q protón motriz, que suponía la transferencia de electrones de una manera cíclica a través del complejo III, con la participación de ubisemiquinona, el cual se acepta hoy día de manera generalizada.

Actualmente, además de su papel en la cadena respiratoria mitocondrial, se han reconocido muchas otras funciones metabólicas para este lípido [38], como son: su actuación como antioxidante liposoluble sintetizado de forma endógena, la regulación de la transición de permeabilidad mitocondrial, su participación en el transporte electrónico extra-mitocondrial, su requerimiento para la activación de proteínas desacoplantes de la mitocondria, la regulación de las propiedades fisicoquímicas de las membranas, la modulación de la producción de integrinas  $\beta 2$  en células mononucleares sanguíneas, así como la regulación de la función endotelial, seguramente incrementando la producción de óxido nítrico [39].

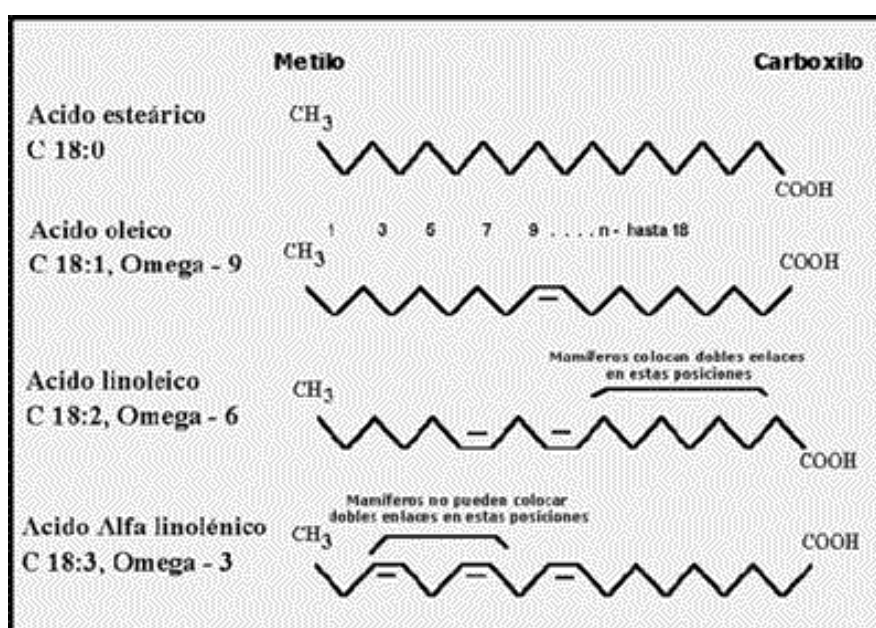
Se ha comprobado que la forma con mayor poder antioxidante es la forma hidroquinona (ubiquinol) [39] y se ha demostrado que el suplemento con CoQ<sub>10</sub> a lo largo de la vida produce un incremento significativo de la longevidad media y máxima en ratas alimentadas con una dieta enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados *n*-6 (PUFA <sub>*n*-6</sub>) [40]. Además, al comparar los efectos que tenían lugar en las ratas alimentadas con la dieta rica en PUFA <sub>*n*-6</sub> y suplementada con CoQ<sub>10</sub>, con aquellas que sólo fueron alimentadas con una dieta rica en PUFA <sub>*n*-6</sub>, se observó que en el primer grupo los niveles de CoQ<sub>10</sub> en las mitocondrias y en la membrana plasmática de hígado eran significativamente superiores [41]. Además, se encontraron menos roturas de la doble cadena del ADN en linfocitos sanguíneos, un menor estrés oxidativo, un mejoramiento de la función mitocondrial en el corazón, así como una mejora de la capacidad antioxidante dependiente de glutatión en el hígado [40-42].

## 4. LOS ÁCIDOS GRASOS

### 4.1. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN

Los ácidos grasos son moléculas orgánicas de naturaleza lipídica constituidas por una cadena larga hidrocarbonada, de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. En el organismo humano se encuentran formando parte de la estructura básica de triglicéridos (TG), fosfolípidos (PL) y ésteres de colesterol (EC), hallándose en menor grado en forma de ácidos grasos libres (AGL).

Están clasificados en función de la longitud y el grado de insaturación de la cadena de carbonos. Si tenemos en cuenta la longitud de la cadena, estos se diferencian en ácidos grasos de cadena corta (4-6 carbonos), de cadena media (8-12 carbonos), de cadena larga (14-20 carbonos), y de cadena muy larga ( $\geq 22$  carbonos). En función del grado de insaturación, encontramos ácidos grasos saturados (no poseen dobles enlaces en su estructura; SFA), monoinsaturados (con un doble enlace; MUFA) y poliinsaturados (con dos o más dobles enlaces; PUFA), donde la disposición espacial de los dobles enlaces puede adoptar una conformación de tipo *cis* o *trans* (siendo la primera la más común) (Figura I\_1).



**Figura I\_1.** Estructura química de algunos ácidos grasos comunes. Por orden descendiente: Ácido esteárico, 18:0, Ácido oléico 18:1 (n-9), Ácido linoléico 18:2 (n-6) y ácido  $\alpha$ -linoléico 18:3 (n-3).

El organismo no puede sintetizar de forma endógena todos los ácidos grasos, por lo que algunos de ellos debemos incorporarlos a través de la dieta. Así, distinguimos entre ácidos grasos esenciales (AGE) y ácidos grasos no esenciales. Algunos ácidos grasos esenciales son el ácido araquidónico (20:4 n-6), el ácido linoleico (18:2 n-6) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3), precursores de las series metabólicas n-6 y n-3 respectivamente [43] [44].

## **4.2. BIOSÍNTESIS**

### **4.2.1. ÁCIDOS GRASOS SATURADOS**

Los ácidos grasos saturados (SFA) pueden sintetizarse de forma endógena en el organismo humano a partir del acetil CoA, el cual se obtiene principalmente de la degradación de la glucosa y de algunos aminoácidos. Su síntesis se lleva a cabo en el citoplasma celular y es especialmente importante en hígado y tejido adiposo. Entre los ácidos grasos de síntesis endógena, el ácido palmítico (16:0) es el primer ácido graso resultante en el ciclo de síntesis. Las enzimas implicadas son activadas por concentraciones altas de hidratos de carbono y por concentraciones bajas de lípidos, e inhibidas por un elevado aporte de grasas con la dieta o por niveles elevados de PUFA [45]. Por otro lado, este ácido graso es el más abundante en la dieta humana, formando parte de carnes, grasas lácteas (mantequilla, queso y nata) y aceites vegetales como el aceite de coco y palma. Otros ácidos grasos saturados son el ácido láurico (12:0), esteárico (18:0) y mirístico (14:0), presentes normalmente en grasas de origen animal y vegetal.

### **4.2.2. ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS**

Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), así como el resto de ácidos grasos saturados de cadena larga, se originan por síntesis endógena a partir del ácido palmítico a través de procesos de elongación y desaturación. Estas reacciones se desarrollan sobre todo en el retículo endoplasmático de las células hepáticas [46]. Entre los MUFA, el de mayor importancia nutricional es el ácido oleico (18:1 n-9), el cual se origina por

síntesis endógena a partir del ácido esteárico [46] a través de una  $\Delta^9$ -desaturasa que introduce el doble enlace. El ácido oleico se encuentra en proporción abundante en el aceite de oliva, el cual representa el alimento con mayor fuente de MUFA en la dieta Mediterránea [47]. Los beneficios que aportan los MUFA y en concreto los del ácido oleico presentes en la dieta Mediterránea, pueden verse enmascarados en otro tipo de dietas como es el caso de la dieta Americana, en la que los MUFA son aportados por fuentes alimentarias que a la vez son ricas en SFA y ácidos grasos *trans* [48].

#### **4.2.3. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS**

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son ácidos grasos que poseen más de un doble enlace entre sus carbonos. La actuación de las elongasas y desaturasas sobre los ácidos palmitoleico, oleico, linoleico y  $\alpha$ -linolénico, originan cuatro series de ácidos grasos denominadas n-7, n-9, n-6 y n-3 respectivamente. Estas dos últimas corresponden a las series generadas a partir de los ácidos grasos esenciales para el organismo humano. Cada elongasa y desaturasa puede actuar indistintamente sobre ácidos grasos de cualquiera de las series en las etapas correspondientes, conllevando fenómenos de competencia entre las series. Debido a esta naturaleza competitiva y a su diferente papel biológico es importante mantener un equilibrio entre los ácidos grasos de la serie n-3 y n-6 de la dieta [44].

#### **4.2.4. ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES**

Los ácidos grasos esenciales, ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico, son sintetizados en los organismos vegetales mediante reacciones químicas vinculadas indirectamente con la síntesis de clorofila, en las que intervienen las enzimas  $\Delta^{12}$ - y  $\Delta^{15}$ -desaturasa [49], no pudiendo ser sintetizadas en los animales al carecer estos de la enzima desaturasa que inserta el doble enlace en las posiciones n-6 y n-3 de la cadena de átomos de carbono del ácido graso [50].

#### **4.2.4.1. ÁCIDO LINOLEICO, PRECURSOR DE LA SERIE n-6**

El ácido graso esencial de mayor consumo es el ácido linoleico. Su predominio refleja el hecho de ser el ácido graso poliinsaturado más común incorporado en los fosfolípidos dinámicos necesarios para la estructura de las membranas y lipoproteínas de alta densidad (HDL) involucradas en el transporte lipídico. Su elongación y desaturación da lugar a la formación de ácido araquidónico (20:4 n-6; ARA), un ácido graso participante en el control de numerosas actividades celulares en el organismo humano [51-53]. Otro de sus derivados es el ácido docosapentaenoico, también llamado DPA (22:5 n-6). Al ácido linoleico y sus derivados se les conoce como ácidos grasos omega 6 ya que el primer doble enlace a contar desde el carbono que lleva el grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) está en posición 6. La fuente principal de ácidos grasos omega 6 son diversos aceites vegetales, tales como el aceite de girasol, en los huevos y en las aves de corral.

#### **4.2.4.2. ÁCIDO $\alpha$ -LINOLÉNICO, PRECURSOR DE LA SERIE n-3**

Ha quedado demostrada, a través de numerosas evidencias científicas, la importancia en el organismo humano del ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) y otros ácidos grasos de la serie n-3, principalmente el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3; EPA) y el ácido docosahexaenoico (20:6 n-3; DHA), ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA – CL) [54-59]. Se piensa que el ácido  $\alpha$ -linolénico es esencial por ser el sustrato para la síntesis de los PUFA–CL n-3, EPA y DHA [60], ya que actualmente es difícil adjudicar efectos funcionales específicos directamente al ácido  $\alpha$ -linolénico [61]. Sin embargo, la conversión de este ácido a sus derivados de cadena larga no se considera del todo eficiente en humanos.

Paralelamente, procesos de envejecimiento, enfermedad y estrés, así como un consumo excesivo de ácidos grasos de la serie n-6, pueden modificar también la conversión del ácido  $\alpha$ -linolénico a sus ácidos grasos derivados [62].

Los ácidos grasos omega 3 se encuentran en alta proporción en los tejidos de ciertos pescados (por regla general pescado azul) y en algunas fuentes vegetales como las semillas de lino, la semilla de chía, los cañamones y las nueces [63].

### 4.3. IMPORTANCIA DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA DIETA

Un número creciente de indicios apuntan al papel crucial que desempeña el aceite de oliva como integrante básico de la dieta Mediterránea, en sus efectos beneficiosos para la salud. El consumo de aceite de oliva, se ha relacionado con un perfil lipídico de menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [64-66] y con un menor riesgo de desarrollar varios tipos de neoplasias malignas [67-69]. Además, varios autores confieren a la dieta rica en aceite de oliva un poder atenuante de los efectos agudos procoagulantes de comidas grasas (disminución de la activación del factor VII y reducción de la inducción de las plaquetas *ex vivo*). Estos efectos pueden deberse tanto a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados como a la presencia de compuestos antioxidantes en el aceite.

El ácido graso monoinsaturado de mayor presencia en la dieta Mediterránea es el ácido oleico, siendo la fuente de grasa mayoritaria en el aceite de oliva. Se ha analizado el impacto para la salud de una dieta rica en este tipo de ácido graso en comparación con otras dietas, quedando bien establecidos los efectos beneficiosos de las dietas ricas en MUFA al reducir significativamente los niveles de LDL [70, 71], y en algunos estudios elevar el colesterol-HDL levemente [72, 73]. Mensink y Cols [74] atribuyen un modesto efecto hipocolesterolémico a la ingestión de MUFA cuando estos sustituyen una ingestión de carbohidratos manteniendo la misma relación equicalórica .

Uno de los factores clave en el desarrollo de la aterosclerosis es la oxidación de las LDL [75]. El tipo de ácido graso presentes en los aceites consumidos se incorpora a la partícula lipoproteica influyendo en la susceptibilidad de la LDL a la oxidación. Se ha demostrado que las partículas LDL ricas en ácido oleico son marcadamente más resistentes a modificaciones oxidativas [76].

Por otra parte las LDL enriquecidas con ácido oleico y con un menor contenido de ácidos grasos poliinsaturados a través de una dieta suplementada con ácido oleico, presentan una mayor resistencia a convertirse en lipoproteínas proinflamatorias o LDL mínimamente modificadas [77]. Estudios con cultivos de células mononucleares han demostrado que el ácido oleico inhibe la activación del endotelio (aunque en menor medida que los PUFA), lo cual se ha analizado a través de la expresión de VCAM-1, NF- $\kappa$ B y niveles de ácido ribonucleico mensajero de VCAM-1 [78]. Además de todo lo

expuesto hasta el momento, existen evidencias de un efecto hipotensivo tras seguir una dieta enriquecida con ácidos grasos monoinsaturados.

A pesar de todas las evidencias científicas obtenidas hasta el momento, se precisan más estudios para conocer si estos resultados son fruto de un nutriente en particular o sería más exacto hablar de un efecto global de la dieta Mediterránea.

Por otro lado, es esencial el aporte dietético de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, ya que estos son componentes estructurales básicos de los fosfolípidos de las membranas de los tejidos del organismo humano, siendo especialmente abundantes en retina y cerebro, en donde el DHA constituye más del 26% del total de ácidos grasos [43, 79]. Estos ácidos contribuyen a numerosas propiedades de las membranas como su fluidez, flexibilidad y permeabilidad, siendo esenciales para un correcto funcionamiento de los tejidos [80].

Hay que destacar que los PUFA - CL (en concreto el DHA) son necesarios desde la misma concepción del individuo [81] ya que aportan mayores beneficios para su desarrollo [82-85]. Hay que destacar también la acción protectora de este tipo de ácidos grasos contra las enfermedades cardiovasculares (ver apartado 4.4. de esta sección). Además, existen otras patologías que pueden verse favorablemente influidas por los PUFA <sub>n-6</sub>, como son las enfermedades relacionadas con la deficiencia de AGE en las primeras etapas de vida, que afectan al desarrollo visual y conductual del niño [86-89], desórdenes psiquiátricos [43, 90], trastornos autoinmunes como el lupus o la nefropatía [91, 92], función cerebral [93-95], la enfermedad de Crohn [96, 97], diversos cánceres [98-100], la osteoporosis [101], el asma y patologías alérgicas [102, 103] y la artritis reumatoide [104, 105].

#### **4.4. ÁCIDOS GRASOS Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR (CVD)**

La arteriosclerosis es un término genérico que designa varias enfermedades en las que se produce engrosamiento y pérdida de elasticidad en la pared arterial. Es el resultado de una respuesta inflamatoria que ocurre en las arterias musculares y elásticas de tamaño medio y que consta de diferentes etapas: formación de la estría grasa, formación de lesiones avanzadas y rotura de la placa y trombosis. Constituye la



enfermedad vascular más frecuente y más grave, siendo la primera causa de morbilidad en los países occidentales.

Existe una arterioesclerosis "fisiológica" que obedece a los cambios debidos al envejecimiento entre los que destacan la disminución de elastina en la pared arterial. Este proceso se puede ver agravado por la arteriosclerosis propiamente dicha [106, 107]. En este sentido, los lípidos procedentes de la dieta en general y los ácidos grasos en particular, pueden afectar de forma favorable o diversa al desarrollo y progresión del proceso aterosclerótico y riesgo de enfermedad cardiovascular.

Parte de los efectos de los ácidos grasos de la dieta en la CVD se explican a través de los factores de riesgo tradicionales "lípidos-lipoproteína", como colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicéridos [108] y por otros mecanismos como los que relacionan los ácidos grasos de la dieta con los procesos hemostáticos, peroxidación lipídica y estrés oxidativo de la pared vascular, y procesos inflamatorios y de la función endotelial [109, 110].

En relación al efecto que tienen los diferentes tipos de ácidos grasos de la dieta sobre el proceso de arteriosclerosis, no todos los ácidos grasos saturados afectan de la misma manera a las concentraciones de colesterol en el organismo [111]. Sólo tres de ellos (ácido láurico, mirístico y palmítico) influyen significativamente en el colesterol total y en las LDL [112] disminuyendo la actividad de sus receptores [113]. Por otra parte, los ácidos grasos de cadena corta y mediana (4:0 - 10:0), así como el ácido esteárico (18:0) no causan una variación significativa en los niveles de colesterol [114].

Por otro lado, diversos estudios realizados han mostrado una asociación positiva entre la ingesta de ácidos grasos saturados y los niveles de factor VII [115, 116].

La primera evidencia epidemiológica de una correlación negativa entre la ingesta de MUFA, mortalidad global y mortalidad debida a CVD, fue puesta de manifiesto por el estudio "Seven Countries Study" [117], que mostró que la mortalidad por CVD era particularmente baja en países mediterráneos, donde el aceite de oliva (rico en ácido oleico) era la principal fuente de lípidos.

Así mismo, muchos investigadores han demostrado el efecto hipocolesterolémico de los MUFA cuando los SFA de la dieta son sustituidos por PUFA [112]. Supuestamente, cuando los SFA disminuyen y los PUFA aumentan de forma

simultánea, la supresión de la actividad de los receptores de LDL es neutralizada y se mejora la eliminación celular de LDL [113]. Una de las ventajas otorgadas a los MUFA es la de no reducir los niveles de colesterol de las HDL, contrariamente a lo que se ha observado con dietas ricas en PUFA [72]. Además, los MUFA presentan un efecto protector contra la oxidación de las LDL [118]. Además, debido a su estructura química, los MUFA son mucho más estables y menos susceptibles de peroxidación lipídica que los PUFA.

Con respecto a los estudios realizados sobre los PUFA, a finales de los noventa se demostró que los PUFA de la serie n-6, mayormente el ácido linoleico, disminuyen de forma significativa las concentraciones de colesterol total y LDL cuando sustituyen a los SFA en la dieta [119].

La asociación inversa entre PUFA y CVD observada en *“Nurses Health Study”* sugirió que los PUFA <sub>n-6</sub> podrían tener otros efectos beneficiosos en la enfermedad cardiovascular además de la mejora en el perfil lipídico. En este mismo estudio una elevada ingesta de PUFA <sub>n-6</sub> se asoció con una significativa baja incidencia de diabetes de tipo 2 [120].

A pesar de que los PUFA <sub>n-6</sub> ejercen un papel protector contra el riesgo cardiovascular [121], un consumo alto de este tipo de grasa puede conducir también a una elevada susceptibilidad a la peroxidación lipídica [118], lo cual es especialmente negativo en relación a la oxidación de las LDL y la génesis tumoral [111]. Además, varios estudios han demostrado que los parámetros indicadores del proceso de oxidación son diferentes dependiendo de si el consumo de grasa es de la serie n-3 o n-6, de forma que, mientras los PUFA <sub>n-6</sub> promueven la oxidación de las LDL, en el caso de los PUFA <sub>n-3</sub> estos efectos se diferencian dependiendo del ácido graso [122], lo cual destaca el papel de los PUFA en el proceso de oxidación dependiendo de la posición de sus dobles enlaces.

De Caterina y colaboradores descubrieron que tanto los PUFA de la serie n-3 como los de la serie n-6 tienen propiedades antiinflamatorias que inhiben la activación aterogénica de las células vasculares endoteliales [123, 124] inhibiendo la producción de moléculas de adhesión e interleuquinas, mediadores clave que propagan el proceso arteriosclerótico [52].

El interés mostrado por parte de la comunidad científica por los ácidos grasos de la serie n-3 sigue creciendo debido a la constante aparición de potenciales efectos beneficiosos para la salud [125, 126]. Aunque en la actualidad todavía no se tiene claro si estos efectos son debidos al ALA, el EPA y el DHA, o solamente al EPA y/o DHA.

Entre los mecanismos de acción de los PUFA - CL<sub>n-3</sub> cabe destacar:

- *Efectos anti-inflamatorios*: ingestas elevadas reducen la producción de eicosanoides inflamatorios, citoquinas y especies reactivas de oxígeno, así como la expresión de moléculas de adhesión [127]. A su vez, se ha encontrado en individuos sanos que la ingesta de PUFA<sub>n-3</sub> está inversamente asociada con los niveles plasmáticos de inflamación [128].
- *Efectos inhibidores de la activación endotelial*: Se ha visto que los PUFA<sub>n-3</sub> disminuyen la receptividad endotelial a los estímulos proinflamatorios y proaterogénicos disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, reduciendo la interacción leucocitos - endotelio, así como aumentando la producción del óxido nítrico [123]. De entre los más potentes con este efecto está el DHA [124], que además mejora la dilatación y la elasticidad arterial [128].
- *Efectos antitrombóticos*: estudios realizados sobre una población de esquimales de Groenlandia [129], mostraron que una ingesta muy elevada de PUFA - CL<sub>n-3</sub> de origen marino, inhibían la reactividad plaquetaria, sugiriendo que el consumo de estos ácidos podría prevenir la trombosis coronaria, lo cual han apoyado estudios posteriores [130, 131].
- *Efecto antihipertensivo*: Diversos estudios han mostrado una asociación entre la reducción de la presión sanguínea y la ingesta de PUFA<sub>n-3</sub> derivados de pescado y aceite de pescado [132, 133].
- *Efectos antiarrítmicos*: Tres estudios clínicos [134-136] han mostrado que tan sólo unos pocos meses de un consumo moderado de PUFA<sub>n-3</sub> consiguen reducir el riesgo de episodios cardíacos como la muerte súbita cardíaca. Esto sugiere un efecto inmediato de estos ácidos grasos en procesos arrítmicos antes que un efecto lento a través de la evolución o retroceso de la aterosclerosis [137]. Paralelamente, un estudio realizado sobre fosfolípidos de membrana de

cardiomiocitos ha demostrado que la presencia de PUFA  $n-3$  disminuye la excitabilidad eléctrica y modula la actividad de los canales iónicos de sodio, potasio y calcio, asegurando así la estabilidad eléctrica en la célula previniendo arritmias [138].

- *Efecto de estabilización de la placa de ateroma:* Se sabe que la vulnerabilidad de la placa de ateroma a la ruptura, más que el grado de aterosclerosis [139], es un determinante clave en la aparición de episodios cardiovasculares agudos como trombosis [140]. Resultados como los obtenidos por Thies y colaboradores en los que se ha visto que la incorporación de PUFA  $n-3$  a través de suplementos de aceite de pescado podría actuar estabilizando las placas de ateroma, produciendo cambios estructurales en las mismas [141], merecen ser tenidos en cuenta para el desarrollo de futuros tratamientos para la enfermedad cardiovascular.
- *Efecto reductor de la concentración de triglicéridos séricos:* algunos PUFA - CL  $n-3$  como EPA y DHA, actúan principalmente reduciendo el contenido de triglicéridos de las partículas de las VLDL, inhibiendo su síntesis hepática, mientras el número de partículas permanece prácticamente constante [142]. Mientras que en personas normolipémicas, el colesterol de las LDL y HDL se ve poco afectado por los PUFA  $n-3$ , en pacientes con hiperlipidemia se han observado diferentes efectos dependiendo de la cantidad aportada de ácidos grasos de la serie  $n-3$  y de la etiología de la hiperlipidemia [143].
- *Reducción de la lipidemia postprandial:* con la actuación de los PUFA - CL  $n-3$  la lipidemia postprandial se ve reducida y los remanentes potencialmente aterogénicos son eliminados.

Así pues, el ácido linoleico, principal PUFA  $n-6$  de la dieta y los PUFA - CL  $n-3$ , han mostrado ser beneficiosos para la enfermedad cardiovascular [144] como resultado de los mecanismos comunes, como en la reducción de los procesos inflamatorios; así como de otros mecanismos no comunes, como la reducción de colesterol LDL sérico por parte de los PUFA  $n-3$ . Aun así, es necesario un mejor conocimiento de nuevos mecanismos de actuación del resto de ácidos grasos poliinsaturados.

#### 4.5. ÁCIDOS GRASOS Y CÁNCER

Estudios científicos han demostrado que la dieta Mediterránea, fuente principal de ácidos grasos monoinsaturados (entre los que destaca el ácido oleico), reduce la aparición de ciertos tumores [145, 146].

Por otro lado, son cada vez más los estudios con animales y estudios *in vitro* que indican que los ácidos grasos de la serie n-3, especialmente EPA y DHA, inhiben el proceso de carcinogénesis [147, 148]. Entre los mecanismos que se han propuesto destacan:

- *Alteraciones del metabolismo estrógeno*, conllevando la reducción del crecimiento celular estimulado mediante estrógenos. Es bien conocido que los estrógenos tienen efectos proliferativos en tejidos "estrógeno-sensibles" y que altas concentraciones de estos compuestos pueden aumentar el riesgo de cáncer de pecho y el de otros cánceres dependientes de hormonas [149]. Aunque un consumo elevado de PUFA<sub>n-3</sub> relativo al de PUFA<sub>n-6</sub> podría disminuir la producción endógena de estrógenos, en la actualidad no hay evidencias de estudios en humanos que hayan examinado de forma directa esta cuestión [150].
- *Supresión de la biosíntesis de eicosanoides derivados del ácido araquidónico*, la cual resulta en una alteración de la respuesta inmune a las células cancerígenas y modulación de la inflamación, proliferación celular, apoptosis, metástasis y angiogénesis.
- *Influencia en la actividad de factores de transcripción, expresión de genes y transducción de señales*, que conducen a cambios en el metabolismo, crecimiento celular y procesos de diferenciación. La familia de factores de transcripción nuclear  $\kappa$ B participa en la adhesión celular, activación del ciclo celular, apoptosis y carcinogénesis [151]. Se ha visto que los PUFA de la serie n-3 disminuyen significativamente la activación del NF-  $\kappa$ B en macrófagos [152].
- *Aumento o disminución de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS)*. Los radicales libres y las ROS producidas a nivel celular pueden atacar los PUFA para formar hidroperóxidos lipídicos, los cuales se

descomponen en reacciones en cadena para formar más radicales libres y aldehídos reactivos. Diversos estudios indican que un aumento del consumo de EPA y DHA a través de la dieta no incrementa la susceptibilidad oxidativa del c-LDL [153], a la vez que disminuye la producción de superóxidos en individuos sanos [154]. Por su parte, se cree que los procesos de inflamación incrementan la producción de radicales libres y ROS, contribuyendo al proceso de carcinogénesis. En este sentido, diversos estudios sugieren que los productos de oxidación derivados de los PUFA de la serie n-3 inhiben el crecimiento celular [155].

- *Mecanismos que comprenden sensibilidad a la insulina y fluidez de membrana.* Estos mecanismos han sido menos estudiados que los anteriormente expuestos. Se ha visto que el EPA mejora la sensibilidad a la insulina en ratas y en pacientes con diabetes de tipo 2 [156, 157].

#### **4.6. ÁCIDOS GRASOS Y ARTRÍTIS REUMATOIDE**

La artritis reumatoide es una enfermedad crónica inflamatoria autoinmune, que implica la inflamación de articulaciones, manifestada por procesos de hinchazón y desgaste de músculos, y que a su vez está asociada con un mayor riesgo de CVD y osteoporosis [158]. Se ha descrito que la dieta puede jugar un papel importante en el control de la artritis reumatoide, particularmente en el alivio de sus síntomas y en la reducción del riesgo de complicaciones [159, 160]. Así, en lo referente al papel de los ácidos grasos en la artritis reumatoide, cabe destacar el papel de los PUFA de la serie n-3 y el del ácido oleico [105, 161]. Diversos estudios, centrados en el efecto de la suplementación de aceite de pescado en la artritis reumatoide, han mostrado la evidencia de mejoras clínicas significativas en esta enfermedad y en el estado inflamatorio a través de los aceites de pescado [162].

#### 4.7. ÁCIDOS GRASOS Y DEPRESIÓN

Durante los últimos años la comunidad científica ha mostrado un interés creciente por la posible influencia de los factores nutricionales sobre el desarrollo y sintomatología de la depresión [163]. Los PUFA  $n-3$  están siendo considerados como agentes potenciales en el tratamiento de dicha patología [164] desde que en 1995 Hibbeln y Salem comenzaron a estudiar la relación entre ácidos grasos poliinsaturados y depresión [165]. Dado que aproximadamente el 20% del peso seco del cerebro se debe a PUFA, y que uno de cada tres ácidos grasos en el sistema nervioso central es poliinsaturado, diversos investigadores han postulado que para algunos individuos, una ingesta inadecuada de PUFA - CL  $n-3$  pueda conllevar consecuencias neuropsiquiátricas [166].

A pesar de que los mecanismos por los que los PUFA  $n-3$  actúan en el sistema nervioso central no se conocen completamente, existen dos áreas principales de estudio en este campo:

- *Importancia de los PUFA - CL  $n-3$  en las membranas neuronales:* este tipo de ácidos grasos son componentes indispensables en los fosfolípidos de membrana del sistema nervioso central, teniendo un papel crítico en la estructura dinámica y funciones de las membranas neuronales [167]. Los PUFA - CL  $n-3$  pueden alterar la fluidez de la membrana desplazando el colesterol de la misma [168]. Una fluidez óptima, influida por los AGE, es requerida para los procesos de unión y señalización neurotransmisora dentro y entre células.
- *Importancia de los PUFA - CL  $n-3$  a través de la modulación de citoquinas:* La depresión severa se ha asociado con elevados contenidos de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  [169]. Así mismo, el estrés psicológico puede causar una elevación de estas citoquinas. Se ha sugerido que el papel anti-inflamatorio de los PUFA - CL  $n-3$  podría influir en el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF) en la depresión [170]. Este polipéptido, que sostiene la supervivencia y el crecimiento de neuronas a lo largo del desarrollo y etapa adulta, ha sido relacionado negativamente con los síntomas severos de depresión [171]. Diversos antidepresivos y el ejercicio voluntario puede aumentar el BDNF, mientras

dietas ricas en SFA y el estrés psicológico, inhiben la producción del polipéptido [170].

#### **4.8. ÁCIDOS GRASOS Y ASMA**

El asma es una enfermedad crónica inflamatoria del tracto respiratorio, caracterizada por una hiper-receptividad aérea y producción de mucosidad que conducen a episodios de respiración con dificultad, tos y falta de aliento [172]. A pesar de que el tratamiento con medicamentos y la manipulación ambiental siguen siendo la piedra angular del control del asma, la intervención nutricional se ha manifestado también como una terapia potencial esperanzadora [173].

Algunos resultados como los obtenidos por Mickleborough y colaboradores [174], muestran una reducción de mediadores inflamatorios, un menor requerimiento de broncodilatadores y una mejora en la función pulmonar, en la broncoconstricción inducida por el ejercicio en pacientes asmáticos con una dieta suplementada con aceites de pescado, lo cual sugiere que este aceite puede representar una intervención no-farmacológica potencialmente beneficiosa para el tratamiento del asma. Paralelamente, estudios en los que una ingesta habitual de pescado graso durante el embarazo podría proteger al niño de padecer asma, refuerzan el papel saludable, que los PUFA - CL<sub>n-3</sub> pueden desempeñar en el organismo humano [175].

### **5. LA PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE TRABAJO**

La proteómica es la ciencia que estudia la expresión de proteínas a nivel global empleando para ello una serie de técnicas que permiten el análisis de todas las proteínas presentes en una muestra biológica [176, 177].

El estudio del proteoma es, probablemente, el sistema experimental más adecuado para analizar células y tejidos, puesto que examina directamente el producto final del genoma. Este tipo de estudio requiere la utilización de un método de separación de proteínas combinado con la identificación posterior de cada proteína



individual, generalmente mediante espectrometría de masas (MS) que, debido a su mayor sensibilidad y gran capacidad de procesamiento [178], ha reemplazado a la secuenciación de Edman en esta tarea. Uno de los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica en los últimos tiempos es la dificultad que supone la identificación de todas las proteínas presentes dentro de una muestra biológica compleja. Esta dificultad se ve agravada por el limitado rango dinámico de concentración que las técnicas actuales son capaces de resolver [179]. Otros problemas están asociados a la evaluación de la enorme cantidad de información que genera esta tecnología, que complica la selección e interpretación de los datos potencialmente útiles de entre todos los obtenidos.

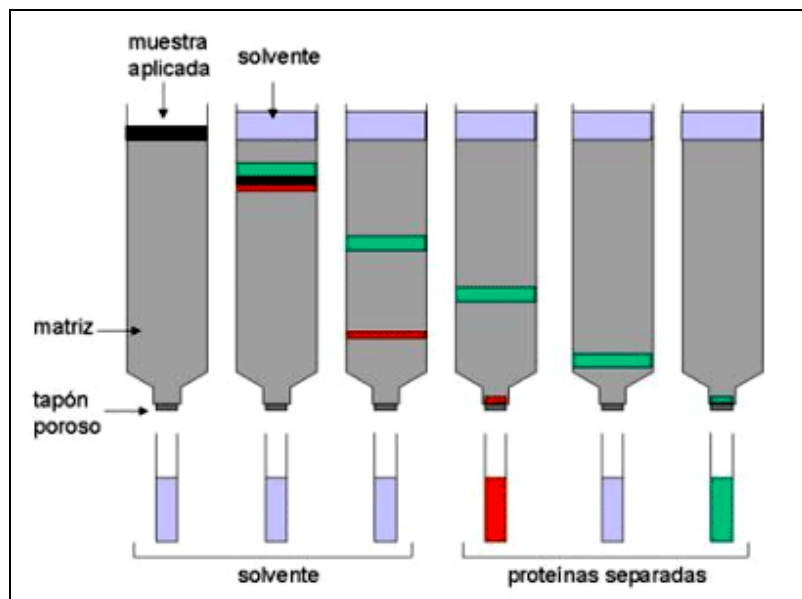
## **5.1. MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS**

Debido a la gran complejidad que suelen presentar las muestras biológicas, es necesario utilizar una o varias técnicas de separación de proteínas previas al análisis mediante espectrometría de masas [180]. Entre las técnicas de separación más utilizadas encontramos la electroforesis bidimensional (2-DE) y la cromatografía en todas sus variantes.

### **5.1.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

La cromatografía líquida (“liquid chromatography”, LC) es una técnica de fraccionamiento que puede aplicarse para separar proteínas o péptidos según diferencias en sus propiedades físicas y / o químicas, utilizando para ello diversos tipos de soporte cromatográfico (intercambio iónico, fase reversa, exclusión molecular, afinidad, etc.) (Figura I\_2). Puede utilizarse como un paso de purificación previo o posterior a la 2-DE [181-183] o como una alternativa a la misma, que permite además el acoplamiento directo de la columna con el espectrómetro de masas mediante la ionización con ESI [182], lo que posibilita la automatización de este proceso [184, 185]. Este hecho hace que las técnicas basadas en la separación cromatográfica conectada a espectrometría de masas en tándem, como la tecnología multidimensional de identificación de proteínas

(“*multidimensional protein identification technology*”, MudPIT), superen a las técnicas basadas en gel, en rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes muestras y condiciones [186-190]. Sin embargo, el mayor defecto de esta técnica es la carencia de información cuantitativa, aunque el desarrollo de técnicas de marcaje isotópico de proteínas [191], como ICAT (“*Isotope-coded affinity tag*”) e iTRAQ (“*Isotope tags for relative and absolute quantitation*”) [192-196], están compensando esta desventaja.



**Figura I\_2.** Representación de una cromatografía líquida.

### 5.1.2. ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL

La electroforesis bidimensional (“*2-dimensional electrophoresis*”, 2-DE) es una técnica de separación de mezclas complejas de proteínas de gran capacidad resolutive consistente en la aplicación sucesiva de dos tipos de electroforesis realizadas sobre la misma muestra [197, 198]. En primer lugar se realiza un isoelectroenfoco (“*isoelectric focusing*”, IEF) donde las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoeléctrico (pI). A continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), donde las proteínas se separan en función de su masa molecular. La dirección del movimiento de las proteínas

en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones. La técnica fue desarrollada inicialmente en los años 70 por Kenrick & Margolis [199], Klose [200] y O' Farrell [201], pero su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la invención de un método para generar gradientes de pH inmovilizados (“*immobilized pH gradients*”, IPG) [202]. Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y permitieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles hoy día en Internet [203]. En los últimos tiempos, el desarrollo de la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos. Se trata de una técnica basada en el marcaje fluorescente de las proteínas previo a su separación, lo que le otorga una gran precisión en la cuantificación, que además permite la separación de varias muestras proteicas en un mismo gel [204, 205], incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras.

## 5.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

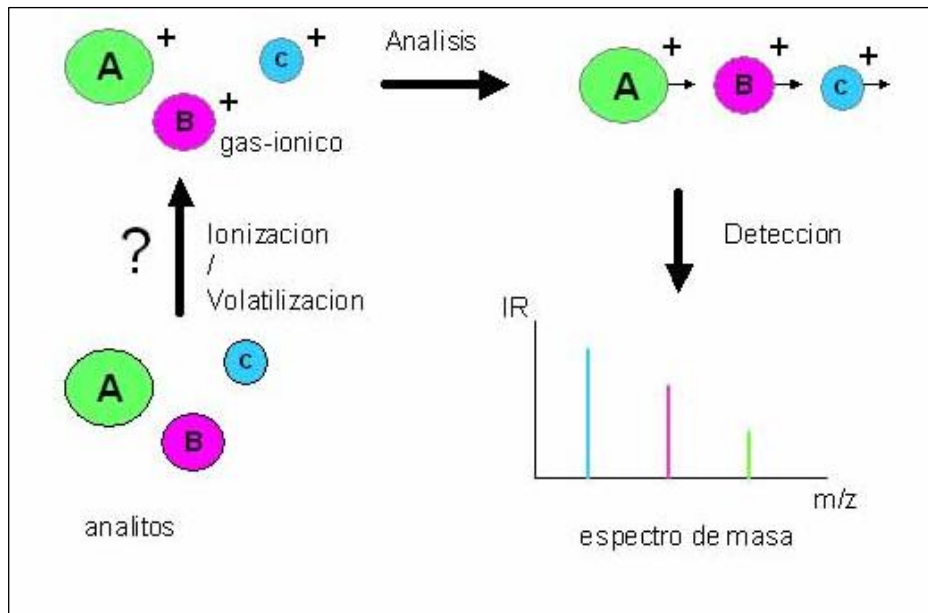
La espectrometría de masas (“mass spectrometry”, MS) es una tecnología analítica de gran potencia [178, 206], que requiere la conversión de los compuestos analizados a iones en fase gaseosa, los cuales se separan en función de su relación masa /carga ( $m/z$ ), lo que permite averiguar su masa molecular con gran precisión [178]. El desarrollo a finales de los años 80 de las técnicas de ionización suave [207, 208], que permiten generar iones a partir de analitos grandes y no volátiles, amplió la aplicabilidad de la espectrometría de masas a las biomoléculas (incluyendo las proteínas) e inició una rápida evolución de esta tecnología que continúa hoy en día [206, 209].

### 5.2.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

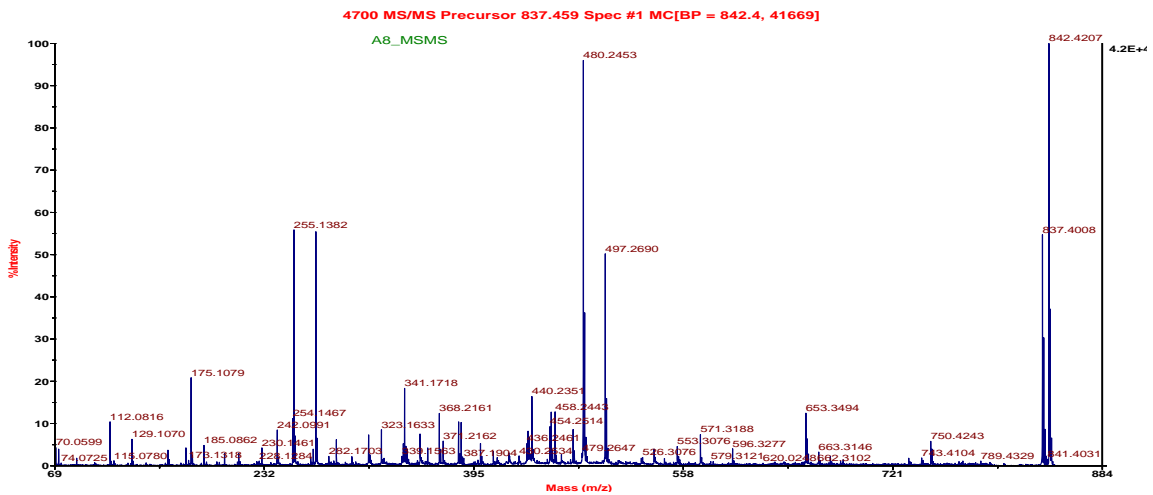
Los espectrómetros de masas están generalmente constituidos por tres elementos (figura I\_3): una fuente de iones que ioniza y vaporiza las muestras, un analizador de

masas, que separa los iones en función de su relación  $m/z$  y un detector de iones, que genera señales proporcionales a la abundancia relativa de cada ion. Los datos registrados por el detector son procesados mediante programas de ordenador específicos, que habitualmente generan gráficos de abundancia relativa de iones frente a  $m/z$  conocidos como espectros de masas (Figura I\_4).

Aunque existen múltiples métodos de ionización, sólo los métodos de ionización suave permiten el análisis de biomoléculas: la desorción / ionización mediante láser inducida por matriz ("*matrixassisted laser desorption / ionization*", MALDI) [208] y la electronebulización o electrospray ("*electrospray ionization*", ESI) [207]. También se utilizan diferentes analizadores de masas, existiendo tres tipos principales para analizar biomoléculas: separación de los iones por "tiempo de vuelo" ("*time-of-flight*", TOF), separación por campos electromagnéticos oscilatorios generados por "cuadrupolos" ("*quadrupole*", Q) y por último, separación por expulsión selectiva de los iones de un espacio tridimensional que actúa como trampa o "trampa iónica" ("*ion trap*", IT) [178, 210, 211]. Para identificar los diferentes espectrómetros de masas, se usa habitualmente una nomenclatura sencilla basada en los acrónimos de las partes que componen el espectrómetro (p. ej., MALDI-TOF, ESI-IT,...). Para el análisis de secuencia, se pueden utilizar 2 analizadores de masas en tándem en el tiempo como las trampas iónicas, o tándem en el espacio como el TOF-TOF [212]. En los últimos años, se han desarrollado varios espectrómetros de masas de diseños híbridos que complementan a los analizadores de masas en tándem convencionales, como el Qq-TOF [213], Q-TRAP [214] y la trampa lineal-Resonancia iónica ciclotrón transformada de Fourier (LTQ-FT-ICR) [215, 216]. Existen además otras aplicaciones de la espectrometría de masas basadas en la interacción de las proteínas con diferentes soportes cromatográficos, como la desorción / ionización mediante láser realizada por superficie-tiempo de vuelo ("*surface-enhanced laser desorption/ionization-time-of-flight*", SELDI-TOF) [217, 218], en el cual las proteínas son retenidas en una superficie cromatográfica sobre la que se deposita una matriz de cristalización, para permitir su detección en un analizador de masas de tipo TOF.



**Figura I\_3.** Esquema de los elementos que integran un espectrómetro de masas. Existen tres componentes esenciales: la fuente de ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q o una combinación de los anteriores) y el detector de iones. Las señales captadas por el detector son integradas por un sistema informático que genera los gráficos conocidos como espectros de masas).



**Figura I\_4:** Ejemplo de un espectro de masas del conjunto de péptidos obtenidos tras el análisis de espectrometría de masas. También se denomina "huella peptídica".

### 5.2.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La espectrometría de masas proporciona medidas muy precisas de la masa molecular y carga de proteínas o péptidos en una muestra. Las medidas de masas de las proteínas intactas pueden proporcionar información rápida y valiosa sobre el perfil proteico de una muestra, aunque a la hora de identificar una proteína no es práctico basarse únicamente en su relación  $m/z$ , ya que existen múltiples factores (procesamientos co- o postraduccionales) que pueden variar la masa molecular real de una proteína respecto a la masa teórica de la base de datos. Además, cuanto mayor es la masa de una proteína, menor es la exactitud de la medida. Por ello, se han desarrollado estrategias complementarias para la identificación de proteínas, como la “huella dactilar peptídica”. Esta técnica se basa en las medidas de las masas de los péptidos obtenidos tras la digestión enzimática de una proteína. La tripsina es la proteasa más comúnmente utilizada, ya que su corte altamente reproducible en el extremo C-terminal de los residuos de lisina y arginina permite identificar la proteína mediante la comparación de los valores de masa peptídica medidos (reales) con los valores calculados (teóricos) en la digestión virtual de todas las proteínas en la base de datos [219] [220]. La fiabilidad de este método depende de varios factores, entre ellos la precisión en la medida de la masa de los péptidos [219], el número de proteínas presentes en la muestra digerida, el tamaño de la proteína digerida (las proteínas de alto peso molecular generan un mayor número de péptidos por lo que es más probable identificarlas respecto a las pequeñas) y la calidad de las bases de datos empleadas. Existen sistemas de puntuación (el más utilizado es el algoritmo denominado “*Molecular Weight Search*” o “MOWSE”) [221], cuyo objetivo es compensar estos problemas potenciales. Los diferentes programas informáticos que existen en la actualidad para el análisis de los datos generados por espectrometría de masas (Mascot [222], ProFound [223], etc) incluyen estos sistemas de puntuación (Figura I\_5). Los programas comparan las medidas obtenidas con la base de datos, evaluando y ordenando los resultados de acuerdo con el sistema de puntuación. El uso de dos analizadores de masas consecutivos (espectrometría de masas en tándem o MSMS) permite determinar la secuencia de aminoácidos (total o parcial) de un péptido [178, 206, 224] debido al hecho de que los péptidos se fragmentan de un modo predecible al colisionar con un gas (disociación inducida por colisión-CID) [224]. La

espectrometría de masas en tándem puede llevarse a cabo empleando tanto ionización mediante ESI (p. ej. ESI-triple-cuadrupolo o ESI-Qq-TOF) [225], como MALDI (MALDI-TOF-TOF) [212].



**Figura I\_5.** Ejemplo del resultado obtenido tras la búsqueda en MASCOT de una proteína identificada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

A menudo los espectros de fragmentación de tan solo unos pocos péptidos son suficientes para la identificación de la proteína de forma inequívoca [178] [210]. Tras la adquisición de los datos, éstos son enfrentados a las bases de datos de secuencia de modo automático [226] o interpretados manualmente [227, 228].

### 5.3. APLICACIONES DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO

En función del objetivo que se quiera alcanzar, se pueden utilizar diferentes tipos de análisis proteómico. La definición clásica de proteómica incluye el análisis a gran escala de la expresión e identificación de todas las proteínas de células o tejidos. Cuando un estudio se ciñe a esta definición, podemos decir que se trata de un estudio descriptivo del proteoma. De este modo, la proteómica descriptiva incluiría el análisis a

gran escala de la expresión de proteínas de células o tejidos, la identificación de las mismas y la construcción de mapas bidimensionales y / o bases de datos de los mismos [176, 229-231]. Sin embargo, la expansión de la proteómica hacia otras áreas más allá de la pura descriptiva, ha permitido la aparición de la proteómica de expresión diferencial, la proteómica funcional (o de interacciones), los estudios de modificaciones postraduccionales y los análisis de perfiles proteicos.

La proteómica de expresión diferencial requiere la comparación, cuantificación e identificación de patrones de expresión proteicos entre diferentes estados fisiológicos de un mismo tejido o tipo celular. En este tipo de abordaje lo más frecuente es utilizar la electroforesis bidimensional [232], tanto convencional [233-235], como 2D-DIGE [236, 237], ya que en la actualidad proporciona una información cuantitativa que los métodos basados en LC-MS no pueden aportar, aunque esto podría cambiar con la evolución de los métodos de marcaje isotópico.

La proteómica comparativa permite detectar en ocasiones posibles variaciones de las proteínas que deberán ser caracterizadas mediante el análisis de modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, acetilaciones, glicosilaciones, ubiquitinaciones y nitrosilaciones entre otras [238, 239].

En cuanto a la proteómica funcional, una gran parte de la investigación se centra en las interacciones proteína-proteína de complejos proteicos específicos [240] [241], siendo posible también estudiar las interacciones con otras moléculas [242, 243].

Por último, el análisis de perfiles proteicos consiste en un muestreo rápido de las muestras mediante MS, que apenas requiere preparación de la muestra. El espectro de masas constituye un perfil proteico que puede ser comparado en diferentes muestras, lo que permite identificar diferencias en la abundancia relativa de proteínas, que pueden ser posteriormente purificadas e identificadas. Estas técnicas, entre las que se incluye SELDI-TOF MS [218, 244], son complementarias a la proteómica cuantitativa. Otra técnica de análisis de perfiles que puede complementar en este caso a la proteómica descriptiva es la imagen por espectrometría de masas (“*imaging MS*”, IMS), en la cual se analizan directamente cortes histológicos con MALDI-TOF MS, proporcionando información espacial de la distribución de péptidos y / o proteínas en el corte original [245, 246].



### **5.3.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL MEDIANTE 2D y MALDI-TOF**

En el caso de la búsqueda de biomarcadores, las aplicaciones más adecuadas son el análisis de perfiles proteicos y la proteómica de expresión diferencial. Cuando se emplea esta última lo más habitual es la utilización de la electroforesis bidimensional (2-DE ó 2D-DIGE) combinada con la identificación mediante MS MALDI-TOF.

#### **5.3.1.1. ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL**

El protocolo de preparación de un gel bidimensional consta de varias etapas, que incluyen la preparación de la muestra, la primera dimensión mediante IEF, la segunda dimensión mediante SDS-PAGE, la visualización de las proteínas y la digitalización y análisis de los mapas bidimensionales.

##### **5.3.1.1.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA PRIMERA DIMENSIÓN**

La preparación de la muestra es un paso esencial para desarrollo de la 2-DE, que requiere la eliminación de los posibles contaminantes y / o proteasas presentes en la muestra [247]. Los contaminantes se pueden eliminar mediante técnicas como la diálisis, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en fase reversa o precipitación de proteínas [248]. En el caso de las proteasas, es posible bloquearlas mediante inhibidores específicos, aunque es necesario comprobar previamente que sean compatibles con la 2-DE [249]. A continuación, las proteínas han de solubilizarse en un medio que debe contener: un agente caotrópico neutro para solubilizar las proteína (normalmente urea); un detergente no iónico o “zwitteriónico” para prevenir agregaciones (NP-40, CHAPS, etc.) [250]; un agente reductor, para romper los puentes disulfuro ( $\beta$ -mercaptoethanol, dithiothreitol (DTT), etc.); y finalmente anfólitos, que potencian la solubilidad de las proteínas, minimizando la agregación por interacciones de carga (aunque pueden llegar a interferir con el IEF si su concentración es demasiado elevada) [247].

### **5.3.1.1.2. PRIMERA DIMENSIÓN: ISOELECTROENFOQUE (IEF)**

Las proteínas son moléculas anfotéricas que pueden estar cargadas positiva o negativamente en función del pH del medio en que se encuentren. El isoelectroenfoque separa las proteínas de acuerdo a su pI. Si se aplica un campo eléctrico a un gradiente de pH, las proteínas que estén dentro migrarán hasta alcanzar el pH equivalente a su pI, donde pierden toda carga y dejan de moverse. Por tanto, para realizar un IEF necesitamos un gradiente de pH (IPG) [202] y una fuente capaz de generar una diferencia de potencial. Actualmente los gradientes IPG se venden de forma comercial, en tiras de plástico que tienen adherida la acrilamida con el gradiente de pH. Dicha acrilamida está deshidratada para mejorar su conservación, por lo que es necesario rehidratar la tira con la solución adecuada antes de comenzar el IEF. La muestra se puede aplicar durante o después de este paso de rehidratación [251, 252], tras el cual se desarrolla el IEF, que debe constar de varias etapas, ya que la conductividad eléctrica del gel va cambiando a lo largo del proceso [251]. Al igual que ocurría con la preparación previa, el tipo de rehidratación, la forma de aplicación, así como las etapas y duración del IEF deben ser determinados empíricamente para cada tipo de muestra biológica.

### **5.3.1.1.3. SEGUNDA DIMENSIÓN (SDS-PAGE)**

Antes de realizar la electroforesis SDS-PAGE según Laemmli [253], las tiras IPG deben ser tratadas con un tampón de equilibrado, que contiene varios reactivos necesarios para la separación en la segunda dimensión. El más importante de ellos es el SDS, que es fundamental en el desarrollo de este tipo de electroforesis, ya que desnaturaliza las proteínas y forma con ellas complejos cargados negativamente que migran hacia el polo positivo durante el proceso. La solución de equilibrado contiene también urea y glicerol, para reducir los efectos electroendosmóticos [203].

El equilibrado se realiza en dos pasos: un primero en el que se añade DTT al tampón anteriormente descrito y un segundo paso, en el que se añade IAA. Estos dos pasos previenen la re-oxidación de las proteínas y evitan la aparición de los patrones distorsionados por rayas verticales (*streaking*) [254]. A continuación, las proteínas

enfocadas y equilibradas en la tira IPG vuelven a ser separadas en base a su masa molecular empleando SDS-PAGE en la segunda dimensión (en dirección perpendicular a la primera). La elección del porcentaje de acrilamida y el tipo de gel (homogéneo o en gradiente) depende del rango de masa molecular que se quiera resolver. Para análisis de mezclas complejas se suelen utilizar geles en gradiente.

#### **5.3.1.1.4. VISUALIZACIÓN. TINCIÓN DE GELES BIDIMENSIONALES**

Una vez que la segunda dimensión ha finalizado, las manchas proteicas deben ser visualizadas, para lo cual existen varios métodos de tinción, con diferentes características (sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad) [255, 256]. El método más sensible es la tinción con plata, aunque el rango de detección lineal es más amplio en las técnicas que utilizan compuestos fluorescentes (p. ej. SYPRO) [257, 258]. La aplicación de estos métodos es posterior al desarrollo de la 2-DE, excepto en el caso de la electroforesis bidimensional diferencial 2D-DIGE [204]. Se trata de una técnica comercializada como “*Ettan DIGE proteomics system*” (GE Healthcare), que permite un análisis cuantitativo de la expresión diferencial entre muestras biológicas, basándose en las propiedades específicas de tres fluorocromos con propiedades espectrales diferenciales (Cy2, Cy3 y Cy5; “*CyDye DIGE Fluor minimal dyes*”). Estos compuestos fluorescentes, que han sido diseñados para igualar su masa y carga, se utilizan para marcar covalentemente las proteínas de diferentes muestras en residuos de lisina antes de su separación en un mismo gel bidimensional. Las proteínas marcadas pueden ser detectadas a las longitudes de onda de excitación y emisión apropiadas, empleando un escáner especial para la detección de señales fluorescentes. Las señales detectadas se pueden entonces comparar empleando las aplicaciones informáticas adecuadas. Posteriormente se pueden teñir los geles tras la digitalización de las imágenes fluorescentes, con azul Coomassie o SYPRO Ruby. Esta metodología tiene múltiples ventajas, ya que todas las muestras están sujetas a las mismas manipulaciones experimentales y, al tratarse de un método de fluorescencia [257], proporciona una mayor sensibilidad y una mayor linealidad en el rango dinámico de detección que otras técnicas de tinción. Por ello, los cambios en la expresión de las proteínas pueden ser detectados y cuantificados con mayor nivel de confianza. Para realizar un experimento

de electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) se requiere un diseño experimental minucioso, en función del objetivo buscado.

#### **5.3.1.1.5. ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN Y ANÁLISIS DE GELES 2-DE**

Las imágenes de los geles deben ser digitalizadas y guardadas en archivos de imagen informáticos para poder ser analizadas. La complejidad de los geles bidimensionales requiere el empleo de paquetes informáticos especializados para su análisis [197, 259, 260], que deben ser capaces de realizar una serie de funciones imprescindibles como la edición y optimización de la imagen del gel, la detección de las manchas proteicas, el emparejamiento de los puntos en los diferentes geles objeto de estudio y el análisis estadístico y cuantitativo final.

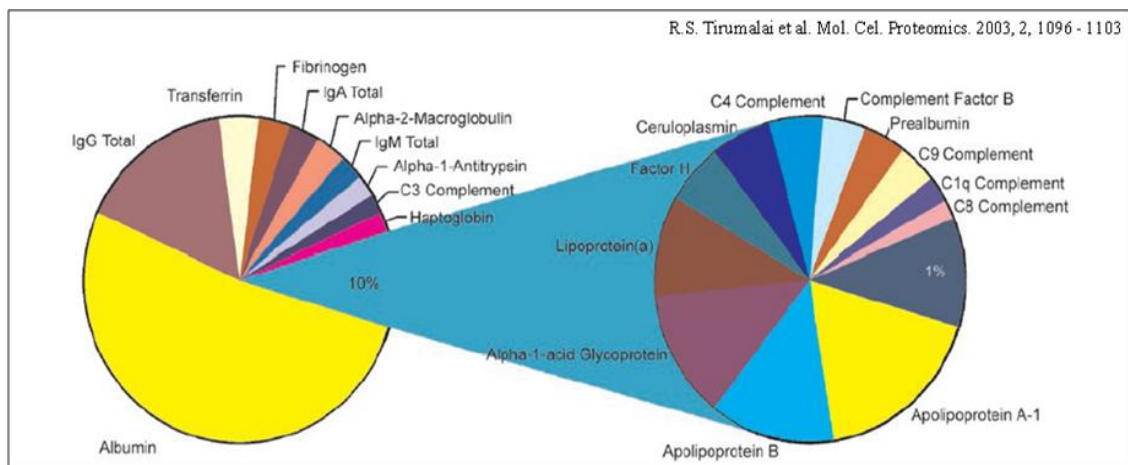
#### **5.3.1.2. MALDI-TOF**

El proceso de ionización mediante MALDI produce la vaporización inducida por láser de una mezcla sólida de un analito (proteína o péptido) y una matriz depositada en una placa metálica. En dicha mezcla, que debe haber sido cocrystalizada previamente, la matriz actúa como aceptor de la energía transmitida por el láser y la transfiere a las moléculas de analito, produciendo la ionización y sublimación de ambas moléculas (matriz y analito) a fase gaseosa [261]. La aplicación de potencial eléctrico elevado (20-25 KV), acelera los iones desde la placa de muestra hasta el tubo de vuelo del analizador TOF, donde no existe campo eléctrico alguno. Para un voltaje de aceleración dado, el tiempo de vuelo (TOF) empleado por un ión para llegar al detector (microsegundos), es proporcional a su  $m/z$ . De esta manera, los péptidos pequeños vuelan más rápido que los mayores, por lo que el detector captará las masas en orden creciente (modo lineal). El resultado es la representación de la intensidad (abundancia) de cada péptido frente a la relación  $m/z$ , dando lugar al espectro de masas [211]. Es posible mejorar la resolución de MALDI-TOF empleando un espejo de iones o “reflector” al final del tubo de vuelo [178]. En el reflector, los iones son reflejados hacia el detector, compensando las pequeñas diferencias de energía cinética que puedan llevar dos iones idénticos, lo que aumenta mucho la exactitud en el rango de detección. La

unión de dos analizadores TOF mediante una cámara de colisión situada entre ellos permite el aislamiento y la fragmentación de péptidos para analizar su secuencia de aminoácidos [212].

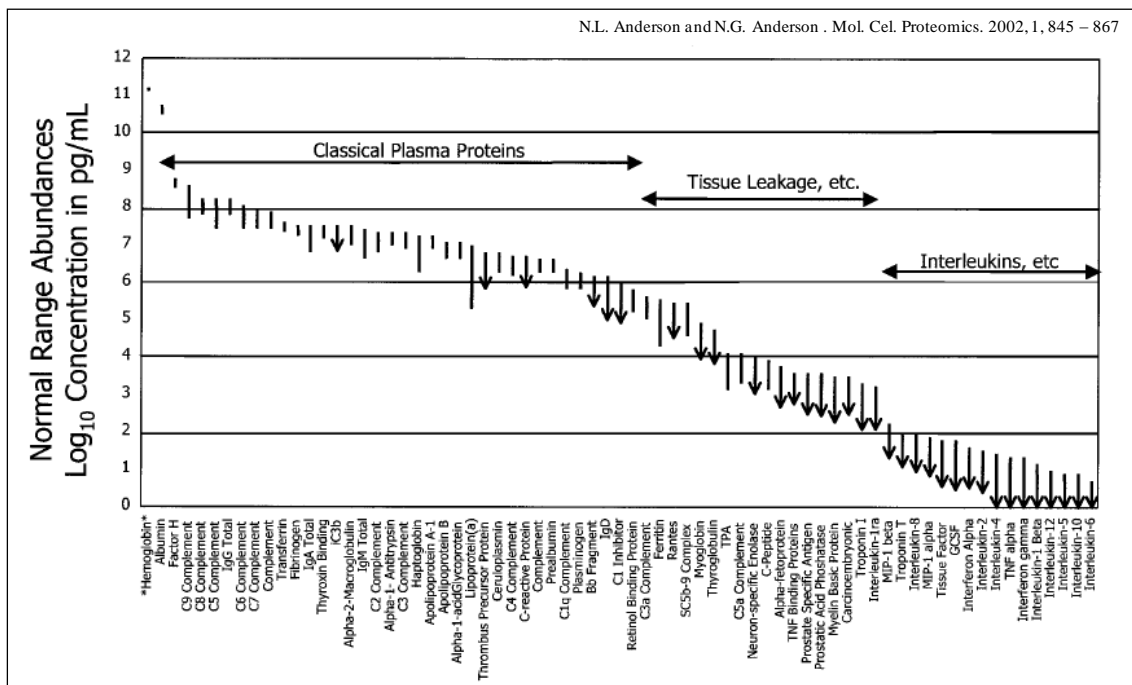
#### 5.4. LA COMPLEJIDAD DEL PROTEOMA DEL PLASMA

El plasma es una de las muestras más ricas en contenido proteico, en la que predominan una serie de proteínas muy abundantes (proteínas mayoritarias del plasma) junto con proteínas producidas por las células circulantes de la sangre y otros tejidos [262, 263]. Además, puede transportar proteínas específicas de tejidos que hayan sido liberadas en la sangre por diferentes motivos. Este hecho hace suponer que el plasma contiene información sobre el estado fisiológico de las diferentes partes del organismo [264]. Se trata además de una muestra de fácil obtención y manipulación, lo que la convierte en la más importante desde el punto de vista clínico y se emplea rutinariamente con fines diagnósticos [262]. A pesar de ello, el plasma humano no se ha utilizado a menudo en proteómica clínica, ya que tan sólo 22 proteínas, entre las que se encuentran la albúmina, inmunoglobulinas, haptoglobinas y transferrinas, representan aproximadamente el 99% del contenido proteico total (figura I\_06) [265, 266].



**Figura I\_6.** Gráfico representativo de la contribución relativa de las proteínas en el plasma, donde 22 proteínas constituyen el 99% de la concentración proteica del plasma.

De hecho, se trata probablemente de la muestra biológica con un mayor rango dinámico de concentración que separa en unos  $10^9$  órdenes de magnitud (figura I\_07) [262] la proteína más abundante del plasma, la albúmina (30-50 mg / ml), de las más escasas, como la IL-6 (0-5 pg / ml). Asimismo, muchas de las proteínas del plasma presentan una masa molecular y punto isoeléctrico semejantes, por lo que las proteínas más abundantes podrían entorpecer la detección de posibles biomarcadores de enfermedad que se encontrasen en muy baja concentración. Esto ha supuesto una enorme dificultad a la hora de analizar el proteoma del plasma mediante 2-DE [262], debido al limitado rango dinámico que esta técnica es capaz de discriminar.



**Figura I\_7.** Intervalos de concentración para 70 proteínas analizadas en plasma. La abundancia se representa en una escala logarítmica que abarca 12 órdenes de magnitud. En los casos en que sólo se conoce el límite superior, el extremo inferior de la línea que representa el intervalo es una punta de flecha. Las proteínas clásicas del plasma se agrupan a la izquierda del gráfico (proteínas abundantes); las proteínas liberadas ocasionalmente por los tejidos al torrente sanguíneo (ej. Enzimas y troponinas) se agrupan en el centro; y las citoquinas se agrupan a la derecha (poco abundantes). Se incluye la hemoglobina (en el extremo izquierdo del gráfico) como referencia. TPA, Activador de Plasminógeno en tejido; GCSF, Factor estimulador de colonias de Granulocitos; TNF, Factor de Necrosis Tumoral.

Sin embargo, la evolución en los últimos años de metodologías como la cromatografía multidimensional [267-269], o la tecnología SELDI [217] (que ha permitido la identificación de biomarcadores en varias patologías, especialmente en cáncer), está aportando nuevas y prometedoras opciones para el análisis de los fluidos

biológicos. También se han descrito últimamente numerosos métodos que facilitan el análisis del plasma mediante 2-DE [270-274], incluyendo métodos de afinidad (basados en anticuerpos) para eliminar las proteínas mayoritarias [183, 275]. De entre ellos los métodos de depleción múltiple han demostrado ser más útiles a la hora de analizar el plasma mediante electroforesis bidimensional [276], lo que aporta nuevas perspectivas al análisis proteómico del plasma como herramienta para la búsqueda de biomarcadores [276].

**Hipótesis**





El estado nutricional puede influenciar el desarrollo y la progresión de enfermedades asociadas con la edad. La influencia que la nutrición tiene sobre la disfunción endotelial va más allá de sus efectos conocidos sobre los factores de riesgo cardiovasculares clásicos. En este sentido se sabe que los ácidos grasos de la dieta así como la suplementación de ésta con antioxidantes, juegan un papel fundamental en el inicio y desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Los ácidos grasos y otros componentes minoritarios de la dieta, así como los suplementos de ésta con CoQ<sub>10</sub>, pueden afectar a la síntesis y el metabolismo de proteínas plasmáticas, comportándose éstas como posibles biomarcadores que ayuden a entender mejor el efecto que la nutrición tiene sobre el organismo.

Nuestra hipótesis es que la ingesta crónica de dietas con diferente contenido graso así como el suplemento con el antioxidante CoQ<sub>10</sub> modifican el perfil de proteínas plasmáticas, tanto en ratas como en humanos. El perfil de proteínas (proteoma) puede relacionarse con los efectos sobre la salud demostrados para dichas dietas. La hipótesis nula es que los distintos tipos de grasa y los suplementos de la dieta con CoQ<sub>10</sub> no modifican el perfil de proteínas plasmáticas.



## **Objetivos**



El **objetivo principal** de este trabajo es la identificación de biomarcadores plasmáticos que nos ayuden a entender el mecanismo de acción del componente graso y antioxidante de la dieta sobre procesos relacionados con el envejecimiento.

Para la consecución de este objetivo se perseguirán los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Optimizar una metodología proteómica para estudiar cambios sobre los niveles de proteínas plasmáticas tras la ingesta de diferentes dietas experimentales.
- 2) Determinar el efecto que tiene el consumo prolongado de dietas con diferente contenido graso sobre las proteínas plasmáticas de una población de animales de laboratorio (ratas) a lo largo del envejecimiento, y de una población de personas mayores de 65 años.
- 3) Estudiar el efecto que tiene la ingesta de una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados suplementada con CoQ<sub>10</sub> sobre las proteínas plasmáticas en una población de ratas a lo largo del envejecimiento.
- 4) Estudiar el efecto que tiene la ingesta de una dieta Mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> sobre proteínas plasmáticas en una población de personas mayores de 65 años.
- 5) Determinar los niveles plasmáticos de CoQ alcanzados tras el consumo de diferentes dietas suplementadas con CoQ<sub>10</sub>, tanto en animales de laboratorio (ratas) como en una muestra de personas mayores de 65 años.
- 6) Determinar si los cambios observados sobre algunas de las proteínas plasmáticas son reproducibles *in vitro*.



# **Materiales y Métodos**





## **1. GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN**

### **1.1. ESTUDIOS SOBRE UNA POBLACIÓN DE RATAS WISTAR**

Los animales y dietas que se usan en este trabajo son los mismos utilizados en trabajos previos llevados a cabo por el grupo del Prof. José Mataix en la Universidad de Granada y por el Grupo del Prof. José M. Villalba en la Universidad de Córdoba [40, 41, 277, 278]. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la Universidad de Granada de acuerdo con las pautas de buenas prácticas establecidas por la Sociedad Española para Animales de Laboratorio, contando con la aprobación pertinente del Comité Ético de la Universidad de Granada. Se han utilizado 240 ratas Wistar de sexo masculino, que desde el destete se alimentaron con diferentes dietas experimentales que se diferenciaban en el contenido graso o en la suplementación o no de la dieta con CoQ<sub>10</sub>. Las ratas se mantuvieron en jaulas colectivas para 10 unidades cuidando las condiciones de temperatura ( $20^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad (60-70 %), con 12 horas de luz/día. El agua y dieta se proporcionaron *ad libitum*.

### **1.2. ESTUDIOS SOBRE UNA POBLACIÓN DE SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS**

#### **1.2.1. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL**

Se realizó sobre la base de las siguientes asunciones:

- Variable principal del estudio: Incremento del flujo sanguíneo máximo tras isquemia (vasodilatación dependiente del endotelio).
- Desviación estándar de la variable principal de estudio: 64.
- Diferencia mínima esperada: 85 ( $H = 683$ ;  $H1 = 768$ ;  $r = 0.75$ ).
- Riesgo alfa = 0.05.
- Potencia ( $1-\beta$ ) = 0.90.

- Pérdidas estimadas: 10%.

Sobre la base de estas premisas se necesitan, al menos, un total de 18 voluntarios estudiados.

### **1.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se seleccionaron personas (hombres y mujeres) de edad superior a 65 años, con cifras de colesterol total menor de 200 mg/dl, triglicéridos inferiores a 200 mg/dl y cifras de tensión arterial sistólica y diastólica menores de 130 y 85 mmHg respectivamente. En esta población se llevó a cabo un análisis del fenotipo de la apolipoproteína E (consultar apartado 4) con objeto de seleccionar aquellos que presentaban el fenotipo más común en la población general (E3/E3) con el fin de eliminar la influencia que dicha variación genética induce sobre la respuesta lipémica postprandial y sobre los niveles plasmáticos de colesterol y el grado de respuesta lipídica a dietas con alto contenido graso. En el grupo de voluntarios que presentaron el fenotipo de apo E E3/E3 (n = 17) se llevó a cabo el estudio de intervención dietética, habiéndose obtenido previamente el consentimiento firmado.

### **1.2.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Se excluyeron del estudio aquellas personas con irregularidades en el seguimiento de las dietas, con evidencias de enfermedad renal, hepática, tiroidea o disfunción cardíaca, personas que realizaron una actividad física significativamente superior a la normalidad y aquellos que ingerían más de 20 gr de alcohol al día.

Tras estos criterios establecidos, el estudio se ha realizado sobre una población de 17 sujetos sanos (10 hombres y 7 mujeres) con edad superior a 65 años, a los cuales se les realizó una historia clínica y una exploración física completa, recogiendo las medidas de peso, talla y tensión arterial. Se les extrajo una muestra de sangre para analizar hemograma y bioquímica plasmática general y una muestra de orina para determinar la proteinuria de 24 horas.

#### 1.2.4. ASPECTOS ÉTICOS

Los estudios llevados a cabo en humanos se han realizado respetando los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki (1964), en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina (1997), en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos (1997), así como cumpliendo los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. El proyecto de investigación se sometió a evaluación por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía. Todos los pacientes fueron informados acerca del proyecto y se les solicitó el consentimiento informado escrito antes de entrar en el mismo.

Los estudios se han llevado a cabo en las consultas externas de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba (España).

## 2. INTERVENCIONES DIETÉTICAS

### 2.1. POBLACIÓN DE RATAS WISTAR

A grupos de 8 ratas Wistar macho (*Rattus norvegicus*) con pesos comprendidos entre 80-90 g, se les proporcionó de manera *ad libitum*, agua y una dieta semisintética e isoenergética con un contenido graso del 8%, del cual, un 61% del total lo constituyeron ácidos grasos poliinsaturados n-6 (aceite de girasol) (PUFA) ó ácidos grasos monoinsaturados n-9 (aceite de oliva) (MUFA) durante un período de hasta 24 meses. En el caso de los animales alimentados con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>, éstos se asignaron a 2 grupos cuya diferencia consistió en el suplemento o no de la dieta con coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) (ingesta de 0,7 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>). Todas las dietas se prepararon semanalmente y se almacenaron en cámara fría a 4°C. A continuación se exponen los grupos experimentales:

1.- Grupo *OLIVA VIRGEN-Alfa tocoferol (MUFA<sub>n-9</sub>)*. Grupo con una dieta base semisintética desgrasada adicionada con un 8% de aceite de oliva virgen y una cantidad suficiente de  $\alpha$ -tocoferol, como para igualar su contenido a una cantidad isoponderal de aceite de girasol y eliminar el efecto antioxidante de esta molécula sobre el CoQ.

2.- Grupo *GIRASOL (PUFA<sub>n-6</sub>)*. Grupo con una dieta base semisintética desgrasada adicionada con un 8% de aceite de girasol.

3.- Grupo *GIRASOL + CoQ<sub>10</sub> (PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>)*. Grupo con una dieta base semisintética idéntica a la anterior, a la que se adicionó un suplemento de coenzima Q<sub>10</sub> de modo que la dosis ingerida fuera aproximadamente de 0,7 mg Kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> y rata.

## 2.2. SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS

Todos los individuos se sometieron de forma randomizada y cruzada siguiendo un diseño de cuadrados latinos, a cuatro periodos de intervención dietética de 16 semanas de duración en total, las cuales fueron precedidas de dietas isocalóricas y de composición similar a su consumo habitual con objeto de mantener estable el peso de los voluntarios.

La dieta similar al consumo habitual era una dieta típicamente Mediterránea y consistía en un 15% (en relación al contenido calórico total) de proteína, 50% de carbohidratos (HC) y 38% de grasa total, distribuida de la siguiente forma: <10% de grasa saturada (SFA), 6% de poliinsaturada (PUFA) y 19% de monoinsaturada (MUFA) (fundamentalmente ácido oleico a expensas de aceite de oliva virgen).

Las intervenciones dietéticas realizadas a los sujetos se diferenciaban en el tipo de grasa consumida, así como en la suplementación o no de la dieta con CoQ<sub>10</sub>, de modo que los grupos experimentales fueron los siguientes:

1.- Dieta *MEDITERRÁNEA + PLACEBO (MUFA<sub>n-9</sub>)*: Dieta que consistía en un 15% de proteína, 47% de carbohidratos y 38% de grasa total, distribuida de la siguiente forma: <10% de SFA, 4% de PUFA, de la cual 0,4% la constituían ácidos grasos alfa-linolénico n-3 de origen vegetal (a expensas de nueces) y 24% de MUFA (fundamentalmente ácido oleico a expensas de aceite de oliva virgen).

2.- *Dieta MEDITERRÁNEA + CoQ<sub>10</sub> (200 mg/día en cápsulas) (MUFA n-9 + CoQ<sub>10</sub>):* Dieta cuya composición era la misma que el caso anterior pero suplementada con Coenzima Q de modo que la dosis ingerida era aproximadamente de 200 mg/día.

3.- *Dieta SATURADA (SFA):* Dieta que consistía en un 15% de proteína, 47% de carbohidratos y 38% de grasa total, distribuida de la siguiente forma: 22% de SFA, 4% de PUFA (de la cual 0,4% la constituían ácidos grasos alfa-linolénico n-3) y 12% de MUFA.

4.- *Dieta POLIINSATURADA (PUFA n-3):* Dieta con alto contenido en carbohidratos enriquecida en PUFA n-3 de origen vegetal, la cual consistía en 15% de proteína, 55% de carbohidratos y <30% de grasa total, distribuida de la siguiente forma: <10% SFA, 8% PUFA con un 2% de ácidos grasos alfa-linolénico n-3 y un 12% de MUFA.

El contenido de colesterol de las dietas fue de < 200 mg/día y se mantuvo constante a lo largo de los periodos de intervención dietética. Las dietas se realizaron sobre la base de 14 menús rotatorios previamente establecidos utilizando alimentos naturales y calibrados para administrar las proporciones establecidas en cada periodo de dieta. Estas dietas se administraron y se consumieron por los voluntarios del estudio en el comedor del Hospital o del centro de tercera edad bajo estricta supervisión de un dietista del equipo investigador. En el cálculo de los nutrientes se utilizaron las tablas de composición de los alimentos del USDA. El control y adherencia de los voluntarios a la dieta se realizó mediante el análisis de la composición en ácidos grasos de los ésteres de colesterol de las LDLs al final de cada uno de los periodos de intervención dietética. Además, se analizó la composición en principios inmediatos y ácidos grasos de los homogenados realizados con los diferentes menús consumidos por los participantes en el estudio.

La composición de las cuatro dietas, expresado en porcentaje del total de calorías consumidas, fue la siguiente:

	DIETA MUFA <sub>n-9</sub>	DIETA MUFA <sub>n-9</sub> + CoQ <sub>10</sub>	DIETA SFA	DIETA PUFA <sub>n-3</sub>
Proteínas	15%	15%	15%	15%
CHO	47%	47%	47%	55%
Grasa total	38%	38%	38%	<30%
SFA	<10%	<10%	22%	<10%
MUFA	24%	24%	12%	12%
PUFA	4%	4%	4%	8%
n-3 (ác. $\alpha$ -linolénico)	0,4%	0,4%	0,4%	2%

**Tabla M\_I.** Composición de las dietas.

Las cápsulas de CoQ<sub>10</sub> y placebo fueron producidas y administradas por la compañía japonesa *Kaneca Corporation*, y fueron idénticas en peso y aspecto externo.

### 3. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA

#### 3.1. POBLACIÓN DE RATAS WISTAR

Para la obtención de muestras, 8 ratas por grupo fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y posterior decapitación a los 6 (jóvenes) o 24 meses (viejas) desde el comienzo del experimento. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de cristal con heparina de litio para la conservación de las muestras y la fase plasmática se obtuvo tras una centrifugación a 3000 RPM a 4°C. El plasma se congeló rápidamente con nitrógeno líquido y posteriormente se guardó a -80°C en presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 100 mM y 10  $\mu$ g/ $\mu$ l de cada uno de los inhibidores de proteasas: quimostatina, leupeptina, antipaína y pepstatina A (CLAP)). No se detectó la presencia de hemólisis en las muestras.

### 3.2. POBLACIÓN DE SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS

Una vez administradas las dietas durante los períodos establecidos en cada uno de los grupos experimentales y tras mantener a los sujetos 12 horas en ayuno, se les administraron desayunos que consistían en el 50 - 60% de las calorías diarias ingeridas habitualmente por el individuo en cada uno de los períodos de intervención dietética, que estaba compuesta por 0,7 gr/Kg de peso, 5 mg de colesterol/Kg de peso y 60.000 IU de Vitamina A por m<sup>2</sup> de superficie corporal y que tenían la siguiente distribución calórica: 65% de grasa, 10% de proteína y 25% de carbohidratos. De esta forma, la composición grasa de las dietas fue la siguiente en cada uno de los casos:

- 12% SFA, 43% MUFA y 10% PUFA, tanto en el grupo MUFA<sub>n-9</sub> (cápsula sin CoQ<sub>10</sub>) como en el grupo MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> (200mg en cápsula).
- 38% SFA, 21% MUFA y 6% PUFA en el grupo SFA.
- 20% SFA, 24% MUFA y 16% PUFA en el grupo PUFA<sub>n-3</sub>.

Tras esto se extrajeron 20 ml de sangre venosa empleando agujas *Venoject*<sup>R</sup> (Terumo<sup>TM</sup>) y tubos (Vacutainer) conteniendo 1 mg.dL<sup>-1</sup> de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) para evitar la oxidación de las lipoproteínas y como anticoagulante. Se tuvo especial cuidado para evitar la exposición al aire, la luz y la temperatura ambiente. De cada una de las muestras de sangre se aisló la fase plasmática mediante centrifugación durante 10 minutos a 2500 RPM y 4°C. Las muestras de plasma aisladas de la fracción sanguínea se trataron con inhibidores de proteasas (PMSF 100Mm y 10 µg/µl de cada uno de los inhibidores de proteasas: quimostatina, leupeptina, antipaína y pepstatina A (CLAP)) y se congelaron rápidamente a -80°C hasta su procesamiento para evitar las variaciones inter-ensayo. No se detectó la presencia de hemólisis en las muestras.



#### **4. AISLAMIENTO DE ADN Y DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE APO E**

Con el fin de eliminar la influencia que la variación genética induce sobre los niveles plasmáticos de colesterol, se seleccionaron aquellos pacientes que eran homocigóticos para el alelo E3 del gen de la apolipoproteína E. El ADN genómico se extrajo de la capa leucocitaria tratada con EDTA mediante el kit comercial Qiagen® (Qiagen™, Courtaboeuf, France). Para ello se extrajo el ADN a partir de 10 ml de sangre recogida en tubos de EDTA (1 mg/dl) como anticoagulante. Posteriormente se centrifugaron durante 15 min. a 2500 RPM y 4°C, para aislar la capa de leucocitos, los cuales fueron tratados con 10 ml de tampón Montreal-Baltimore (para 500ml: 54,77 g sacarosa, 6,057 g Tris-HCl, 2,54 g MgCl<sub>2</sub>, 5ml Tritón X-100) para destruir las membranas celulares. A continuación, se introdujeron los tubos en hielo durante 10 min y se centrifugaron 2 veces a 5500 RPM a 4°C durante 20 min. Al precipitado obtenido se le añadió 3 ml de tampón Nucleo Lysis (para 500 ml: 250 ml Tris-HCl 20 mM, 2 ml EDTA 0,5 M, 40 ml NaCl 5 M, 208 ml de H<sub>2</sub>O destilada, ajustándose a un pH 8,2), lisando así los núcleos y quedando el material genético libre, homogeneizándose después la muestra. Una vez realizado el proceso, se le añadió a cada tubo 0,2 ml de sodio dodecil sulfato (SDS) al 10% y 0,1 ml de 5x proteinasa K (por muestra: 1 mg de proteinasa K, 10µl de EDTA 0,5M, 100µl de agua destilada), agitando por inversión. Tras incubación a 42° durante toda la noche, se añadió 1 ml de CINa 6M, volviendo a centrifugar durante 15 min a 2500 RPM y 4°C. El ADN contenido en el sobrenadante se precipitó con etanol al 100% y se disolvió en 500µl de tampón TE estéril (para 500 ml: 0,606 g Tris-HCl, 1 ml de EDTA 0,5M, 500 ml de agua destilada y esterilizada, ajustando el pH a 8.0).

Para cuantificar el ADN se empleó un espectrofotómetro Beckman DU 640 UV-Visible de lectura digital, usando una longitud de onda de 260 nm.

El estudio de los polimorfismos de apolipoproteína E se efectuó mediante los análisis de fragmentos de restricción del ADN amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tal y como describió Kontula et al. [279]. En resumen, se realizó una amplificación de un fragmento de 266-bp (pares de bases) del cuarto exón del gen de la apolipoproteína E mediante un sistema de PCR con 0,5 µg de ADN genómico, 1,5

mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 1 μmol/L de cada uno de los dos oligonucleótidos (E1, 5'-GAACAACCTGACCCCGGTGGCGGAG-3', y E2, 5'-TCGCGGGCCCCGGCCTGGTACTGCCA-3'), 2,5 U de Taq polimerasa, 200 μmol/L de nucleótidos y 10% dimetil sulfóxido en un volumen final de 50 μl. El ADN fue desnaturalizado a 95°C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 1 min., de anillamiento a 63°C durante 1,5 min., y de extensión a 72°C durante 2 min. A continuación, 20 μl de los productos de amplificación por PCR fueron sometidos a digestión con 10 unidades de la enzima de restricción CfoI en un volumen total de 35 μl. Los productos de digestión del ADN fueron sometidos a electroforesis no desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 8% a 150V durante 2 horas para identificar el tamaño de los productos de digestión del ADN y de esta forma determinar las diferentes variaciones alélicas mediante tinción con sales de plata. Para ello el gel de acrilamida se sumergió por dos veces en una cubeta con una solución de etanol- acético durante 3 min., y se sometió después a tres lavados con agua destilada. A continuación, se sumergió 20 min. en una solución de desarrollo de la tinción y posteriormente en solución de carbonato sódico durante 15 min.

## 5. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE PROTEÍNA

Para todas las muestras en las que fue necesario analizar la cantidad de proteína, el método usado fue el descrito por Stoscheck (1990), que permite hacer una determinación correcta en muestras plasmáticas. Para este ensayo 50 μl de NaOH 1 N fueron mezclados con una alícuota de la muestra cuya cantidad de proteína queríamos determinar y 1 ml de reactivo de Bradford (1976). Transcurridos 10 min de incubación a temperatura ambiente, la densidad óptica se analizó a 590 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-640 UV-visible y la cantidad de proteína fue calculada a partir de una recta patrón realizada previamente con concentraciones conocidas de γ- globulina.

## **6. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ<sub>10</sub> TOTAL, OXIDADO Y REDUCIDO EN PLASMA**

### **6.1. EXTRACCIÓN DE LA FASE LIPÍDICA**

El estudio de las relaciones CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>/ CoQ<sub>10</sub>, CoQ<sub>9</sub>H<sub>2</sub>/ CoQ<sub>9</sub> y de los niveles de CoQ<sub>10</sub> y CoQ<sub>9</sub> totales presentes en el plasma, tanto de ratas como de humanos, se realizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) acoplado a un detector electroquímico. Para ello, se aplicó un protocolo de extracción consistente en mezclar el plasma (50 o 100 µl en rata o humanos respectivamente) con un mismo volumen de SDS al 2% y 4 volúmenes de etanol al 95% - isopropanol al 5% (con una mezcla vigorosa de 1 minuto entre ambas adiciones). Tras ello, se añadieron 10 volúmenes de hexano para obtener la fase lipídica, la cual se secó en un evaporador al vacío (Speed-Vac).

### **6.2. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ<sub>10</sub>**

El extracto lipídico obtenido, tal como se indica en el punto anterior, se resuspendió en metanol para posteriormente inyectar la muestra (20 µl) con la ayuda de una jeringa Hamilton en una columna C18 de fase reversa para HPLC (5 x 0'45 cm de longitud, 5 µm de tamaño de partícula). El flujo fue de 1 ml/min y la fase móvil estuvo compuesta por metanol y n-propanol (1:1) en el caso de ratas y (2:1) en el caso de humanos, ambas conteniendo perclorato de litio (2.12 g/L) como electrolito. La monitorización de ambas isoformas (Q<sub>9</sub> y Q<sub>10</sub>) oxidadas y reducidas se llevaron a cabo con un detector electroquímico Coulochem II (ESA, Chelmsford, MA) acoplado a una célula analítica Modelo 5010 ajustada a potenciales de -500 mV y +300 mV en los electrodos 1 y 2, respectivamente. Para la detección de la quinona se usó el segundo electrodo, y para su cuantificación se realizó la integración de picos comparados con soluciones estándar externas [41]. Debido a oscilaciones observadas en la sensibilidad del detector, previamente a cada experimento se prepararon patrones con cantidades conocidas de coenzima Q<sub>10</sub> y Q<sub>9</sub> oxidado a partir de una solución madre a la que se le determinó la concentración real midiendo la absorbancia a 275 nm, utilizando un coeficiente de extinción de 13'2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 6.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO

El estudio estadístico realizado sobre los datos obtenidos de la población de ratas se ha llevado a cabo utilizando el software GraphPad Prism, donde los resultados mostrados representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD), para lo cual se ha utilizado el test T de Student considerándose significativos los valores *P* menores de 0,05. En el caso del estudio estadístico llevado a cabo en la población de humanos, se ha utilizado el programa SPSS v. 15.0, donde se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas para determinar el efecto de los diferentes tipos de dieta sobre los niveles de CoQ<sub>10</sub>. Se consideraron significativos los valores *P* menores de 0,05.

## 7. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PLASMA

El plasma es una muestra muy compleja compuesta por agua, electrolitos, metabolitos, nutrientes, hormonas y un amplio rango dinámico de concentración de proteínas (de diez órdenes de magnitud). Dentro de este gran rango dinámico predominan una serie de proteínas muy abundantes (proteínas mayoritarias del plasma), junto con proteínas producidas por las células circulantes de la sangre y otros tejidos [262, 263]. En torno al 99% del contenido proteico total lo constituyen 22 proteínas, entre las que destacan la albúmina, inmunoglobulinas, haptoglobinas y transferrinas (Figura I\_6 de la Introducción) [265, 266]. Esto, junto con la similitud en masa molecular y punto isoelectrico entre proteínas, hace muy complejo el estudio proteómico en este tipo de muestras, ya que estas proteínas mayoritarias podrían entorpecer la detección de posibles biomarcadores de enfermedad que se encontrasen en muy baja concentración. Esto ha supuesto una enorme dificultad a la hora de analizar el proteoma del plasma mediante electroforesis bidimensional [262] debido al limitado rango dinámico que esta técnica es capaz de discriminar. Sin embargo, los últimos años se han descrito métodos que facilitan el análisis del plasma mediante 2-DE [274, 280] incluyendo métodos de afinidad (basados en anticuerpos) para eliminar las proteínas mayoritarias [183, 275, 281]. Por todas estas premisas, se han tratado todas las muestras de plasma dentro de cada grupo sujeto a estudio para la eliminación de las proteínas mayoritarias o la disminución del rango dinámico de concentraciones, utilizándose para

ello diferentes Kits comerciales basados en métodos cromatográficos. Tras este pretratamiento de las muestras se determinó de nuevo la cantidad de proteína utilizando el método de Bradford [282].

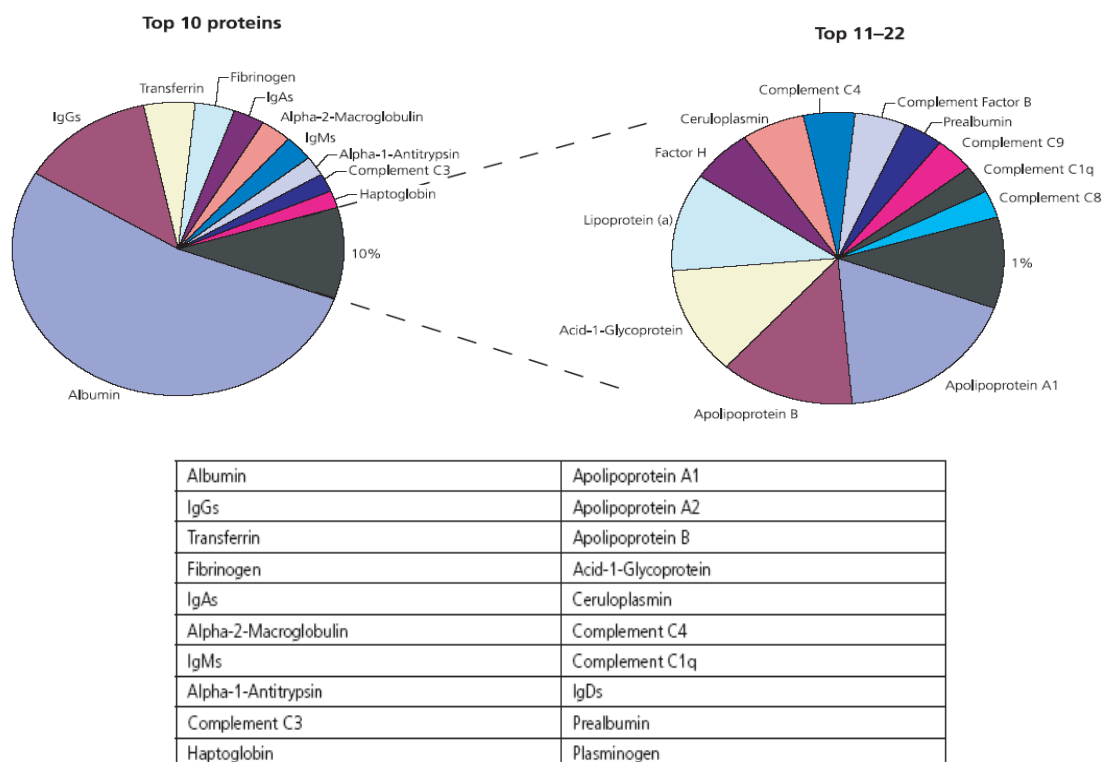
### **7.1. DEPLECIÓN DE INMUNOGLOBULINAS Y ALBÚMINA**

Entre las proteínas plasmáticas más abundantes se encuentra la albúmina (45 mg/ml) y las IgGs (10 mg/ml), lo cual supone aproximadamente el 65% y el 15% respectivamente del total de proteínas plasmáticas. Con el fin de eliminar estas proteínas [262, 283] se utilizó el Kit comercial ProteoExtract™ Albumin/IgG Removal Kit (Merck Darmstadt, Germany). Este sistema se basa en una columna de afinidad que combina una resina específica de albúmina con una proteína A polimérica inmovilizada con afinidad a IgGs de forma que es capaz de retener en torno al 80% del total de albúmina e IgGs de la muestra que fluyen a través de ella por gravedad. Para ello, 60 µl de plasma se diluyeron en 540 µl de tampón de unión (Merck), mezcla que se añadió a la columna de cromatografía previamente equilibrada con 800 µl del mismo tampón. Tras obtener la muestra ``deplecionada``, la columna se lavó con dos volúmenes de 600 µl de tampón de unión y el volumen obtenido se mezcló con el plasma previamente ``deplecionado``. Al final se obtuvo un volumen de muestra de 1800 µl diluida en tampón, la cual se congeló a -80°C hasta su uso.

### **7.2. DEPLECIÓN DE 20 PROTEÍNAS MAYORITARIAS**

Con el fin de eliminar una mayor cantidad de proteínas plasmáticas y poder estudiar la fracción de proteínas minoritarias resultante, se utilizó el Kit ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit (PROT20) (SIGMA-ALDRICH). Este Kit está diseñado para eliminar hasta 20 proteínas del plasma humano, lo cual supone entre el 97-99% del total de las proteínas plasmáticas, obteniéndose para el estudio una fracción que supone entre el 1-3% de las proteínas restantes. Esto nos permite aumentar, entre 20 y 50 veces más, la visualización de un gran número de proteínas minoritarias. El Kit se basa en una columna de cromatografía que contiene una mezcla de anticuerpos policlonales con especificidad hacia 20 proteínas plasmáticas (figura M\_1) que se encuentran en

cantidades proporcionales a la concentración de dichas proteínas en plasma. Para llevar a cabo el protocolo, 40  $\mu$ l de plasma se diluyeron en 460  $\mu$ l de tampón de equilibrado (SIGMA-ALDRICH). Esta mezcla se realizó utilizando para ello Ependorf que contenían filtros con tamaño de poro de 0,2  $\mu$ m mediante una centrifugación a 1500 x g durante 30-60 segundos, con el fin de eliminar partículas que pudiesen obstruir la columna del sistema cromatográfico. Para la eliminación de las 20 proteínas mayoritarias de la fracción plasmática, 100  $\mu$ l del volumen diluido y filtrado se añadieron a la columna previamente equilibrada con 4 ml de tampón de equilibrado y se dejó incubar durante 15-20 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la columna durante 30-60 segundos a 1500 x g obteniéndose así una fracción de plasma "deplecionado" que se mantuvo a 4°C. Para eliminar los restos de proteínas unidas a la columna, se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de equilibrado y se centrifugó de nuevo durante 30-60 segundos a 1500 x g. Se repitió una vez más este último paso. El volumen final obtenido (aproximadamente 200  $\mu$ l) se guardó junto con el volumen "deplecionado" a 4°C. La mayoría de las proteínas no unidas (> 95%) estarán en este *pool* de plasma final (300 $\mu$ L). Tras este proceso, se eluyeron las proteínas retenidas a la columna para poder ser utilizada de nuevo en siguientes depleciones. Para ello, se añadieron lentamente 2 ml de solución de elución (SIGMA-ALDRICH) a través de la columna con ayuda de una jeringuilla especial proporcionada por el Kit. Este paso debería tardar ~1 min. Tras la elución de las proteínas retenidas en la columna, ésta debía ser re-equilibrada rápidamente para reducir el tiempo de exposición de la resina a condiciones ácidas. Para ello, se añadieron de nuevo 4 ml de tampón de equilibrado como se ha indicado en pasos previos. Para obtener una mayor cantidad de muestra de plasma "deplecionada", se repitió de nuevo el protocolo hasta un total de 5 veces, obteniéndose un volumen final de 1500  $\mu$ l que fue cuantificado y precipitado rápidamente.



**Figura M\_1.** Las 10 proteínas más abundantes representan aproximadamente el 90% del total de proteínas en plasma y las 22 proteínas más abundantes representan aproximadamente el 99% del total de proteínas plasmáticas. El Kit Proteo Prep 20 elimina 20 de las proteínas más abundantes mostradas en la tabla. Estas proteínas representan aproximadamente el 97% del total de las proteínas del plasma.

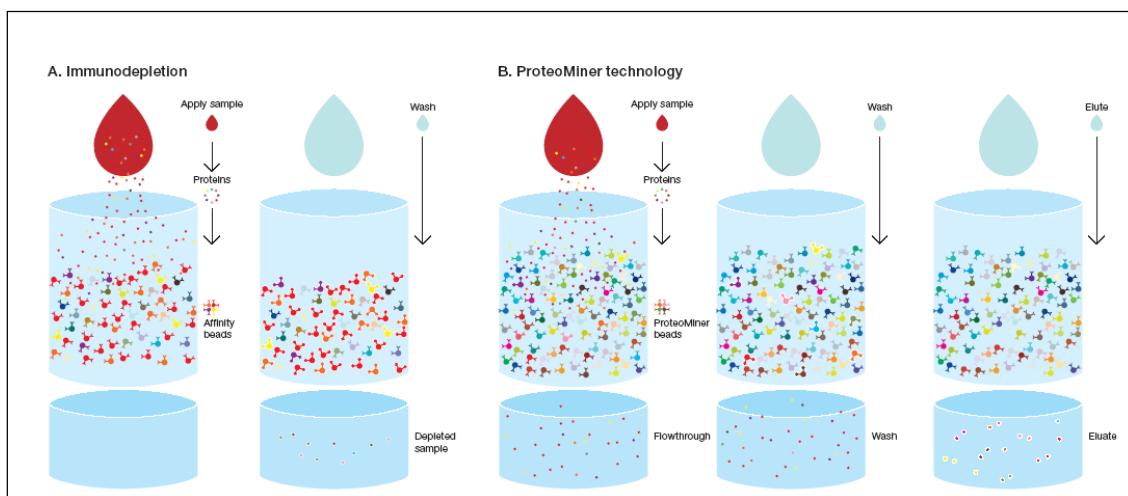
### 7.3. NORMALIZACIÓN DEL RANGO DINÁMICO DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Debido a que el uso de columnas de cromatografía que utilizan sistemas con anticuerpos u otro tipo de moléculas con afinidad pueden no ser eficientes al 100%, ya que la depleción de ciertas proteínas supone en un tanto por ciento reducido la depleción de proteínas no deseadas por uniones inespecíficas, hemos utilizado otra metodología que no conlleva la eliminación de proteínas plasmáticas sino que supone la normalización del rango dinámico de concentraciones en una muestra biológica compleja como es el plasma. Para ello hemos usado el Kit comercial ProteoMiner™ Protein Enrichment Kit (Bio-Rad), el cual utiliza la tecnología de una biblioteca combinatoria de hexapéptidos unidos a una columna de cromatografía (figura M\_2). Esta técnica permite enriquecer el medio aumentando las proteínas que se encuentran en menor cantidad y disminuyendo a su vez las que se encuentran en mayor cantidad, de

manera que el rango dinámico de concentraciones se ve reducido. Para ello, 1 ml de plasma (>50mg/ml) fue centrifugado a 13400 RPM durante 10 minutos a 4°C para eliminar los restos de precipitados. El sobrenadante obtenido se añadió a la columna de ``enriquecimiento``, la cual debió ser preparada previamente para su uso, y se incubó durante 2 horas a T<sup>a</sup> ambiente invirtiéndose constantemente. Para la preparación de la columna se quitaron los tapones (de arriba y abajo) de esta y se centrifugó a 3800 RPM durante 2 minutos. Una vez descartado el material se puso de nuevo el tapón de abajo y se le añadió 1 ml de H<sub>2</sub>O calidad HPLC, se tapó por arriba y se rotó durante 5 minutos a T<sup>a</sup> ambiente. Finalizado este tiempo se quitaron ambos tapones y se centrifugó a 3800 RPM durante 2 minutos. Se descartó el material y se centrifugó de nuevo a 3800 RPM durante 1 minuto. Se volvió a repetir todo el proceso con 1 ml de tampón de lavado (NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7.4) en lugar de agua. Tras descartar el volumen mediante centrifugación, se colocó en la columna el tapón de abajo y se le añadió la muestra de plasma para la incubación. Finalizado el tiempo de incubación se centrifugó la columna a 3800 RPM durante 2 minutos, se descartó el material y se centrifugó de nuevo a 3800 RPM durante 1 minuto. Se colocó el tapón inferior y se le añadió a la columna 1ml de tampón de lavado. Esta se tapó por arriba y se rotó durante 5 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.

Finalizado este tiempo, se quitaron de nuevo los tapones y la columna se centrifugó a 3800 RPM, se descartó el material y se centrifugó de nuevo a 3800 RPM durante 1 minuto. Para la elución de las proteínas retenidas en la columna se le añadió a ésta 1 ml de H<sub>2</sub>O calidad HPLC y se rotó durante 1 minuto. Se centrifugó de nuevo a 3800 RPM 2 minutos, se descartó material y se centrifugó a 3800 RPM durante 1 minuto. Tras descartar el volumen se ajustó bien el tapón de abajo a la columna y se le añadió 100 µl de agente de elución (8M urea, 2% CHAPS liofilizados) previamente rehidratado con 610 µl de agente de rehidratación (5% de ácido acético). Tras ponerle el tapón de arriba a la columna se mezcló suavemente durante 5 segundos con ayuda de un agitador y se incubó durante 15 minutos a T<sup>a</sup> ambiente mezclando ligeramente el contenido cada 3 minutos aproximadamente. Transcurrida la incubación se quitaron los tapones de la columna y se centrifugó la muestra a 3800 RPM durante 2 minutos. Este volumen contenía las proteínas de interés. Tras repetir de nuevo 2 veces más la elución de proteínas, al final obtuvimos un volumen de muestra final de 300 µl que guardamos a -80°C hasta su uso.





**Figura M\_2.** a) Imagen representativa que muestra la depleción de proteínas plasmáticas mediante inmunodepleción o b) el uso del Kit Proteo Miner, observándose que la fracción eluída con este Kit contiene mayor diversidad de proteínas.

## 8. DELIPIDACIÓN, DESALACIÓN DEL PLASMA Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

### 8.1. DELIPIDACIÓN Y DESALACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLASMA

Para esta limpieza se utilizó un protocolo [284] que conlleva la combinación de un volumen de plasma con cuatro volúmenes de metanol. Tras mezclar bien el combinado se añadió un volumen de cloroformo. De nuevo se agitó la solución y se añadieron tres volúmenes de agua (grado HPLC). Esta mezcla fue sometida a centrifugación a 3500 RPM durante 5 minutos a 4°C, para eliminar posteriormente la fase superior. Al resto de solución se añadieron tres volúmenes de metanol, la mezcla resultante se agitó vigorosamente y se centrifugó de nuevo. El nuevo sobrenadante así obtenido fue descartado rápidamente y el pellet, que contenía las proteínas plasmáticas precipitadas, se dejó secar durante 5 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se congeló a -80°C hasta su uso.

## 8.2. LIMPIEZA Y PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

En algunos casos se utilizó para la limpieza y precipitación de las muestras de plasma el Kit comercial ReadyPrep™ 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad). Este Kit facilita la preparación de las muestras para un posterior isoelectroenfoque (IEF) y separación en geles bidimensionales (2-D). Para ello, se transfirieron 500 µg de proteína contenidos en 100 µl de volumen final a tubos *Eppendorf* a los que se les añadió 300 µl del Agente 1 (Bio-Rad). Tras mezclar y agitar vigorosamente la mezcla se dejó incubar 15 minutos en hielo (4°C). Pasado este tiempo se añadieron 300 µl del Agente 2, se agitó vigorosamente y se centrifugó el tubo a 13000 RPM durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se volvió a centrifugar unos 30 segundos para eliminar el líquido residual. Tras esto se mezcló el precipitado con 40 µl de Agente de lavado 1 y se centrifugó a 13000 RPM durante 5 minutos. Una vez eliminado el sobrenadante se añadió 25 µl de agua ultra pura a los tubos y se agitó durante 10-20 segundos. Para la precipitación de la muestra se añadió a esta 1 ml de Agente de lavado 2 (pre-congelado a -20°C) más 5 µl de agente de lavado aditivo 2 y la mezcla se incubó durante 30 minutos a -20°C agitando cada 10 minutos. Par obtener la proteína precipitada se centrifugó el tubo a 13000 RPM durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se dejó secar a Tª ambiente no más de 5 minutos y se resuspendió en un tampón adecuado para posteriores pasos.

## 9. ELECTROFORÉISIS BIDIMENSIONAL

Una vez pre-tratadas las muestras de plasma para obtener una mezcla de proteínas menos compleja (apartado 7), delipidadas, desaladas y precipitadas las mismas (apartado 8) la muestra resultante es utilizada para la realización de electroforesis bidimensional (2-DE). Esta técnica es capaz de separar una mezcla compleja de proteínas utilizando dos tipos de electroforesis sucesivas sobre la misma muestra [197, 198]. Para esto, en primer lugar se realiza una primera dimensión o Isoelectroenfoque (IEE) que consiste en la separación de las proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI) en un gradiente de pH inmovilizado (IPG). Posteriormente se realiza una segunda dimensión que consiste en la separación de las proteínas en geles de poliacrilamida en

presencia de SDS (SDS-PAGE) atendiendo a su masa molecular. De esta forma se obtiene al final un mapa de puntos (*spots*) que representan las proteínas distribuidas en dos dimensiones.

### 9.1. ISOELECTROENFOQUE (IEF)

El precipitado de proteínas de plasma (entre 200 y 700  $\mu\text{g}$ ) fue resuspendido en tampón de solubilización que estaba compuesto en la mayoría de los casos por urea 7M, tiourea 2M, 4% p/v de CHAPS, 1,2% v/v agente reductor (‘‘DeStreak Reagent’’ GE Healthcare) ó 50 mM DTT y 0,2% v/v anfólitos (‘‘IPG bufer’’ pH 3-10 ó 4-7, Bio-Rad y GE Healthcare respectivamente). Una vez solubilizadas las proteínas se cuantificó de nuevo la muestra mediante el método de Bradford [282] para asegurarnos de que la cantidad que cargábamos en la IPG era la correcta y se añadió al volumen que contenía la cantidad de proteína deseada 0,0002% de azul de bromofenol para la visualización de la muestra durante el isoelectroenfoque. Dependiendo del tamaño de la IPG (7, 11 o 18 cm) el volumen utilizado para la rehidratación es diferente. Así, para una tira de 7 cm se utilizó un volumen de rehidratación de 125  $\mu\text{l}$ , para una tira de 11 cm el volumen fue de 185  $\mu\text{l}$  y para una de 18 cm el volumen utilizado fue de 300  $\mu\text{l}$ . La cantidad de proteína que se utilizó para la 1<sup>o</sup> dimensión también varió en función del tamaño de la IPG y el método de tinción posteriormente utilizado para la visualización de las proteínas sobre los geles bidimensionales (apartado 10). El volumen de muestra solubilizada en cada caso se usó para la rehidratación de la IPG (ReadyStrip IPG Strips, Hercules, CA, USA en el caso de tiras de 7 y 11 cm, e Immobiline DryStrip, GE Healthcare para tiras de 18 cm de longitud) durante aproximadamente 15 horas a T<sup>a</sup> ambiente sobre cubetas especiales (Ettan IPGphor ceramic strip holders, GE Healthcare) y en presencia de aceite mineral (Mineral Oil Biotechnology Grade. BIO-RAD). Tras la rehidratación pasiva, se eliminó el exceso de aceite y se enfocaron las tiras utilizando un sistema de enfoque eléctrico (Protean IEF Cell. Bio-Rad ó ‘‘IPGGphor’’ GE Healthcare). El programa de enfoque se llevó a cabo a 20°C en todos los casos pero fue diferente en función de la longitud de la tira y el gradiente de pH utilizado, de manera que, para IPGs de 7cm y pH 4-7 ó 3-10 la separación supuso un paso de 250 V durante 20 min., una subida rápida de voltaje hasta 4000 V durante 2 h, y un paso final de 10000 Vh

hasta su total enfoque. En el caso de IPGs de 11cm y pH 4-7 ó 3-10 la separación comenzó con un paso de 500 V durante 1 hora, una subida rápida de voltaje de 1000 V durante 1 hora, una subida lineal de 8000 V durante 30 minutos y un paso final de 35000 Vh hasta su total enfoque. Para IPGs de 18cm y pH 4-7 ó 3-10, la separación supuso un paso de 500 V durante 1 hora, una subida rápida de 1000 V durante 1 hora, una subida rápida de 8000 V durante 1 hora, un voltaje fijo de 8000 V durante 1 hora y un paso final hasta alcanzar los 10000 V durante 3 horas.

## **9.2. EQUILIBRADO DE LAS IPGs**

Una vez terminado el isoelectroenfoco es necesario el equilibrado de las IPGs antes de la separación de las proteínas en una segunda dimensión mediante SDS-PAGE. Para ello las tiras fueron introducidas durante 10-15 minutos en una solución de equilibrado (Tris-HCl 50 mM, pH 8.8, urea 6 M, glycerol al 20%, SDS al 2%) que contenía 20 mg/ml de DTT. Posteriormente, las tiras se introdujeron durante otros 10-15 minutos en la misma solución, pero conteniendo 25 mg/ml de iodoacetamida (IAA). Ambos pasos se llevaron a cabo con agitación.

## **9.3. ELECTROFORÉSIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

Tras ser equilibradas las tiras se pasó a realizar la segunda dimensión en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Para elaborar los geles se prepararon soluciones a partir de una disolución concentrada de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 40% (p/v) y agua destilada para obtener la concentración deseada en cada caso. A esta mezcla se le añadió *Sepparating Buffer 2x* (18.71 g de Tris, 0.4 g de SDS ajustando pH a 8.8), 50 µl de persulfato amónico (APS) al 10% y 10 µl de TEMED (para 5 ml finales). Obtenidos los geles se colocó la IPG ya equilibrada encima de éstos, evitando que no se formaran burbujas en la unión entre ambos que pudieran afectar a la entrada de las proteínas de la tira al gel y ambos se sellaron con agarosa 0.5% (p/v). Para la electroforesis se utilizó un tampón de electrodos que contenía Tris 0,1 M, Glicina 0,96 M y SDS 0,5%. Se utilizaron diferentes sistemas electroforéticos en función del tamaño

de los geles, de modo que, para geles de 9 x 7 cm se usó una "MINI-PROTEAN 3 Cell" (Bio-Rad), para geles de 13.3 x 8.7 cm se usó una "Criterion<sup>TM</sup> Cell" (Bio-Rad) (en ambos casos la electroforesis tuvo lugar a un voltaje constante de 200 V) y en el caso de geles de 20 x 20 cm se utilizó un sistema vertical multigeles "Dodeca Cell System" (Bio-Rad) y la electroforesis tuvo lugar durante toda la noche a 12°C y consistió en un paso previo de 30V durante 45 minutos y uno posterior de 70V hasta su finalización.

## **10. TINCIÓN DE GELES**

Una vez finalizada la separación electroforética, los geles de poliacrilamida fueron fijados y teñidos para la visualización de las proteínas. Todos estos pasos se realizaron a T<sup>a</sup> ambiente y manteniendo los geles sumergidos en todo momento en la solución, en recipientes de tamaño y material adecuados y en agitación a lo largo de todo el proceso sobre un agitador orbital. En algunos casos se empleó una tinción con azul de Coomasie que es más rápida y compatible con la espectrometría de masas y en otros, la tinción fluorescente comercial SYPRO Ruby que es mucho más sensible.

### **10.1. COOMASIE COLOIDAL BRILLIANT BLUE G250**

Terminada la electroforesis los geles fueron fijados en 500 ml de una solución de 40% v/v metanol, 10% v/v ácido acético a T<sup>a</sup> ambiente y agitación durante 1 hora. A continuación, se llevo a cabo el procedimiento de tinción para lo cual los geles se sumergieron en 400 ml de solución Coomasie Blue G250 durante 20 horas. La solución de tinción se preparó a partir de 80g de sulfato amónico disueltos en 22.5ml de 85% v/v ácido fosfórico, 0.1% p/v Coomasie Blue G-250 y 20% v/v metanol, completando la mezcla con 700mL de agua destilada hasta conseguir un volumen final de 1L. Tras esto, se lavaron los geles durante 1-3 minutos con 500 ml de una solución que contenía 0.1 M Tris- H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5, 1 minuto con 500 ml de 25% v/v metanol y 24 horas con 500 ml de sulfato amónico al 20% v/v. Este proceso de tinción fue repetido de nuevo para obtener un mayor contraste y finalmente los geles se fijaron con 500 ml de sulfato amónico al 20%.

## **10.2. COOMASIE COLOIDAL BIO-SAFE-COOMASIE (BIO-RAD)**

Para realizar la tinción con Coomassie coloidal comercial (Bio-Safe Coomassie, Bio-Rad), previamente se fijaron los geles con 500 ml de una solución 40% v/v metanol, 10% v/v ácido acético a T<sup>a</sup> ambiente y agitación durante 1 hora. A continuación, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 500 ml de agua bidestilada y se teñieron con la solución comercial Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) durante 1 hora. Trascurrido este tiempo, los geles se destiñeron con 500 ml de agua al menos durante 2 horas hasta conseguir el contraste adecuado.

## **10.3. SYPRO RUBY PROTEIN STAINS (BIO-RAD)**

Para la detección de un mayor número de proteínas en los geles bidimensionales se usó la tinción comercial fluorescente SYPRO Ruby Protein Stains (Bio-Rad). Para ello, los geles fueron fijados previamente con 500 ml de 10% v/v de metanol, 7% v/v de ácido acético durante 30 minutos. A continuación, se incubaron en oscuridad y agitación durante 24 horas con 500 ml de tinción SYPRO Ruby Protein Stains (Bio-Rad) y se destiñeron con 500 ml de una solución que contenía 10% v/v metanol, 7% v/v de ácido acético durante 1 hora. Tras esto se lavaron los geles con 500 ml de agua bidestilada hasta el día siguiente para eliminar la tinción de fondo y se guardaron en 400 ml de 3% v/v de ácido acético. Todos los pasos se llevaron a cabo preservando los geles de la luz.

## **11. CAPTURA DE IMÁGENES Y ANÁLISIS**

Una vez teñidos los geles, las imágenes deben ser digitalizadas y guardadas en archivos de imagen informáticos para poder ser analizadas. Para ello se utilizó en el caso de los geles teñidos con Coomassie Blue un densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad), y para los que fueron teñidos con tinción fluorescente ,SYPRO Ruby (Bio-Rad), un escáner especial capaz de detectar fluorescencia como es el Molecular Imager<sup>TM</sup> Fx (Bio-Rad). Finalizada la adquisición de las imágenes, los geles empleados se almacenaron en bolsas de plástico con agua bidestilada a 4° grados hasta su uso.

El análisis de imagen se llevó a cabo con el software de análisis 2-D PDQuest 8.0 (Bio-Rad). Las imágenes importadas a este programa se depuran y optimizan mediante un filtrado previo al análisis (empleando la opción “sal y pimienta” gaussiana de 9 x 9). A continuación, se crea un archivo “experimento”, en el que el programa incluye todos los geles que se vayan a comparar para detectar a continuación las manchas proteicas existentes en cada gel y emparejarlas con las correspondientes manchas en el resto de los geles. Este proceso requiere una revisión manual pormenorizada y, en ocasiones, la edición y corrección de alguna de las manchas o de los emparejamientos detectados automáticamente. A continuación, el programa realiza el análisis densitométrico de las manchas proteicas, lo que permite obtener medidas del nivel de expresión de cada una de ellas. Para compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de la tinción en los diversos niveles de concentración en cada gel, se aplica la opción “Local Regression Model”. Este método calcula una curva en el diagrama de dispersión que minimiza la distancia a todos sus puntos y que sirve para calcular el factor de normalización para cada mancha. Por último, se establecen las “réplicas de grupo” (indicando al programa qué geles pertenecen a un mismo grupo de análisis) y se realiza un análisis cuantitativo y otro estadístico mediante una prueba T de Student para comparar la expresión diferencial de las manchas entre los diferentes grupos. Sólo se consideran significativas aquellas manchas con valores  $p < 0.05$  y con unos niveles de expresión alterados en más del doble o menos de la mitad.

## **12. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MALDI TOF / TOF)**

Los *spots* con cambios estadísticamente significativos fueron extraídos del gel, transferidos a tubos *Eppendorf* con agua (calidad HPLC) y sometidos a un protocolo para su digestión con tripsina y posterior análisis mediante espectrometría de masas mediante el análisis con MALDI TOF por huella peptídica, o bien MALDI TOF/TOF, por secuenciación peptídica, utilizando el software MASCOT (Matrix Science, UK) como motor de búsqueda sobre la base de datos MSDB. Todo este proceso se realizó en la Unidad de Proteómica del SCAI de la Universidad de Córdoba (UCO) que pertenece

al Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed. (España).

### **12.1. PICADO Y DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS**

Las proteínas de interés fueron extraídas automáticamente de los geles bidimensionales con ayuda de una estación ProPic Investigator™ (Genomic Solutions). Los fragmentos de gel resultantes se digirieron con tripsina según el protocolo de Schevchenko *et al.* (1996), con pequeñas modificaciones, también de manera automática en una estación ProGest (Genomic Solutions) con las siguientes condiciones: dos pasos de destinción de 30 minutos con bicarbonato amónico 200 mM / acetonitrilo al 40%; dos rondas de lavado con bicarbonato amónico 25 mM durante 5 minutos y bicarbonato amónico 25 mM / acetonitrilo al 50% durante 15 minutos, respectivamente; deshidratación con acetonitrilo al 100% durante 5 minutos y secado de la muestra; hidratación con 20µl de tripsina porcina (Promega, Madison WI) a una concentración de 12.5 ng/µl preparada en bicarbonato amónico 25 mM durante 10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente, eliminación del volumen sobrante y adición de 10µl de bicarbonato amónico 25 mM /acetonitrilo 9% para continuar la digestión a 37°C durante 12 horas. La digestión se detuvo añadiendo a cada muestra 10µl de una solución de TFA al 0.5% en agua.

### **12.2. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE MALDI-TOF/TOF**

Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina, se purificaron de manera automática en una estación ProMS (Genomic Solutions), mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose directamente con una solución de matriz (3 mg/ml de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidoxicinámico en 70% acetonitrilo/0.1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1µl. Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizaron en el rango m/z de 800 a 4000 Da mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica en un espectrómetro 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) en modo automático. Se realizó calibración interna de los espectros utilizando las relaciones masa/carga (m/z) de los péptidos



resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ( $M+H^+=842.509$ ,  $M+H^+=2211.104$ ), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las  $m/z$  de  $\pm 20$  ppm. De cada muestra se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las tres  $m/z$  más intensas.

La identificación de proteínas se realizó combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS usando MASCOT (Matrix Science, UK) como motor de búsqueda sobre la base de datos MSDB o NCBIInr, limitando la categoría taxonómica a Mamíferos, con carbamidometilación completa de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina. El error máximo permitido en la búsqueda fue de 100 ppm y el número máximo de errores en el corte de la proteasa fue uno.

### **13. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS**

#### **13.1. ELECTROFORÉISIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

Los cambios de expresión mostrados en algunas de las proteínas tras realizar los análisis de imagen sobre los geles bidimensionales, fueron validados mediante *Western Blot*. Para ello, se realizaron electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes elaborando minigeles de 9 x 7 cm usando el sistema "mini-PROTEAN3" (Bio-Rad). Estos geles consisten en una "fase separadora", cuya concentración en poliacrilamida varía en función de la masa molecular de la proteína de interés (entre el 7.5 y el 12%) y una "fase concentradora", cuya concentración de poliacrilamida es siempre del 4%. Para elaborar la fase separadora, se mezcló una dilución concentrada de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 40% (p/v) con Tris-HCl 0,75 M pH 8,8, SDS 0,2% (p/v) y agua bidestilada para obtener la concentración de acrilamida deseada en cada caso. En el caso de la fase concentradora, se diluyó la solución concentrada de poliacrilamida con Tris-HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 0,2% (p/v) y agua bidestilada para obtener una concentración final del 4%. Además, en cada fase se añadió 10  $\mu$ L /mL de APS al 10% (p/v) y 0.5  $\mu$ L/mL de TEMED como catalizadores de la reacción de polimerización. Una vez polimerizadas ambas fases se aplicaron las muestras en los pocillos del gel, para lo cual

fue cuantificada previamente la concentración de proteína según el método de Bradford [282]. La cantidad de proteína deseada se diluyó en tampón de carga SDS/DTT 5X que contenía Tris-HCl 0,3 M pH 6,8, SDS 7.5 % (p/v), sacarosa 50% (v/v), EDTA 2mM, ditioneitol 0,1 M y azul de bromofenol 0,5 mg/ml, y la mezcla se calentó durante 5 minutos a 100°C. Las electroforesis se llevaron a cabo aplicando un voltaje constante de 200 V y 150 mA durante un tiempo aproximado de 45 minutos.

### **13.2. ELECTROTRANSFERENCIA (WESTERN BLOT)**

Terminada la electroforesis, los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Biotrace™ NT, Pall Corporation) mediante transferencia semiseca (Bio-Rad) durante 45 minutos a 25V, utilizando para ello tampón de transferencia que contenía glicina 14,4 g/l, Tris 25Mm, SDS 0,02% y metanol 20% (v/v). Para la visualización de la proteína total en cada una de las carreras, la membrana se tiñó durante 5 minutos con Rojo Ponceau's que contenía 0,1% del colorante Rojo Ponceau's (Analema) en ácido acético al 0,1% (v/v). El exceso de colorante fue eliminado con lavados de una solución de desteñido para membranas de nitrocelulosa que contenía ácido acético al 1% (v/v) diluido en agua desionizada. Tras esto se tomó una imagen digitalizada de cada uno de los filtros con el densitómetro GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad.

### **13.3. INMUNOTINCIÓN Y REVELADO CON ECL-PLUS**

Para llevar a cabo la inmunodetección, las proteínas inmovilizadas en los filtros de nitrocelulosa son bloqueadas durante 6 horas a T<sup>a</sup> ambiente y agitación con una solución de leche en polvo desnatada 5% (p/v) disuelta en TTBSL (Tris-HCl 50mM pH 7,6, NaCl 0,85% (p/v) y Tween 20 0,05% (v/v)). Tras el bloqueo, los filtros se incubaron durante toda la noche a 4°C y agitación en la solución anterior (tampón TTBSL) con el anticuerpo de interés diluido a la concentración adecuada (determinada empíricamente) para cada ensayo. Tras lavarse los filtros 3 veces durante 5 minutos con tampón de lavado TTBS (la misma composición que TTBSL pero sin Tween 20), estos

se incubaron durante 1 hora a T<sup>a</sup> ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con la enzima peroxidasa, diluido en tampón TTBSL. Finalmente, se lavaron los filtros 3 veces durante 5 minutos con TTBS de nuevo y 1 vez con tampón TBS (Tris-HCl 50Mm, pH 7,6 y NaCl 0,85% (p/v)) y se procedió al revelado utilizando ECL-Plus. En alguna ocasión, tras el revelado de los filtros de nitrocelulosa, se eliminaron los anticuerpos unidos a esta para poder detectar de nuevo proteínas de interés mediante la unión de otros anticuerpos. Para ello, las membranas se incubaron 2 veces durante 15 minutos a 70°C y agitación con un tampón que contenía SDS 2% (p/v) y Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7. A continuación, se lavaron rápidamente con agua para retirar los restos de tampón y se llevó a cabo el mismo proceso explicado en este apartado para la inmunotinción.

### 13.4. ANÁLISIS DE IMAGEN

Las imágenes procedentes del revelado fueron captadas de nuevo usando un densitómetro calibrado GS-800 (Bio-Rad) y la cuantificación de las bandas de interés se realizaron con el software Quantity One (Bio-Rad). Los resultados fueron expresados como densidad óptica (OD) x mm<sup>2</sup>.

En la tabla M\_2 se detallan las proteínas validadas, los anticuerpos utilizados para ello y las diluciones empleados para cada ensayo.

PROTEÍNA	MUESTRA ESTUDIADA	ANTICUERPO		CONDICIONES INMUNODETECCIÓN	
		ESPECIE	MARCA	1 <sup>ario</sup>	2 <sup>ario</sup>
APOLIPOPROTEÍNA E	<i>Rattus Norvegicus</i>	Cabra	Chemicon International Inc.	1:1000	Anti-Goat IgG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens</i>	Cabra		1:1000	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
APOLIPOPROTEÍNA A1	<i>Rattus Norvegicus</i>	Conejo	Santa Cruz Biotech	1:200	Anti rabbit IgG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens</i>	Conejo		1:200	Anti rabbit IgG (SIGMA) 1:2000
APOLIPOPROTEÍNA J (CLUSTERINA)	<i>Rattus Norvegicus</i>	Cabra	US Biological	1:7500	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens</i>	Cabra		1:10000	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens (HepG2)</i>	Cabra		1:7500	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
APOLIPOPROTEÍNA AIV	<i>Rattus Norvegicus</i>	Cabra	Santa Cruz Biotech	1:200	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens</i>	Cabra		1:200	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
FIBRINÓGENO	<i>Rattus Norvegicus</i>	Cabra	Santa Cruz Biotech	1:200	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens</i>	Cabra		1:200	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
FETUÍNA	<i>Rattus Norvegicus</i>	Cabra	Santa Cruz Biotech	1:200	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000
	<i>Homo Sapiens</i>	Cabra		1:200	Anti-Goat IGG (SIGMA) 1:2000

**Tabla M\_2.** Anticuerpos policlonales utilizados para los diferentes experimentos de inmunodetección (*Western Blot*), donde se indica, la muestra sobre la que se ha realizado el estudio, la especie del

organismo donde se ha desarrollado el anticuerpo primario, la marca de la casa comercial donde se han adquirido y las diluciones empleadas de los anticuerpos primarios y secundarios.

## **14. EXPERIMENTOS IN VITRO**

### **14.1. LINEA CELULAR Y CULTIVOS**

Para la realización de los experimentos *in vitro* se ha empleado la línea celular de carcinoma de hepatoma humano HepG2.

Tanto para el mantenimiento como para la realización de experimentos, las células fueron cultivadas a 37°C en medio RPMI 1640 (BioWhittaker) suplementado con suero fetal bobino al 10% (Linus), penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (100 mg/ml) y anfotericina B (2,5 mg/ml) en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron sembradas en placas de 50 cm<sup>2</sup> (Corning) a 20.000 células viables/cm<sup>2</sup> y cultivadas durante 24 horas, 48 horas y 7 días dependiendo de los experimentos llevados a cabo. La viabilidad celular se estudio a través del método de exclusión de azul tripán. El fundamento de este análisis radica en que aquellas células vivas, que conservan la integridad de su membrana plasmática, expulsan activamente el colorante, mientras que las células muertas son totalmente permeables quedando incorporado en su citoplasma. Para la determinación de la viabilidad, una alícuota procedente del cultivo celular se mezcló a partes iguales con solución de azul tripán (SIGMA). Posteriormente, se recogió una muestra que fue depositada en un hemocitómetro y con la ayuda de un microscopio invertido Nikon TMS se pudieron observar las células viables incoloras y las no viables que quedaron teñidas de color azul.

### **14.2. TRATAMIENTOS CON COENZIMA CoQ<sub>10</sub>**

Se llevaron a cabo tratamientos sobre las células en cultivo con Coenzima Q<sub>10</sub> a diferentes concentraciones y durante diferentes períodos de tiempo, bajo las condiciones que se indican en el apartado anterior.

Las células se han tratado con concentraciones de CoQ<sub>10</sub> de 1,5 a 15 µM durante un periodo de 1 a 7 días. Esta concentración se calculó a partir de los valores obtenidos tras las medidas del antioxidante realizadas sobre las muestras de plasma de los sujetos a los cuales se les administró una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados omega 9 suplementada con CoQ<sub>10</sub>.

En algunos casos, las células fueron tratadas durante un período de 5 días con CoQ<sub>10</sub> 7.5 µM, retirándoles el antioxidante durante las últimas 48 horas a algunos cultivos.

Tras los tratamientos, se recogió un volumen mínimo de 1 ml de medio, el cual se utilizó en un tratamiento de normalización del rango dinámico utilizando el Kit comercial Proteo Miner™ Protein Enrichment (Bio-Rad) como se indica en el apartado 7.3, con el fin de concentrar el contenido del medio en un volumen menor y poder así estudiar los productos de secreción de las células. Para ello, se cuantificó previamente la cantidad de proteína que contenía la muestra mediante el Método de Bradford [282] y se determinaron los niveles de secreción de Apolipoproteína J (Clusterina) mediante *Western Blot* como se indica en el apartado 13, utilizando para el ensayo 100µg de proteína.

## 15. MÉTODOS DE OBTENCIÓN BIBLIOGRÁFICA

Para la revisión bibliográfica se ha utilizado el servicio de información informatizado PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>). Se empleó a su vez el programa *EndNOTES X* para obtener y editar la bibliografía.

## **Resultados y Discusión**



## CAPÍTULO I: ESTUDIO EN RATAS WISTAR

### 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Como se indica en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, el grupo de ratas fue alimentado a lo largo de toda su vida con diferentes dietas experimentales, tiempo durante el cual se obtuvieron muestras de plasma tras la decapitación del animal, a los 6 y 24 meses de edad. Obtuvimos así los diferentes grupos experimentales que se muestran en la tabla R\_1. Para realizar el estudio comparativo de geles, las muestras fueron agrupadas según la edad (6 y 24 meses) y la dieta ingerida (MUFA<sub>n-9</sub>, PUFA<sub>n-6</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>) con el fin de minimizar las posibles variaciones que fueran debidas a diferencias entre animales más que a las ocasionadas por la dieta. Para ello, se tuvo en cuenta la cantidad de proteína en cada una de las muestras individuales de plasma (n=8) tomando de cada una de ellas la misma proporción para elaborar fracciones representativas (*pools*).

MUFA 6M	MUFA 24M	PUFA 6M	PUFA 24M	PUFA+Q 6M	PUFA+Q 24M
1VA	1VD	1GA	1GD	1GQA	1GQD
2VA	2VD	2GA	2GD	2GQA	2GQD
3VA	3VD	3GA	3GD	3GQA	3GQD
4VA	4VD	4GA	4GD	4GQA	4GQD
5VA	5VD	5GA	5GD	5GQA	5GQD
6VA	6VD	6GA	6GD	6GQA	6GQD
7VA	7VD	7GA	7GD	7GQA	7GQD
8VA	8VD	8GA	8GD	8GQA	8GQD

**Tabla R\_1.** En la tabla se muestran las fracciones obtenidas para el estudio en cada una de las ratas (n=8), donde V y G representan la dieta ingerida (aceite de oliva y aceite de girasol, respectivamente) y A y D la edad de la rata (6 y 24 meses de edad).

Para cada uno de estos *pools* se crearon entre tres y cuatro réplicas que fueron procesadas de forma independiente y paralela, manteniendo en todo momento las mismas condiciones en el método para evitar con ello las diferencias interexperimentales.

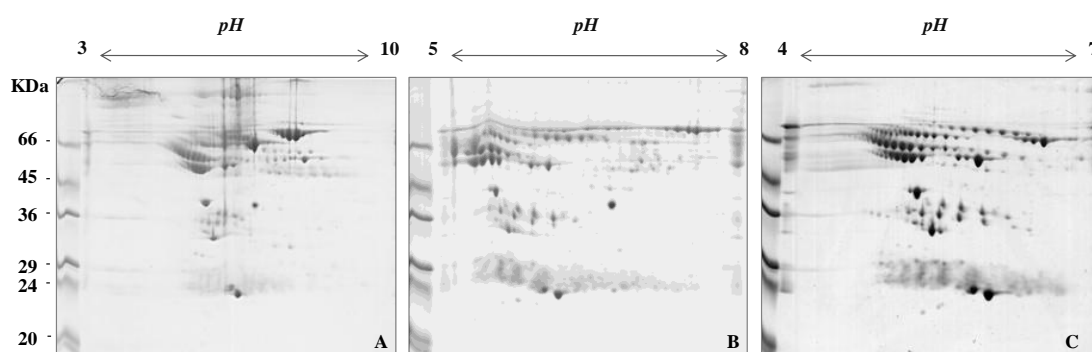


## 2. DEPLECIÓN DE PROTEÍNAS MAYORITARIAS Y 2-DE

Debido a que el plasma es una muestra biológica con un gran rango dinámico de concentración que se separa en unos  $10^9$  órdenes de magnitud [262], es necesario aplicar alguna técnica para obtener fracciones menos complejas de la muestra. En el caso concreto de la población de ratas, las muestras fueron procesadas para eliminar las primeras proteínas mayoritarias del plasma (albúmina e inmunoglobulinas), las cuales enmascaran al resto de proteínas plasmáticas cuando son separadas en geles bidimensionales. Para ello, utilizamos el Kit comercial ProteoExtract™ Albumin /IgG Removal Kit (apartado 7.1 de Materiales y métodos), que aplica columnas con resinas específicas afines a albúmina e inmunoglobulinas. La fracción resultante de la depleción fue la utilizada para la elaboración de geles bidimensionales, para lo cual previamente, se cuantificó la muestra mediante el método de Bradford y se aplicó al volumen de interés un protocolo de limpieza para eliminar lípidos y sales. Este último paso es necesario, ya que la presencia de lípidos y sales puede interferir en la correcta separación de las proteínas cuando son expuestas a un campo eléctrico. Con el objetivo de optimizar el método de separación de proteínas y obtener un mapa de manchas (proteoma) lo más representativo posible, se realizaron varios geles bidimensionales (2-DE) donde se analizó cuál era la cantidad de proteína óptima para la separación, el rango de pH para el isoelectroenfoco y método de tinción más adecuado para la detección. Tras optimizar el método de separación, decidimos realizar el estudio utilizando para ello 700  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción deplecionada (libre de albúmina e inmunoglobulinas) separada en un gradiente de pH 4-7 para una primera dimensión y en geles pequeños (9 x 7 cm) de poliacrilamida al 12% en una segunda dimensión, para finalmente ser teñidos con Bio-Safe Coomassie (apartado 10.2 de Materiales y Métodos). En la figura R\_1 se muestran algunos geles representativos obtenidos durante la optimización del método.

Tras realizar los primeros análisis de imagen utilizando el programa “PDQuest 2-D Analysis Software” (Bio-Rad) se observó que los geles que habían sido separados en gradientes de pH 3-10 (figura R\_1.A) o 5-8 (figura R\_1.B) mostraban una menor resolución en la separación de las proteínas, lo cual se vio mejorado tras separar la muestra en un gradiente de pH 4-7 (figura R\_1.C). Además, la proporción de

poliacrilamida utilizada (12%) nos permitió observar el mayor rango de proteínas posibles de alto y bajo peso molecular.



**Figura R\_1.** Imágenes representativas de geles bidimensionales en los que se ha separado la fracción deplecionada (libre de albúmina e inmunoglobulinas) en una primera dimensión usando IPGs con gradiente de pH 3-10 (A), 5-8 (B) y 4-7 (C). Para la segunda dimensión se utilizaron geles de poliacrilamida al 12%, los cuales fueron teñidos con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad).

### 3. CAMBIOS EN EL PROTEOMA PLASMÁTICO: EFECTOS DEL CONTENIDO GRASO Y ANTIOXIDANTE

Una vez optimizada la técnica de separación de proteínas, para llevar a cabo el estudio comparativo de los geles, realizamos previamente una colección de fracciones de plasma a partir de las muestras individuales que se indican en la tabla R\_1 (apartado 1); de forma que, obtuvimos muestras representativas para cada uno de los grupos de edad (6 y 24 meses) y de intervención dietética (PUFA<sub>n-6</sub>, PUFA<sub>n-6</sub> + Q y MUFA<sub>n-9</sub>). De esta forma, si comparamos dentro de un mismo grupo de edad las muestras obtenidas tras cada una de las intervenciones dietéticas obtendríamos información acerca del efecto que tiene el contenido graso o antioxidante de la dieta. Por otro lado, comparando en cada uno de los grupos de intervención dietética las muestras obtenidas en 6 y 24 meses de edad, obtendríamos información sobre el efecto que tiene el envejecimiento para cada una de las composiciones dietéticas empleadas. El análisis comparativo de los geles se realizó utilizando el programa PDQuest 2-D Analysis Software como se indica en el apartado 11 de Materiales y Métodos. De forma resumida, una vez seleccionadas en cada uno de los geles las regiones a estudiar, que representaban las mejores áreas en cuanto a resolución y saturación de los *spots*, se realizó un filtrado de las imágenes utilizando para ello la herramienta “sal y pimienta”

gausiana de  $9 \times 9''$ . Tras optimizar las imágenes se realizó el análisis, lo cual suponía una detección automática de los *spots* y el emparejamiento uno a uno de los mismos en cada uno de los geles. Terminado este proceso, decidimos normalizar los datos con la opción “*Local Regression Model*” con el fin de compensar las posibles variaciones entre geles debidas a diferencias en la eficacia de tinción. Tras llevar a cabo este último paso creamos grupos de réplicas de geles indicando al programa qué geles pertenecen a un mismo grupo de análisis y realizamos un análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico mediante una T-Student para comparar la expresión diferencial de las manchas entre los diferentes grupos, considerando significativos aquellos *spots* que mostraron cambios con valores  $p < 0.05$ . Debido a la posible variación que tienen los estudios de análisis proteómico sobre geles bidimensionales y con el fin de ser más restrictivos con los resultados obtenidos tras la cuantificación [285] se prestó especial atención a aquellos *spots* que presentaron cambios estadísticamente significativos con valores por encima del doble o por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia.

### **3.1. EFECTOS DE LAS DIETAS SOBRE RATAS JÓVENES Y VIEJAS**

En un primer lugar, estudiamos el efecto que tiene la grasa y los antioxidantes de la dieta a lo largo del envejecimiento. Para ello, se compararon entre sí los *pools* obtenidos del grupo de ratas jóvenes (6 meses) y viejas (24 meses) pertenecientes a un mismo grupo de intervención dietética (MUFA<sub>n-9</sub>, PUFA<sub>n-6</sub> ó PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>).

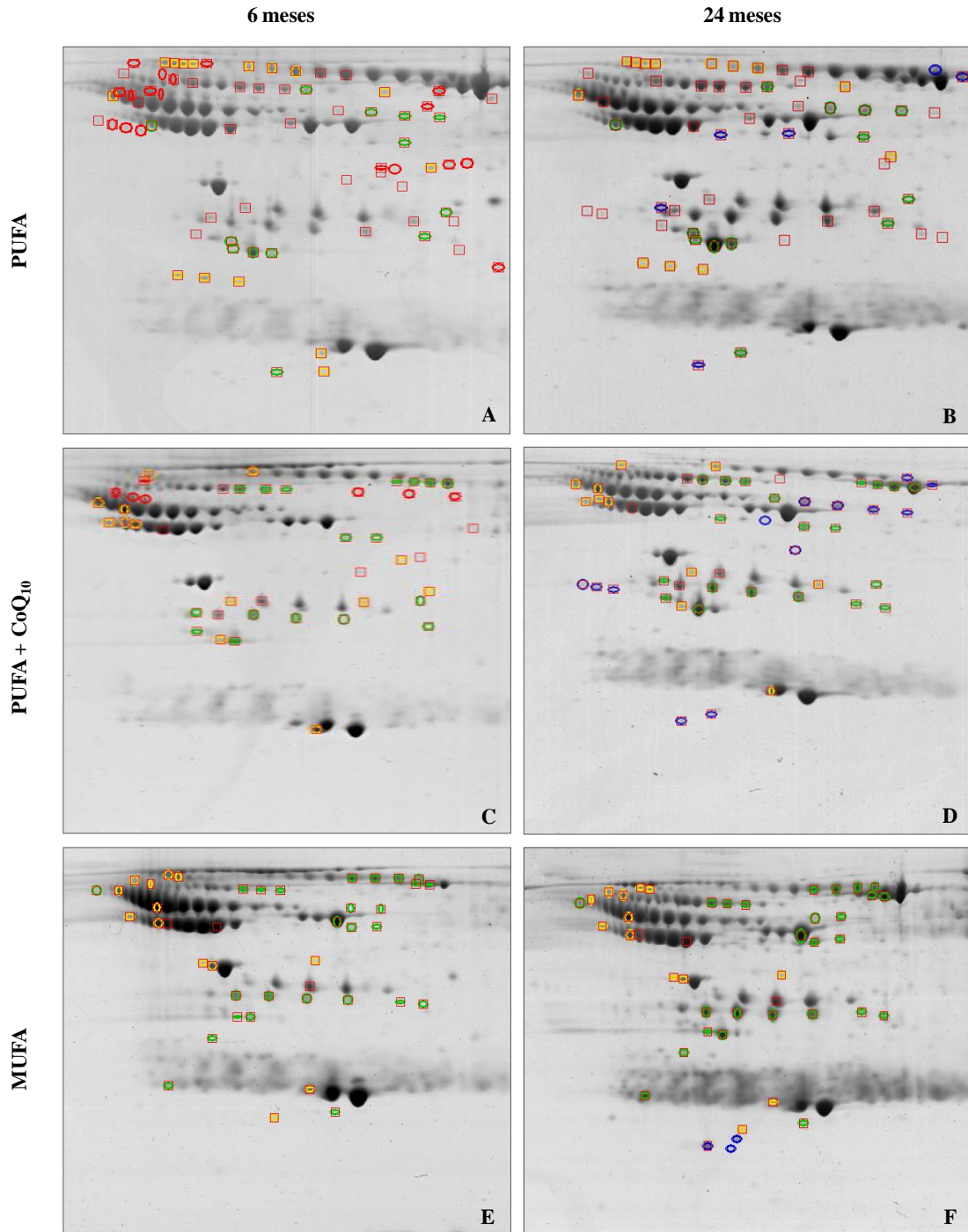
#### **3.1.1. RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 6**

Para llevar a cabo este análisis, se compararon los geles obtenidos a partir de las muestras de ratas que habían sido alimentadas a lo largo de toda su vida con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 6 (PUFA<sub>n-6</sub>). Para ello, se creó un experimento que incluía cuatro réplicas de cada una de las condiciones a comparar (muestras de 6 y 24 meses de edad) y se llevó a cabo el análisis. Tras la detección automática, el emparejamiento de los *spots* en cada uno de los geles y la normalización de los datos, el programa detectó un valor medio de 173 *spots* en el grupo de ratas jóvenes (6 meses) y de 160 *spots* en el grupo de ratas viejas (24 meses), donde el 100%

de ellos casaron en los geles duplicados. Tras llevar a cabo el análisis de los datos y aplicando una T- Student, obtuvimos cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 73 *spots*, dentro de los cuales 16 *spots* aumentaban más del doble en el grupo de ratas de 24 meses, 25 *spots* disminuían su expresión por debajo de la mitad en el mismo grupo, 2 de los *spots* se expresaban únicamente en los animales viejos (24 meses) y 11 se expresaban sólo en el grupo de ratas jóvenes (6 meses). Los resultados del análisis se muestran en la figura R\_2 (A y B) donde se observan los cambios obtenidos tomando como control el grupo de ratas de 6 meses de edad.

### **3.1.2. RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 SUPLEMENTADA CON CoQ<sub>10</sub>**

Tras realizarse el análisis, el programa detectó un valor medio de 128 *spots* en el grupo de ratas jóvenes y de 149 *spots* en el grupo de ratas viejas, donde más del 99% de ellos casaron en los geles duplicados. El análisis estadístico desveló que existían cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 59 *spots*, dentro de los cuales 19 de ellos veían aumentada su expresión y 11 disminuían. Además, encontramos 13 *spots* que se expresaban solamente a los 24 meses y 4 sólo a los 6 meses de edad (figura R\_2. C y D).



**Figura R\_2.** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales. Se muestran los cambios obtenidos en el grupo de ratas jóvenes (6 meses) y de ratas viejas (24 meses), donde se observan todos los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* que aumentaron su expresión más del doble (círculo verde) o disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) en el grupo de ratas viejas al ser comparadas con el grupo de ratas jóvenes, las proteínas que se expresan sólo a los 6 meses (círculo rojo) y las que se expresan sólo a los 24 meses de edad (círculo azul). A y B) PUFA<sub>n-6</sub> 6 y 24 meses; C y D) PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> 6 y 24 meses y E y F) MUFA<sub>n-9</sub> 6 y 24 meses, respectivamente.

### 3.1.3. RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS OMEGA 9

Tras la detección y la normalización de los datos, el programa nos mostró un valor medio de 120 *spots* en el grupo de ratas jóvenes y de 122 *spots* en el grupo de ratas viejas, donde el 100% de ellos casaron en los geles duplicados. Tras realizar el análisis de los datos, obtuvimos cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 44 *spots*, dentro de los cuales 27 *spots* aumentaban en el grupo de ratas de 24 meses, 13 *spots* disminuían su expresión en el mismo grupo y 3 *spots* se expresaban únicamente a lo largo del envejecimiento (24 meses), no encontrado proteínas expresadas sólo a los 6 meses de edad (figura R\_2. E y F).

## 3.2. EFECTOS DEL COMPONENTE GRASO Y ANTIOXIDANTE EN GRUPOS DE EDAD

Con el objetivo de estudiar el efecto que tiene la diferente composición grasa y el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> en ratas jóvenes (6 meses) o viejas (24 meses), se compararon en cada uno de los experimentos realizados, los *pools* obtenidos tras mezclar las muestras pertenecientes a ratas de un mismo grupo de edad (6 ó 24 meses) y las muestras que representaban a ratas que habían consumido dietas con diferente contenido graso (MUFA<sub>n-9</sub>, PUFA<sub>n-6</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>). De esta forma, obtendríamos información acerca de cómo la grasa de la dieta actúa sobre ratas jóvenes y sobre ratas viejas, además de ver si los posibles efectos se mantienen a lo largo del envejecimiento o por el contrario revierten.

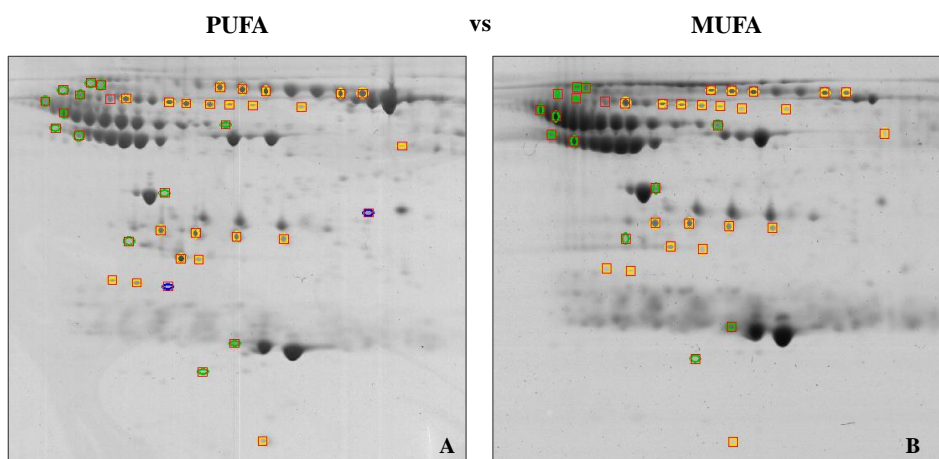
### 3.2.1. PROTEOMA PLASMÁTICO DE RATAS JÓVENES (6 MESES)

En este caso, se compararon entre sí las muestras obtenidas de ratas jóvenes que se alimentaron con las tres dietas experimentales (MUFA<sub>n-9</sub>, PUFA<sub>n-6</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>) estudiadas. Para ello, realizamos dos comparaciones: por un lado, las muestras obtenidas de ratas alimentadas con una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados omega 9 (MUFA<sub>n-9</sub>) con las muestras obtenidas de ratas alimentadas con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 6 (PUFA<sub>n-6</sub>); y por otro, las muestras obtenidas

de ratas alimentadas con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 6 (PUFA<sub>n-6</sub>) con las muestras obtenidas de ratas alimentadas con una la misma dieta pero suplementada con CoQ<sub>10</sub> (PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>) (0.7 mg/kg/día). Al igual que en los casos anteriores, se crearon experimentos que incluían entre tres y cuatro réplicas de geles elaborados independientemente para llevar a cabo el análisis.

### 3.2.1.1. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA MUFA OMEGA 9

Tras el análisis, el programa detectó una media de 173 *spots* en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> y de 120 *spots* en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, donde el 100% de ellos casaron en los geles duplicados. Tras llevar a cabo el análisis estadístico de los datos obtuvimos cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 38 *spots*, entre los cuales 13 *spots* aumentaban en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, 22 *spots* disminuían su expresión en el mismo grupo de ratas, 2 de los *spots* se expresaban solamente en el grupo de ratas alimentado con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>, no encontrando *spots* que se expresaran sólo cuando las ratas se alimentaban con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (figura R\_3. A y B).



**Figura R\_3 (A y B).** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales. Se muestran los cambios obtenidos en el grupo de ratas de 6 meses de edad alimentadas con las dietas PUFA<sub>n-6</sub> (A) y MUFA<sub>n-9</sub> (B), donde se observan todos los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* que aumentaron su expresión más del doble (círculo verde) o disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) en el grupo de ratas MUFA<sub>n-9</sub> tras ser comparada con el grupo de ratas PUFA<sub>n-6</sub>, y los *spots* que se presentaron sólo con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (círculo azul). No se encontraron *spots* que aparecieran solamente en el grupo de ratas MUFA<sub>n-9</sub>.







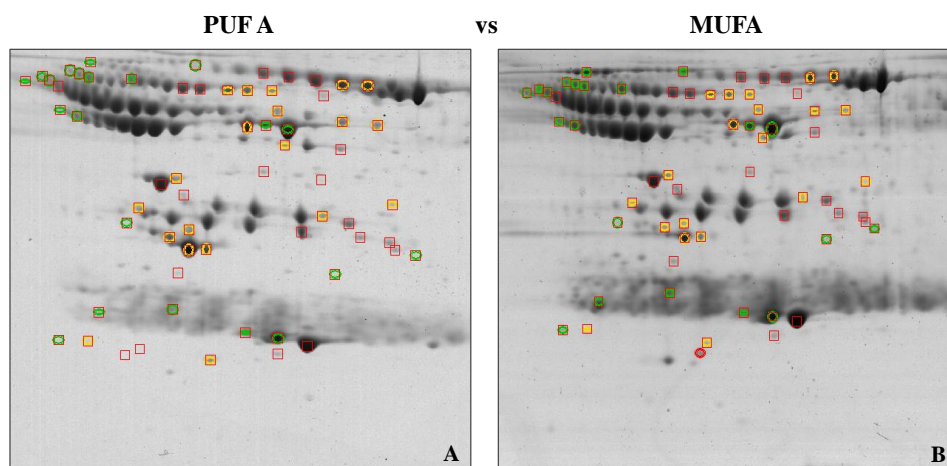
realizados sobre ratas jóvenes (6 meses), se mantenían a lo largo del envejecimiento o por el contrario revertían. Para ello, se realizaron los mismos experimentos que en el apartado 3.2.1., pero en el grupo de ratas de 24 meses de edad.

### **3.2.2.1. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA MUFA OMEGA 9**

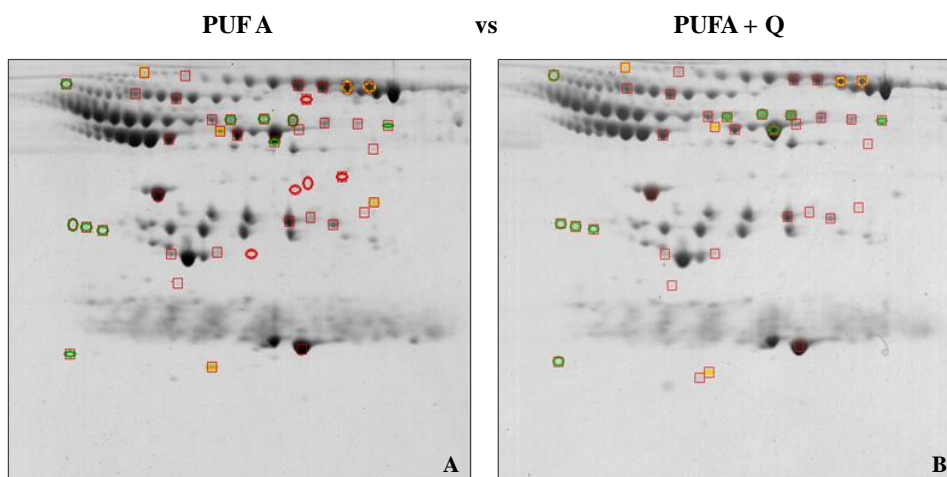
En este caso, el programa detectó una media de 160 *spots* en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> y de 122 *spots* en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, donde más del 99% de ellos casaron en los geles duplicados. El análisis estadístico de los datos nos mostró cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 63 *spots*, entre los cuales 21 *spots* aumentaban en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, 20 *spots* disminuían su expresión en el mismo grupo de ratas y 1 de los *spots* se expresaban solamente cuando las ratas se alimentaban con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, no encontrando *spots* que sólo se expresaran cuando las ratas se alimentaban con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (figura R\_5. A y B).

### **3.2.2.2. RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 FRENTE A RATAS ALIMENTADAS CON LA DIETA PUFA OMEGA 6 SUPLEMENTADA CON CoQ<sub>10</sub>**

En este caso, el programa detectó una media de 160 *spots* en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> y de 149 *spots* en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, donde más del 99% de ellos casaron en los geles duplicados. El análisis estadístico de los datos nos mostró cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 41 *spots*, entre los cuales 10 *spots* aumentaban en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, 6 *spots* disminuían su expresión en el mismo grupo de ratas y 5 de los *spots* se expresaban solamente en el grupo de ratas alimentado con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. No se encontraron *spots* que sólo se expresaran cuando las ratas eran alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> (figura R\_6. A y B).



**Figura R\_5 (A y B).** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales. Se muestran los cambios obtenidos en el grupo de ratas de 24 meses alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (A) y MUFA<sub>n-9</sub> (B), donde se observan todos los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* que aumentaron su expresión más del doble (círculo verde) o disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> tras ser comparadas con el grupo de ratas alimentadas con PUFA<sub>n-6</sub> y los *spots* que sólo se expresaron con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (círculo rojo). No se encontraron *spots* que aparecieran solamente en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>.



**Figura R\_6 (A y B).** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales. Se muestran los cambios obtenidos en el grupo de ratas de 24 meses alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (A) y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> (B), donde se observan todos los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* que aumentaron su expresión más del doble (círculo verde) o disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) en el grupo de ratas PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> al ser comparadas con el grupo de ratas PUFA<sub>n-6</sub> y los *spots* que sólo se expresaron con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (círculo rojo). No se encontraron *spots* que aparecieran solamente en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>.

#### 4. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ<sub>9</sub> Y CoQ<sub>10</sub>

Se sabe que, tanto el plasma como los tejidos de la rata contienen dos isoformas (CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub>) como formas endógenas de CoQ [39]. Con el fin de comprobar si el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> daba lugar a la incorporación del antioxidante en el organismo y poder así relacionar con ello los cambios obtenidos sobre los niveles de expresión de proteínas plasmáticas observados en el estudio proteómico, determinamos los niveles del antioxidante presentes en la fracción plasmática. Para ello, se extrajo la fase lipídica a partir de 50 µl de plasma como se indica en el apartado 6 de Materiales y Métodos y se cuantificaron los niveles utilizando cromatografía líquida de fase reversa (HPLC) (Tabla R\_2). Puesto que el CoQ<sub>9</sub> es la forma predominante en la rata, el grado de suplemento con CoQ<sub>10</sub> se calculó a partir de la disminución del cociente CoQ<sub>9</sub> / CoQ<sub>10</sub>.

Como se muestra en las figura R\_7. A y B, el grupo de ratas de 6 meses de edad alimentadas con la dieta suplementada con el antioxidante, presentó un aumento significativo de ambas isoformas (CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub>) al ser comparadas con los niveles de las mismas en los animales alimentados con las dietas no suplementadas. Sin embargo, en el grupo de ratas de 24 meses de edad, sólo se observó el incremento en los niveles de CoQ<sub>10</sub> (aunque de manera estadísticamente no significativa) en el grupo de ratas alimentadas con la dieta suplementada frente a la control. A pesar de que la suplementación parecía no estar teniendo lugar a esta edad, al menos de manera tan efectiva como en el grupo de animales jóvenes, el cociente entre ambas isoformas (CoQ<sub>9</sub> / CoQ<sub>10</sub>) claramente desveló la incorporación al organismo (en este caso en el plasma sanguíneo) del CoQ<sub>10</sub> suministrado en la dieta con ácidos grasos poliinsaturados y suplementada con el antioxidante. Esta evidencia puede apreciarse en la figura R\_7. C, donde se muestra la disminución clara y significativa de este cociente (CoQ<sub>9</sub> / CoQ<sub>10</sub>) tanto en el grupo de ratas de 24 como de 6 meses alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> más CoQ<sub>10</sub>, y que por el contrario, no se aprecia de forma tan clara en el mismo grupo de ratas en las figuras R\_7. A y B. Por todo esto, este cociente puede ser importante para estudios de envejecimiento en diferentes especies animales, ya que la longevidad está relacionada positivamente con los niveles de CoQ<sub>10</sub> y negativamente con los de CoQ<sub>9</sub> [286]. Como se muestra en la figura R\_7. C, el cociente CoQ<sub>9</sub> / CoQ<sub>10</sub> fue de  $1.8 \pm 0.48$  en el plasma de ratas de 6 meses de edad que habían sido alimentadas únicamente con la

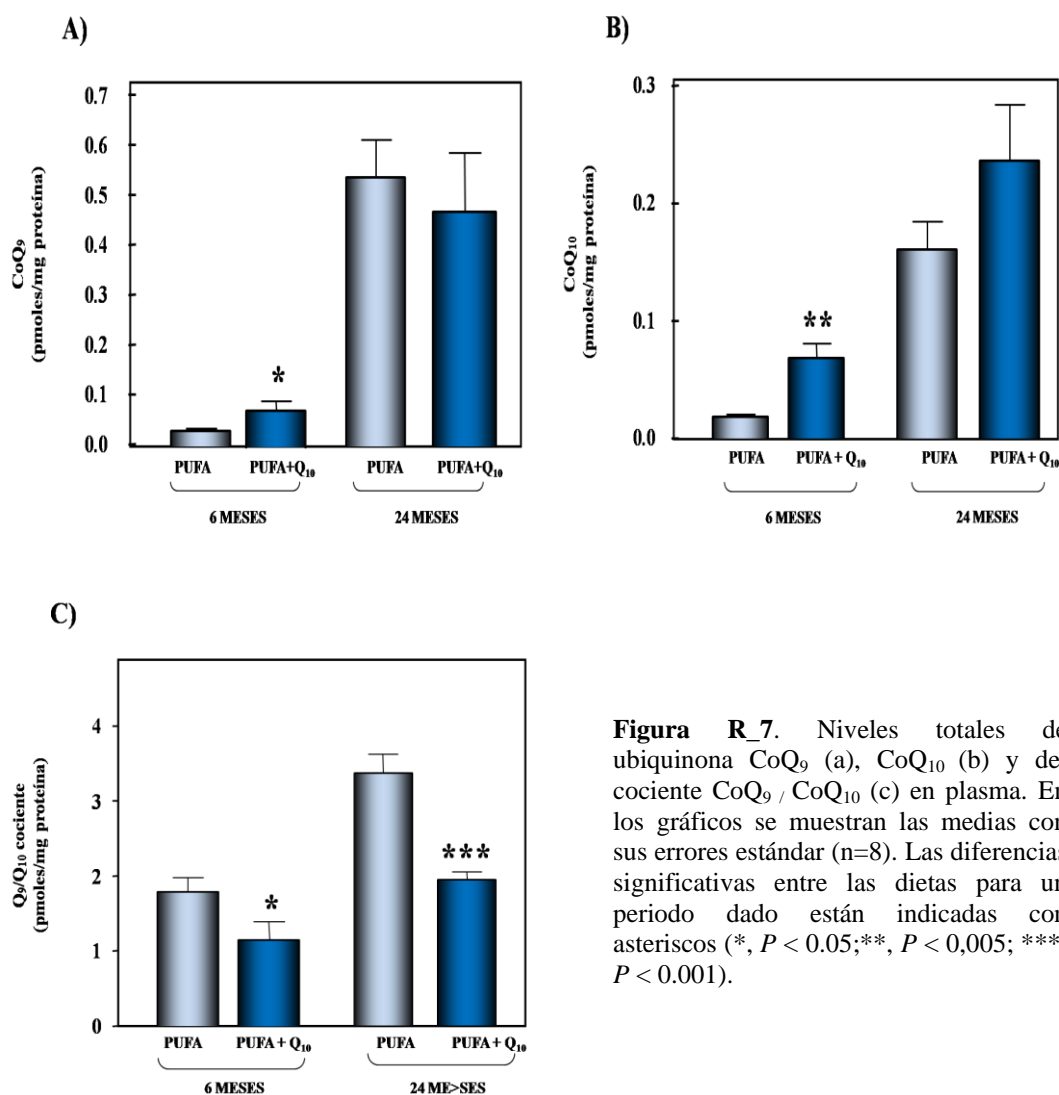
dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub>, y este valor se vio incrementado hasta  $3.4 \pm 0.54$  en las ratas de 24 meses de edad. Por otra parte, nos encontramos que en los animales alimentados con la misma dieta pero suplementada con CoQ<sub>10</sub> se produjo una disminución significativa del cociente CoQ<sub>9</sub> / CoQ<sub>10</sub> en plasma de las ratas de ambas edades (6 y 24 meses), lo cual indicaba que el suplemento exógeno con el antioxidante se estaba dando de manera correcta, independientemente de la edad. Esto es muy importante, ya que los posibles beneficios que pudiera proporcionar el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> se mantendrían a lo largo de toda la vida [40].

Muestra	Proteína plasmática total (mg / ml)	pmoles de CoQ <sub>10</sub> / mg	pmoles CoQ <sub>9</sub> / mg	RATIO CoQ <sub>9</sub> / CoQ <sub>10</sub>
G1A	171.98	0.029360459	0.04036037	1.374650513
G2A	177.37	0.024674244	0.066501066	2.69516129
G3A	168.61	0.011694233	0.019215942	1.643198091
G4A	197.5	0.019002234	0.038361876	2.018808777
G5A	174.1	-	0.020137176	-
G6A	151.01	0.016048801	0.024197852	1.50776699
G7A	104.1	0.015934904	0.026060914	1.635460993
GQ1A	164.07	0.092227493	0.103313148	1.120199036
GQ2A	116.23	0.106907703	0.204057877	1.908729407
GQ3A	123.3	0.116673823	0.250770479	2.149329408
GQ4A	99.55	0.042071675	0.029544716	0.702247191
GQ5A	113.03	0.11386878	0.101295335	0.889579525
GQ6A	114.71	0.03158861	0.026173419	0.828571429
GQ7A	141.5	0.042901684	0.061242985	1.42751938
GQ8A	103.9	0.038498556	0.087323784	2.268235294
G2D	51.123	0.18170093	0.680518358	3.745266224
G3D	90.545	0.179480185	0.531782686	2.962904718
G4D	70.285	0.227793982	0.719893149	3.16028169
G5D	104.69	0.116314834	0.478183208	4.111111111
G6D	87.77	0.097852835	0.289756067	2.961141257
GQ1D	138.27	0.225059666	0.454924954	2.021352657
GQ2D	130.43	0.086329577	0.189026042	2.189586115
GQ3D	66.084	0.516466568	1.24731806	2.415099326
GQ4D	76.89	0.317539819	0.546080114	1.719721692
GQ5D	106.32	0.219872398	0.421504577	1.917041801
GQ6D	137.37	0.182212273	0.326121667	1.78978979
GQ7D	119.64	0.101654686	0.217257049	2.137206428
GQ8D	124.765	0.238576524	0.372323969	1.560606061

**Tabla R\_2.** Se muestran los niveles en plasma de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> tras la cuantificación mediante HPLC y la cantidad de proteína plasmática total en cada una de las muestras. Además de los niveles de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub>, se muestran los datos obtenidos tras calcular la relación CoQ<sub>9</sub> / CoQ<sub>10</sub>. G y GQ (dieta PUFA<sub>n-6</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>) y A y D (6 y 24 meses de edad, respectivamente).

En concordancia con nuestros estudios previos [41, 277, 278], así como por los realizados por otros autores [287, 288], tanto el plasma como el hígado muestran un mejor patrón de adaptación al CoQ<sub>10</sub> exógeno que otros órganos como cerebro o

corazón. Del mismo modo, la disminución significativa del cociente  $\text{CoQ}_9 / \text{CoQ}_{10}$  fue también encontrada en las muestras de hígado obtenidas de estos mismos animales [41]. La restricción calórica también disminuye el cociente  $\text{CoQ}_9 / \text{CoQ}_{10}$  en hígado [289].



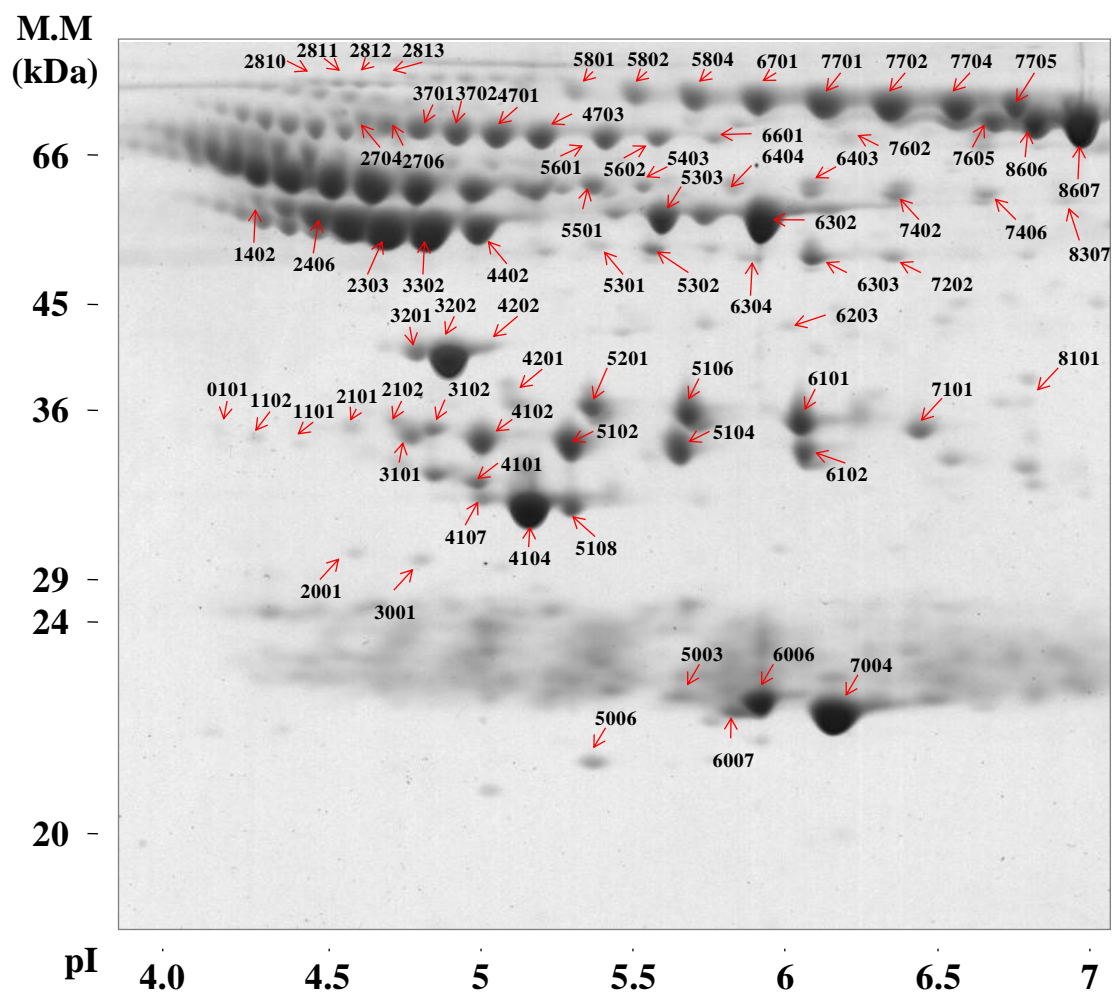
**Figura R\_7.** Niveles totales de ubiquinona  $\text{CoQ}_9$  (a),  $\text{CoQ}_{10}$  (b) y del cociente  $\text{CoQ}_9 / \text{CoQ}_{10}$  (c) en plasma. En los gráficos se muestran las medias con sus errores estándar ( $n=8$ ). Las diferencias significativas entre las dietas para un periodo dado están indicadas con asteriscos (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

Como se observa en las figuras R\_7. A-C, encontramos un incremento muy acusado de los niveles de  $\text{CoQ}_9$  y  $\text{CoQ}_{10}$  plasmáticos con el envejecimiento. Es de esperar, que los niveles de ambas isoformas incrementen en las ratas que han sido alimentadas a lo largo de su vida con el antioxidante; sin embargo, el incremento de los niveles en el grupo de ratas sin suplementar es un resultado inesperado, que sin duda es objeto de estudio. Este incremento puede ser debido a la composición del aceite empleado para las dietas.

## 5. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Tras realizar los análisis, aquellos *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos fueron extraídos del gel, transferidos a tubos *Eppendorf* con agua (calidad HPLC) y sometidos a un protocolo para su digestión con tripsina y posterior análisis mediante espectrometría de masas mediante MALDI TOF / TOF, por secuenciación peptídica. Los espectros de masas obtenidos fueron utilizados para la identificación de las proteínas usando para ello el software MASCOT (Matrix Science, UK) como motor de búsqueda sobre la base de datos MSDB. Como se explica en la INTRODUCCIÓN, ``MASCOT`` es un programa informático que analiza datos generados tras la espectrometría de masas y que incluye el sistema de puntuación ``MOWSE``, el cual nos indica la probabilidad que tiene una proteína de ser identificada correctamente, tomando como valor significativo ( $p < 0.05$ ) la puntuación superior a 70.

Tras comparar los resultados de todos los estudios realizados, se llevó a cabo una puesta en común de todos los *spots* que mostraron cambios significativos con valores por encima del doble y por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia en cada caso. Tras determinar qué *spots* eran óptimos para ser identificados, teniendo en cuenta para ello la zona del gel en la cual se resolvían y la intensidad que mostraban éstos tras la tinción, se intentaron identificar 86 *spots*, de los cuales 76 fueron identificados con éxito, mientras que el resto quedó sin identificar (figura R\_8 y tabla R\_3).



**Figura R\_8.** Imagen representativa de un gel bidimensional sobre el que aparecen señaladas y numeradas las manchas de proteínas que mostraron cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) y que fueron identificados con éxito en el conjunto de todos los análisis realizados. Se muestra la masa molecular (MM) y el punto isoeléctrico (pI).

SPOT	PROTEÍNA	MOWSE SCORE	p.I.	MM (Da)	P. C.	C. S. (%)	NCBI ID
101	Beta Properdina	183	6.57	86.435	9	15	CAE83972
1101	Haptoglobina	100	6.11	43.075	7	27	NP_036714
1102	Beta Properdina	99	6.57	86.435	5	9	CAE83972
1402	Inhibidor de Serin Proteasas III	185	5.39	45.639	16	35	S11320
2001	Inhibidor Inter Alfa H4P (fragmento)	125	6.08	103.884	10	15	NP_062242
2101	Apolipoproteína E	126	5.23	35.788	15	51	NP_620183
2102	Apolipoproteína E	155	5.23	35.788	12	37	NP_620183
2303	Alfa 1 Antitripsina	190	5.7	46.277	16	43	AAA40788
2406	Alfa 1 Antitripsina	346	5.7	46.277	17	43	AAA40788
2704	T- Kininógeno I	224	6.29	48.757	10	25	AAA41489
2706	T- kininógeno I	382	6.29	48.817	17	43	AAA41489
2810	Inhibidor Inter Alfa H4P	263	6.08	103.884	23	15	NP_062242
2811	Inhibidor Inter Alfa H4P	263	6.08	103.884	23	15	NP_062242
2812	Inhibidor Inter Alfa H4P	263	6.08	103.884	23	15	NP_062242
2813	Inhibidor Inter Alfa H4P	263	6.08	103.884	23	15	NP_062242
3001	Inhibidor Inter Alfa H4P (fragmento)	162	6.08	103.884	11	14	NP_062242
3101	Haptoglobina	251	6.1	39.051	17	46	AAH89816
3102	Haptoglobina	149	6.1	43.075	15	34	NP_036714
3201	Apolipoproteína A-IV	652	5.12	44.428	33	82	AAA40747
3202	Apolipoproteína A-IV	616	5.18	44.428	33	82	AAA40747
3302	Alfa 1 Antitripsina	191	5.7	45.978	16	42	AAA40788
3701	T- Kininogeno I	307	6.29	48.757	20	52	AAA41489
3702	T- Kininogeno I	170	6.28	48.577	7	41	AAA41489
4101	Apolipoproteína E	114	5.23	35.788	12	38	NP_620183
4102	Haptoglobina	149	6.1	43.075	15	34	NP_036714
4104	Apolipoproteína E	254	5.23	35.788	18	37	NP_620183
4107	Apolipoproteína E	254	5.23	35.788	18	37	NP_620183
4201	Alfa 1 Macroglobulina	309	6.46	168.387	19	13	AAA41591
4202	Apolipoproteína A-IV	219	5.12	44.428	20	56	AAA40747
4402	Alfa 1 Antitripsina	190	5.7	46.277	16	42	AAA40788
4701	T- Kininogeno I	307	6.29	48.757	20	52	AAA41489
4703	T- Kininogeno I	307	6.29	48.757	20	52	AAA41489
5003	Apolipoproteína A-I	312	5.52	30.101	17	51	NP_036870
5006	Peroxisredoxina 2	244	5.2	21.968	6	27	AAC35744
5102	Haptoglobina	149	6.1	43.075	15	34	NP_036714
5104	Haptoglobina	149	6.1	39.037	14	51	NP_036714
5106	Alfa 1 Macroglobulina	285	6.46	168.421	17	12	AAA41591
5108	Apolipoproteína E	254	5.23	35.788	18	37	NP_620183
5201	Alfa 1 Macroglobulina	285	6.46	168.421	17	12	A42210
5301	Gamma Fibrinógeno	254	5.85	51.227	16	49	NP_036691
5302	Gamma Fibrinógeno	141	5.62	51.227	16	49	NP_036691
5303	Proteína de Unión a la Vitamina D	493	5.76	55.078	26	59	AAA41082
5403	Proteína de Unión a la Vitamina D	305	5.65	55.079	17	46	AAA41082
5501	Proteína de Unión a la Vitamina D	423	5.76	55.078	22	54	AAA41082
5601	T- Kininogeno I	170	6.28	48.577	7	23	AAA41489
5602	T- Kininogeno I	321	6.29	48.757	16	42	AAA41489
5801	Hemopexina	279	7.58	52.059	15	36	NP_445770
5802	Hemopexina	212	7.58	51.999	20	43	NP_445770
5804	Hemopexina	196	7.58	52.059	13	31	NP_445770
6006	Apolipoproteína A-I	284	5.51	29.869	15	44	NP_036870
6007	Apolipoproteína A- I	284	5.51	29.869	15	44	NP_036870
6101	Alfa 1 Macroglobulina	285	6.46	168.421	17	12	AAA41591
6102	Haptoglobina	129	6.1	39.037	13	49	NP_036714
6203	Transferrina	430	7.14	78.512	24	26	BAA07458
6302	Proteína de Unión a la Vitamina D	228	5.76	55.078	20	55	AAA41082
6303	Gamma Fibrinógeno	180	5.57	50.247	16	48	NP_036691
6304	Gamma fibrinógeno	141	5.62	51.227	16	49	NP_036691
6403	Fetuína ( $\alpha$ 2 HS Glicoproteína)	321	6.71	42.361	17	48	CAB62543
6404	Fetuína ( $\alpha$ 2 HS Glicoproteína)	236	6.71	42.361	14	43	CAB62543
6601	Apolipoproteína H ( $\beta$ 2 Glicoproteína)	66	8.59	34.315	8	12	CAJ29887
6701	Hemopexina	197	7.58	51.999	20	36	NP_445770
7004	Apolipoproteína A-I	374	5.52	30.1	21	65	NP_036870
7101	Haptoglobina	194	6.1	39.051	14	41	AAH89816
7202	Gamma Fibrinógeno	296	5.85	50.247	22	58	NP_036691
7402	Fetuína ( $\alpha$ 2 HS Glicoproteína)	281	6.71	42.361	16	43	CAB62543
7406	Fetuína ( $\alpha$ 2 HS Glicoproteína)	148	6.71	42.361	15	47	CAB62543
7602	Apolipoproteína H ( $\beta$ 2 Glicoproteína)	118	8.59	34.315	14	39	CAJ29887
7605	Precursor de Seroalbúmina	147	6.09	70.669	20	30	NP_599153
7701	Hemopexina	196	7.58	51.999	20	30	NP_445770
7702	Hemopexina	279	7.58	51.2059	15	36	NP_445770
7704	Hemopexina	119	7.58	51.999	16	36	NP_445770
7705	Hemopexina	349	7.58	51.999	22	45	NP_445770
8101	Precursor de Seroalbúmina (fragmento)	156	6.09	70.669	21	40	NP_599153
8307	Beta Fetuína	60	6.71	42.361	7	25	EDL78063
8606	Precursor de Seroalbúmina	338	6.09	70.669	34	30	NP_599153
8607	Precursor de Seroalbúmina	206	6.09	70.669	24	30	NP_599153



**Tabla R\_3.** Lista de todas las proteínas identificadas correctamente mediante espectrometría de masas (MALDI TOF / TOF). La tabla muestra por orden: la identificación numérica de cada uno de los *spots* analizados, el nombre de la proteína obtenido, la puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT (MOWSE SCORE), el punto isoeléctrico (pI), la masa molecular en Dalton, el número de péptidos contados para la identificación (P.C.), el porcentaje de cobertura de secuencia (C.S. (%)) y el número asignado por la base de datos NCBI a cada proteína (NCBI ID).

## 5.1. EFECTOS OCASIONADOS POR LAS DIETAS EN ANIMALES JÓVENES Y VIEJOS

Los estudios realizados entre estos grupos de animales mostraron cambios en un total de 61 *spots* que fueron identificados con éxito. En la tabla R\_4 podemos observar cómo la ingesta de una dieta rica en MUFA <sub>n-9</sub> a lo largo de la vida de la rata hace que, a los 24 meses de edad, incrementen proteínas como: Alfa 1 Antitripsina (1 *spot*), Inhibidor Inter Alfa H4P (1 *spot*), Haptoglobina (4 *spots*), Apolipoproteína E (2 *spots*), Kininógeno (3 *spots*), Alfa-1-Macroglobulina (1 *spot*), Proteína de Unión a la vitamina D (1 *spot*), Fibrinógeno Gamma (2 *spots*), Fetuína (Alfa 2 HS Glicoproteína) (2 *spots*), Albúmina (2 *spots*) y Hemopexina (4 *spot*). Por otro lado, disminuyen: Inhibidor de Serín Proteasas III (1 *spot*), Apolipoproteína A-IV (1 *spot*), Apolipoproteína A-I (1 *spot*) y Peroxirredoxina (1 *spot*).

Cuando las ratas se alimentaban con una dieta rica en PUFA <sub>n-3</sub> incrementaban: Factor Properdina Beta (2 *spots*), Apolipoproteína E (5 *spots*), Alfa 1 Antitripsina (2 *spots*), Haptoglobina (3 *spots*), Kininógeno (3 *spots*), Peroxirredoxina 1 (1 *spot*), Fibrinógeno Gamma (2 *spots*) y Fetuína (Alfa 2 HS Glicoproteína) (5 *spots*); y disminuían Inhibidor Inter Alfa H4P (5 *spots*), Alfa-1-Macroglobulina (1 *spot*), Hemopexina (4 *spots*), Kininógeno (3 *spots*) y Proteína de Unión a la Vitamina D (1 *spot*).

Por último, cuando las ratas se alimentaron con una dieta PUFA <sub>n-3</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub>, obtuvimos un incremento de: Factor Properdina Beta (2 *spots*), Haptoglobina (6 *spots*), Apolipoproteína E (1 *spot*), Kininógeno (4 *spots*), Peroxirredoxina 1 (1 *spot*), Fibrinógeno Gamma (2 *spots*), Fetuína (Alfa 2 HS Glicoproteína) (5 *spots*) y Albúmina (4 *spots*). Por el contrario, se observó una disminución de Inhibidor de Serín Proteasas III (1 *spot*), Apolipoproteína E (1 *spot*), Alfa-1-Macroglobulina (2 *spots*), Hemopexina (1 *spot*) y Apolipoproteína H (1 *spot*).

Las proteínas que se vieron afectadas en los distintos grupos de estudio se muestran en las figuras R\_9. Asimismo, en las figuras R\_12 y 13 se muestran imágenes de los geles bidimensionales donde se resaltan los cambios observados.

## 5.2. EFECTOS DEL COMPONENTE GRASO Y ANTIOXIDANTE DE LA DIETA EN RATAS JÓVENES (6 MESES)

El análisis realizado sobre los geles bidimensionales obtenidos del grupo de ratas jóvenes, nos mostró cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 44 *spots* que vieron alterada su expresión (figura R\_10) y que pudieron ser identificados con éxito. Así, cuando comparamos las ratas alimentadas con una dieta PUFA<sub>n-6</sub> y las ratas alimentadas con una dieta MUFA<sub>n-9</sub>, encontramos cambios significativos en un total de 30 proteínas, donde incrementaron con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> proteínas como: Inhibidor de Serín Proteasas III (1 *spot*), Apolipoproteína A-IV (1 *spot*), Apolipoproteína A-I (1 *spot*), Peroxirredoxina 1 (1 *spot*) y Proteína de Unión a la Vitamina D (1 *spot*); y disminuyeron en el mismo grupo: Inhibidor de Inter Alfa H4P (2 *spots*), Kininógeno (6 *spots*), Haptoglobina (4 *spots*), Apolipoproteína E (1 *spot*), Hemopexina (5 *spots*), Apolipoproteína H (1 *spot*) y Fetuína (3 *spot*).

Por otro lado, cuando comparamos el grupo de ratas alimentadas con PUFA<sub>n-6</sub> con la misma dieta pero suplementada con CoQ<sub>10</sub> el número de *spots* que se veía afectado era de 34. En este caso, se incrementaron con la dieta suplementada proteínas como: Inhibidor de Serín Proteasas III (1 *spot*), Apolipoproteína E (2 *spot*), Alfa 1 Macroglobulina (1 *spot*) y Proteína de Unión a la Vitamina D (1 *spot*); y disminuyeron en el mismo grupo Apolipoproteína E (1 *spot*), Inhibidor Inter Alfa H4P (6 *spots*), Haptoglobina (5 *spots*), Hemopexina (6 *spots*), Transferrina (1 *spot*), Fibrinógeno Gamma (1 *spot*), Fetuína (3 *spot*), Apolipoproteína H (3 *spots*) y Albúmina (1 *spot*).

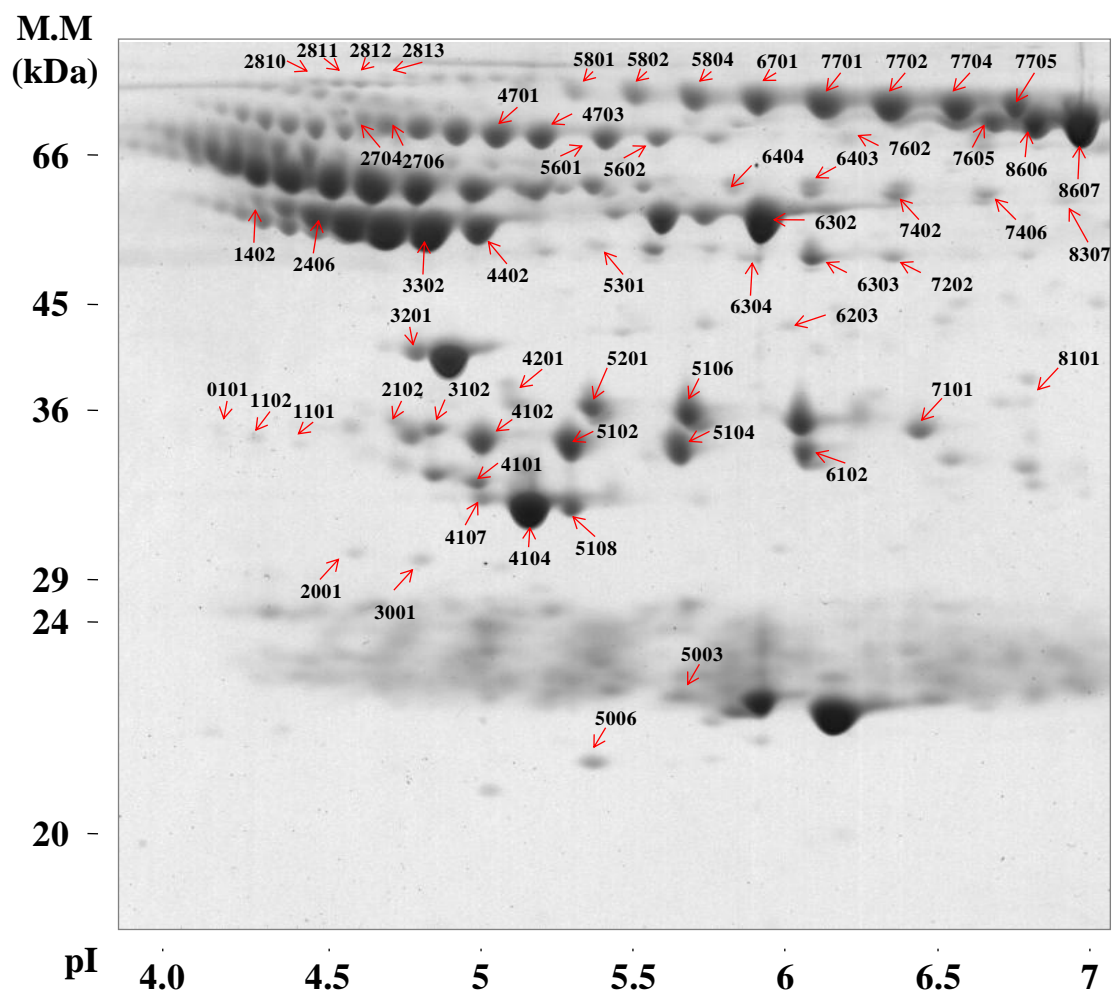
Los datos obtenidos tras la cuantificación de los *spots* se pueden consultar en la tabla R\_5. Asimismo, en las figuras R\_12 y 13 se muestran imágenes de los geles bidimensionales donde se resaltan los cambios observados.

### 5.3. EFECTOS DEL COMPONENTE GRASO Y ANTIOXIDANTE DE LA DIETA EN RATAS VIEJAS (24 MESES)

Tras el análisis de los geles correspondientes a este estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en un total de 45 *spots* (figura R\_11) que fueron identificados; entre los cuales, 33 de ellos veían alterada su expresión en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> cuando era comparado con el grupo de ratas alimentadas con una dieta PUFA<sub>n-6</sub>. En este caso, incrementaron con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> las siguientes proteínas: Inhibidor de Serín Proteasas III (1 *spot*), Alfa-1-Macroglobulina (1 *spot*), Apolipoproteína A-I (3 *spots*) y Proteína de Unión a la Vitamina D (1 *spots*); y disminuyeron en el mismo grupo: Apolipoproteína E (3 *spots*), Apolipoproteína A-IV (2 *spots*), Kininógeno (4 *spots*), Peroxirredoxina 1 (1 *spot*), Haptoglobina (3 *spots*), Proteína de Unión a la Vitamina D (1 *spot*), Hemopexina (5 *spots*), Fetuína (3 *spots*), Apolipoproteína H (2 *spots*) y Fibrinógeno Gamma (2 *spots*).

Cuando las ratas se alimentaron con una dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> y se compararon con ratas de la misma dieta pero sin suplementar, el número de *spots* que se alteraba era de 26, donde se incrementaron: Factor Proterdina Beta (2 *spots*), Kininógeno (1 *spot*), Apolipoproteína A-IV (1 *spot*), Proteína de Unión a la Vitamina D (4 *spots*), Fetuína (4 *spots*), Apolipoproteína A-I (1 *spot*) y Albúmina (1 *spot*). Por otro lado disminuyeron: Apolipoproteína E (1 *spot*), Alfa 1 Antitripsina (1 *spot*), Peroxirredoxina 1 (1 *spot*), Proteína de Unión a la Vitamina D (1 *spot*), Alfa-1-Macroglobulina (1 *spot*), Haptoglobina (1 *spot*), Apolipoproteína H (1 *spot*) y Hemopexina (4 *spots*).

Los datos obtenidos tras la cuantificación de los *spots* se pueden consultar en la tabla R\_6. Las imágenes representativas de los geles bidimensionales donde se señalan los cambios observados se muestran en las figuras R\_12 y 13.

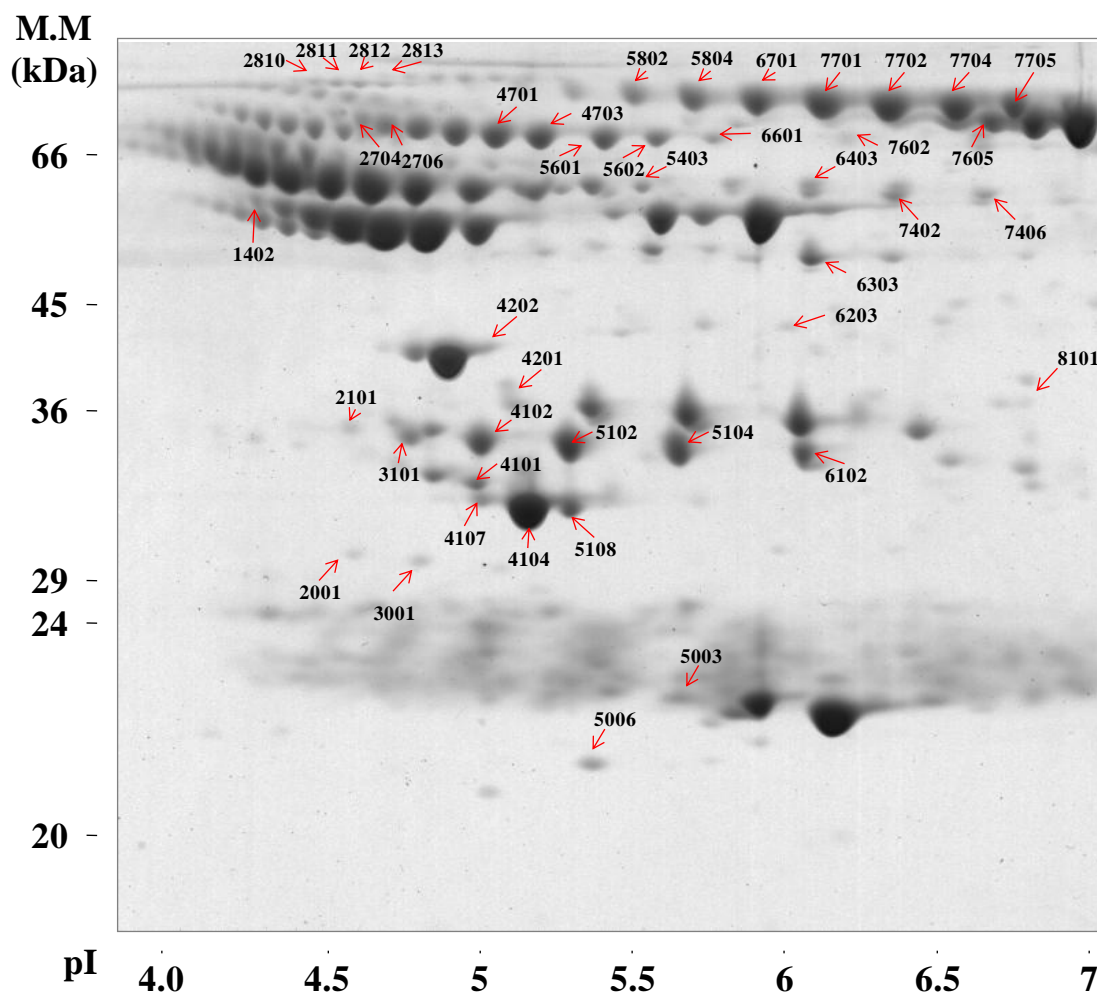


**Figura R\_9.** Imagen representativa de un gel 2-DE sobre el que aparecen señaladas y numeradas las proteínas que mostraron diferencias significativas en los análisis realizados en plasma de ratas, tras la ingestión de las tres dietas experimentales a lo largo del envejecimiento.

## Resultados y Discusión

SPOT	PROTEÍNA	PUFA 6m vs PUFA 24m				E	MUFA 6m vs MUFA 24m				E	PUFA + Q 6m vs PUFA + Q 24m				E
		PUFA 6m		PUFA 24m			MUFA 6m		MUFA 24m			PUFA + Q 6m		PUFA + Q 24m		
		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)	
101	Properdina Factor Beta	0	0.00	0.80	25.50	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0	0.00	1.20	60.30			
1101	Haptoglobina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0	0.00	0.90	53.20			
1102	Properdina Factor Beta	0	0.00	1.00	11.60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0	0.00	1.70	54.40			
1402	Inhibidor de Serín Proteasas III	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	47.50	45.40	10.90	67.60	4.36	33.20	67.10	3.70	22.50	8.97	
2001	Inhibidor Inter Alfa H4P	3.30	9.10	0.90	11.30	3.67	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2102	Apolipoproteína E	0	0.00	3.50	23.60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2406	Alfa 1 Antitripsina	2.70	90.80	6.90	19.40	2.56	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2704	T- kininógeno I	6.10	58.80	0	0.00	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2706	T- kininógeno I	14.70	21.90	9.5	21.60	1.54	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2810	Inhibidor Inter Alfa H4P	5.2	37.20	1.1	16.90	4.72	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2811	Inhibidor Inter Alfa H4P	7	27.90	1.1	26.20	6.36	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2812	Inhibidor Inter Alfa H4P	3.9	12.20	1.2	29.70	3.25	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
2813	Inhibidor Inter Alfa H4P	2.6	29.10	0.7	4.10	3.71	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
3001	Inhibidor Inter Alfa H4P	4.1	13.40	1.5	11.50	2.73	0.30	31.20	0.80	27.10	2.67	0.30	15.70	0.80	58.00	2.67
3102	Haptoglobina	2.7	17.00	5.2	15.60	1.92	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1.60	7.50	4.10	37.90	2.56
3201	Apolipoproteína A-IV	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	12.60	12.50	3.80	2.00	3.32	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
3302	Alfa 1 Antitripsina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	135.30	3.10	201.30	16.00	1.49	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
4101	Apolipoproteína E	3.1	13.40	6.4	22.30	2.06	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
4102	Precursor de haptoglobina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	5.30	24.80	25.70	42.70	4.85	12.70	11.60	25.00	14.90	1.97
4104	Apolipoproteína E	30.3	5.20	88.7	22.10	2.92	2.70	15.50	32.40	31.60	12.00	25.30	8.50	141.70	43.50	5.6
4107	Apolipoproteína E	1.4	39.50	4.50	7.90	3.21	0.60	90.20	2.90	41.50	4.83	16.60	37.80	2.80	39.30	5.93
4201	Alfa-1-Macroglobulina	3.50	10.10	2.70	15.30	1.29	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	4.20	19.80	2.00	41.50	2.1
4402	Alfa-1-Macroglobulina	30.20	10.30	46.10	17.70	1.52	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
4701	T- Kininógeno I	15.20	14.70	22.40	3.00	1.47	5.40	25.50	16.10	3.80	2.98	15.90	12.70	28.10	11.50	1.77
4703	T- Kininógeno I	12.90	10.70	19.40	0.80	1.50	2.40	32.20	7.80	8.30	3.25	11.20	8.30	22.80	22.90	2.04
5003	Apolipoproteína A-I	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	20.20	19.00	6.50	63.40	3.11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5006	Peroxisredoxina 2	0.80	26.30	3.40	12.60	4.25	0.80	24.80	0.20	37.10	4.00	0	0.00	1.20	30.40	
5102	Haptoglobina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	6.00	25.00	54.20	49.80	9.03	12.90	19.20	35.00	22.50	2.71
5104	Haptoglobina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	3.60	5.10	36.40	32.20	10.11	7.30	17.40	32.70	16.80	4.48
5106	Alfa-1-Macroglobulina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	27.00	20.90	48.70	18.90	1.80	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5108	Apolipoproteína E	5.20	28.70	13.50	31.70	2.59	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5201	Alfa-1-Macroglobulina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	21.60	5.70	16.90	16.50	1.28
5301	Fibrinógeno Gamma	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.60	0.00	1.30	57.50	2.17
5402	Proteína de Unión a la Vitamina D	5.90	4.50	3.60	23.90	1.63	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5601	T- kininógeno I	8.60	5.40	14.10	7.30	1.64	0.80	40.60	3.60	32.40	4.50	5.80	10.90	16.20	17.20	2.79
5602	T- kininógeno I	2.90	9.50	6.60	10.70	2.28	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1.70	17.50	7.30	16.80	4.29
5801	Hemopexina	11.50	13.90	3.60	6.80	3.19	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	23.50	61.60	4.40	12.20	5.34
5802	Hemopexina	19.60	11.60	7.80	14.40	2.51	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5804	Hemopexina	29.40	4.80	15.10	12.40	1.95	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
6102	Haptoglobina	10.50	14.00	17.10	22.50	1.63	1.50	13.50	13.70	13.30	9.13	1.90	20.90	17.70	5.50	9.32
6203	Transferrina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0	0.00	0.70	12.90	
6302	Proteína de Unión a la Vitamina D	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	95.20	62.90	302.40	20.40	3.18	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
6303	Fibrinógeno Gamma	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.40	57.40	4.50	43.90	11.25	1.80	34.60	7.60	51.30	4.22
6304	Fibrinógeno Gamma	0	0.00	1.10	50.60	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
6403	Fetuína	2.20	31.50	4.70	22.50	2.14	0.10	124.30	1.10	22.10	11.00	0	0.00	10.00	9.50	
6404	Fetuína	1.40	24.90	2.50	30.30	1.79	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.90	0.00	5.10	13.80	5.67
6701	Hemopexina	38.80	5.90	26.60	16.00	1.46	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
7101	Haptoglobina	6.20	8.60	8.10	6.00	1.31	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
7202	Fibrinógeno Gamma	0.80	45.50	2.00	39.60	2.50	0.20	51.20	0.80	19.30	4.00	0.60	58.00	1.60	53.10	2.67
7402	Fetuína	1.50	21.70	5.70	25.80	3.80	0	72.50	0.60	41.60	n.s.	0	0.00	10.00	9.30	
7406	Fetuína	0.70	21.50	3.80	17.20	5.43	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0	0.00	6.80	23.00	
7602	Apolipoproteína H	3.30	16.30	1.50	17.20	2.20	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1.50	8.40	0	0.00	
7605	Seroalbúmina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	5.20	62.50	47.20	39.60	9.08	4.80	36.60	27.00	4.20	5.63
7701	Hemopexina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	8.80	55.80	23.30	20.00	2.65	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
7702	Hemopexina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	10.90	52.80	23.40	16.50	2.15	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
7704	Hemopexina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	5.50	52.00	20.10	27.20	3.65	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
7705	Hemopexina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1.70	103.50	9.50	42.90	5.59	0.00	0.00	21.40	72.00	
8101	Seroalbúmina (fragmento)	0.40	34.80	1.00	11.40	2.50	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0.40	21.00	0.80	27.10	2
8307	Fetuína Beta	0	0.00	1.00	44.90	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0	0.00	1.10	17.10	
8606	Seroalbúmina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	15.70	79.40	121.90	52.20	7.76	8.00	67.00	42.10	9.30	5.26
8607	Seroalbúmina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	14.30	42.30	143.80	36.50	10.1

**Tabla R\_4.** Lista de *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) tras los análisis realizados en los grupos de ratas alimentadas a lo largo del envejecimiento (6 y 24 meses de edad) con las tres dietas experimentales: PUFA<sub>n-6</sub>, MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, y que fueron identificados con éxito. En las primeras columnas aparecen el número identificativo de cada *spot* y el nombre de la proteína identificada. A continuación se muestran, por grupos de análisis, los datos de cuantificación obtenidos tras el análisis de imagen, donde D.O indica el dato de cuantificación obtenido en cada *spot*; C.V. (%) el coeficiente de variación obtenido tras la cuantificación y E, el efecto que tiene lugar a lo largo del envejecimiento mostrado según un código de colores, de forma que, en azul se muestran los *spots* que aparecen sólo en el grupo de 24 meses, en rojo los que aparecen sólo en el grupo de 6 meses, en verde los *spots* que aumentan tomando como referencia el grupo de 6 meses y en amarillo los *spots* que disminuyen tomando como referencia el grupo de 24 meses.

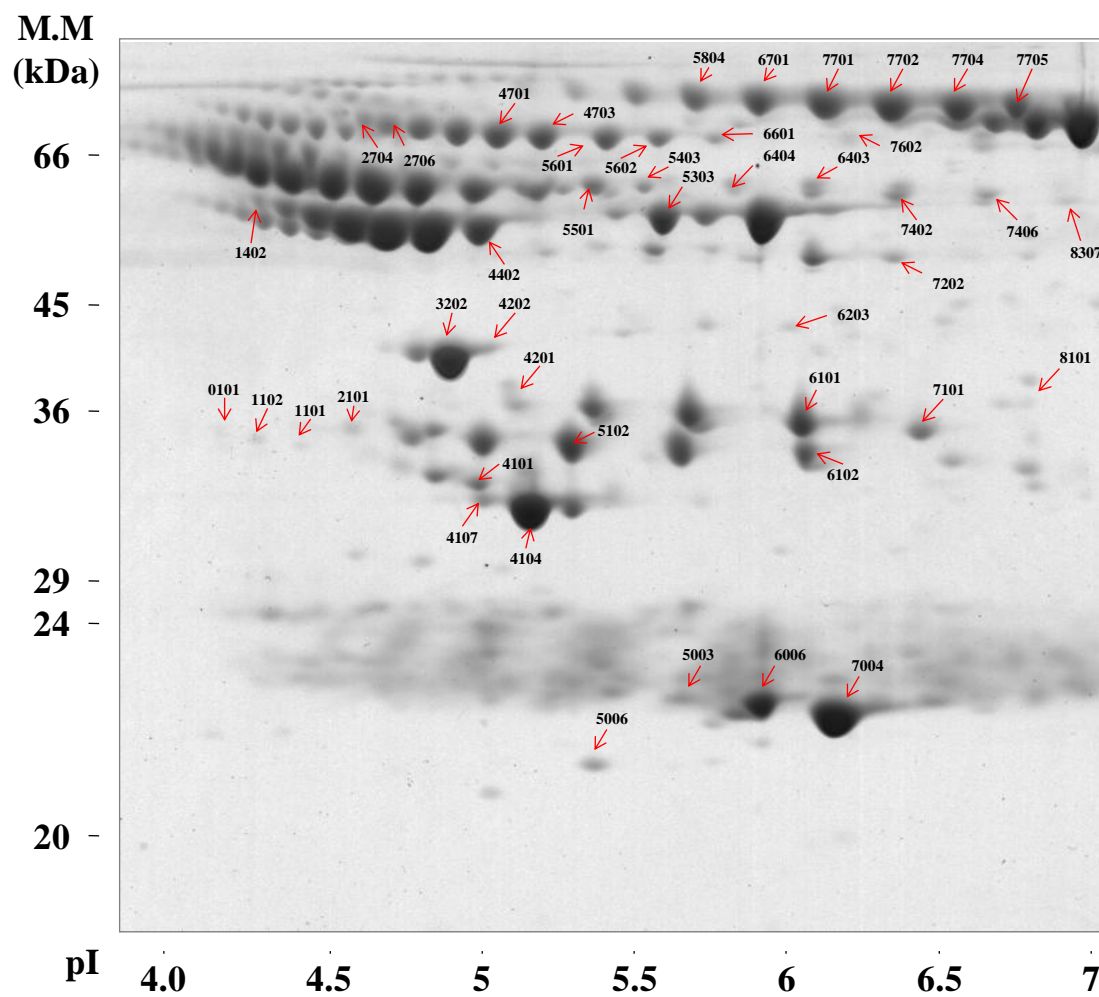


**Figura R\_10.** Imagen representativa de un gel bidimensional sobre el que aparecen señalados y numerados los *spots* que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el análisis realizado sobre ratas jóvenes (6 meses) alimentadas con las tres dietas experimentales (PUFA<sub>n-6</sub>, MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>).

SPOT	PROTEÍNA	PUFA vs MUFA (6m)				E	PUFA vs PUFA + Q (6m)				E
		PUFA		MUFA			PUFA		PUFA + Q		
		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)	
1402	Inhibidor de Serin Proteasas III	5.40	15.70	35.90	30.60	6.65	4.70	50.50	26.70	59.80	5.68
2001	Inhibidor Inter Alfa H4P	1.90	15.40	0.40	53.50	4.75	3.30	9.60	0.90	51.30	3.67
2101	Apolipoproteína E	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		1.30	18.10	2.30	19.60	1.77
2704	T-Kininogeno 1	3.50	6.40	2.10	20.60	1.67	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
2706	T-Kininogeno 1	12.10	29.30	4.40	50.70	2.75	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
2810	Inhibidor Inter Alfa H4P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		5.20	37.40	0	0.00	
2811	Inhibidor Inter Alfa H4P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		7.00	28.00	0	0.00	
2812	Inhibidor Inter Alfa H4P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		3.90	13.60	0	0.00	
2813	Inhibidor Inter Alfa H4P	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		2.60	29.30	0	0.00	
3001	Inhibidor Inter Alfa H4P	2.60	24.50	2.40	47.20	1.08	4.10	14.30	1.00	37.50	4.10
3101	Haptoglobina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		7.50	18.70	5.60	7.80	1.34
4101	Apolipoproteína E	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		3.10	13.10	0	0.00	
4102	Haptoglobina	17.90	29.80	5.40	20.60	3.31	21.20	24.50	11.60	13.00	1.83
4104	Apolipoproteína E	45.10	36.90	2.60	9.10	17.35	30.30	5.20	22.30	8.80	1.36
4107	Apolipoproteína E	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		1.40	39.90	15.00	36.10	10.71
4201	Alfa 1 Macroglobulina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		3.50	9.00	4.50	10.00	1.29
4202	Apolipoproteína A IV	0.50	71.60	2.90	38.50	5.80	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
4701	T-Kininogeno 1	13.40	24.10	6.30	37.90	2.13	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
4703	T-Kininogeno 1	9.60	15.50	2.50	28.60	3.84	12.80	10.40	10.20	5.60	1.25
5003	Apolipoproteína A I	3.70	33.90	22.20	28.70	6.00	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5006	Peroxirredoxina 2	0.20	51.10	0.80	26.00	4.00	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5102	Haptoglobina	35.10	37.60	6.30	23.40	5.57	30.00	22.30	11.70	21.70	2.56
5104	Haptoglobina	24.80	26.50	3.80	8.90	6.53	24.30	15.40	6.80	15.60	3.57
5108	Apolipoproteína E	3.10	25.10	0.70	25.10	4.43	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5403	Proteína de Unión a la Vitamina D	0.80	32.60	2.10	17.90	2.63	1.80	10.90	3.60	16.20	2.00
5601	T-Kininogeno 1	5.50	14.90	0.80	48.50	0.11	8.60	5.90	5.60	8.70	1.54
5602	T-Kininogeno 1	1.40	23.20	0.30	13.30	0.11	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5802	Hemopexina	19.00	30.40	6.30	13.50	1.41	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
5804	Hemopexina	40.50	29.00	7.80	24.40	1.66	29.40	4.70	17.80	34.90	1.65
6102	Haptoglobina	6.60	27.80	1.60	24.70	0.27	10.50	14.30	2.70	21.60	3.89
6203	Transferrina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		0.80	43.60	0	0.00	
6303	Fibrinógeno Gamma	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		5.20	36.90	2.50	34.00	2.08
6403	Fetuína	1.00	38.80	0	0.00		2.20	31.90	0	0.00	
6404	Fetuína	0.30	23.60	0.10	0.33	3.00	2.20	31.90	0	0.00	
6601	Apolipoproteína H	1.30	37.20	0.30	16.60	4.33	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
6701	Hemopexina	67.10	39.40	8.20	77.80	8.18	38.80	5.90	21.80	13.40	1.78
7402	Fetuína	0.50	29.40	0	0.00		1.50	22.40	0	0.00	
7406	Fetuína	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		0.70	23.60	0	0.00	
7602	Apolipoproteína H	1.90	8.50	0.80	58.10	2.38	3.30	16.20	2.30	19.20	1.43
7605	Seroalbúmina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		24.30	12.70	5.00	23.70	4.86
7701	Hemopexina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		39.70	10.20	24.80	20.90	1.60
7702	Hemopexina	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		38.20	14.60	20.00	25.00	1.91
7704	Hemopexina	59.60	49.90	5.70	66.10	10.46	33.50	12.30	11.90	39.40	2.82
7705	Hemopexina	19.70	28.20	1.80	59.60	10.94	19.50	6.00	5.70	27.20	3.42
8101	Seroalbúmina	2.90	51.30	0	0.00		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

**Tabla R\_5.** Lista de los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) tras los análisis realizados en el grupo de ratas de 6 meses de edad alimentadas con diferentes dietas experimentales y que fueron identificados con éxito; de forma que, se presentan los resultados obtenidos tras comparar el grupo PUFA<sub>n-6</sub> frente al grupo MUFA<sub>n-9</sub> y los resultados obtenidos tras comparar el grupo PUFA<sub>n-6</sub> frente al grupo PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>. En las primeras columnas aparecen el número identificativo de cada *spot* y el nombre de la proteína identificada. A continuación se muestran, por grupos de análisis, los datos de cuantificación obtenidos tras el análisis de imagen, donde D.O. indica el dato de cuantificación obtenido en cada *spot*; C.V. (%) el coeficiente de variación en cada caso y E, el efecto que tiene lugar en cada grupo estudiado mostrado según un código de colores, de forma que, en azul se muestran los *spots* que no aparecen en el grupo MUFA<sub>n-9</sub>, en rojo los que no aparecen en el grupo PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, en verde los *spots* que ven disminuida su expresión y en amarillo los *spots* que ven aumentada su expresión, ambos en el grupo de ratas alimentada con la dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub> tras compararse con la otras dos dietas experimentales (MUFA<sub>n-9</sub> ó PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>).





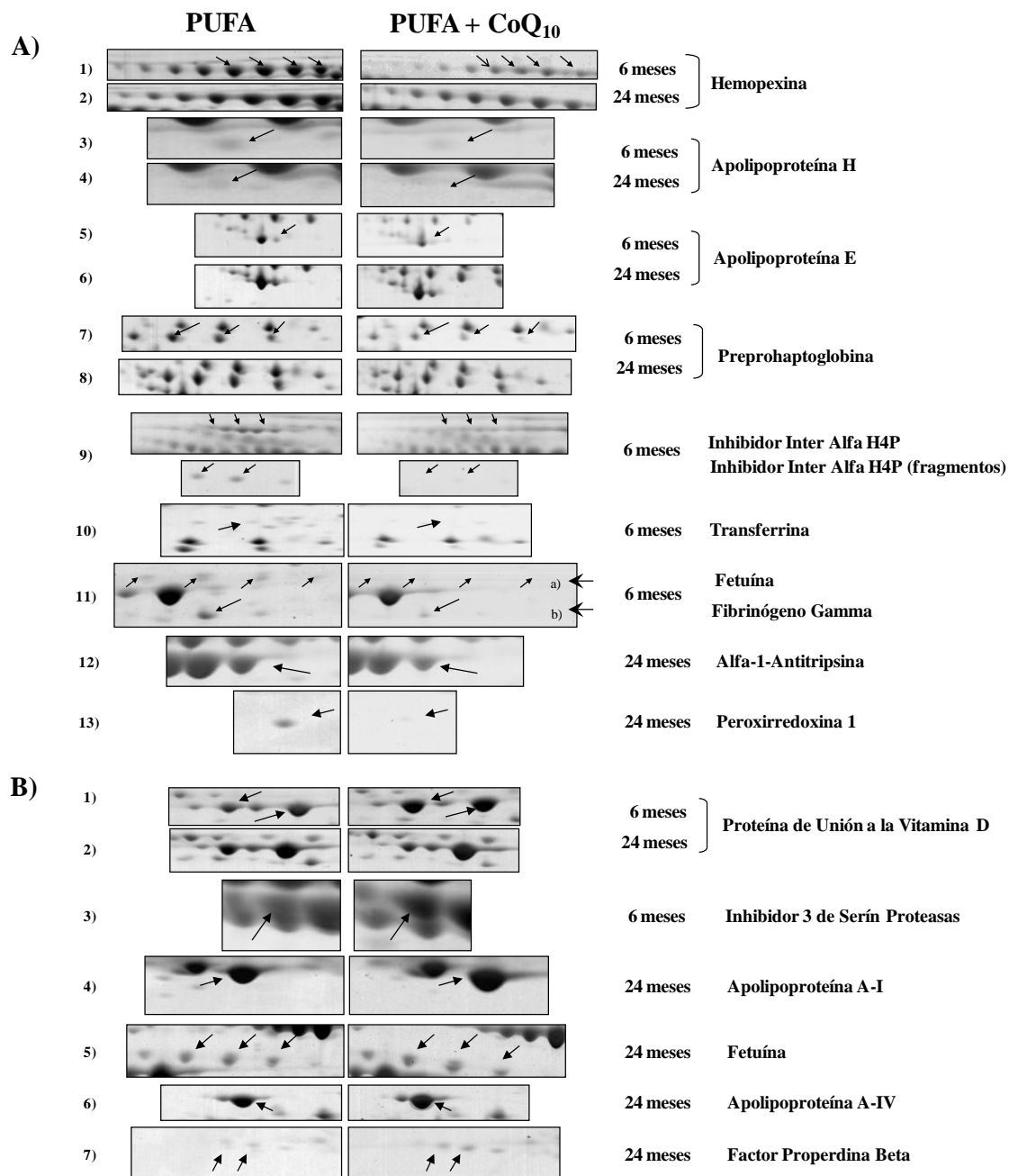
**Figura R\_11.** Imagen representativa de un gel bidimensional sobre el que aparecen señalados y numerados los *spots* que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en el análisis realizado sobre ratas viejas (24 meses) alimentadas con las tres dietas experimentales (PUFA<sub>n-6</sub>, MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>).



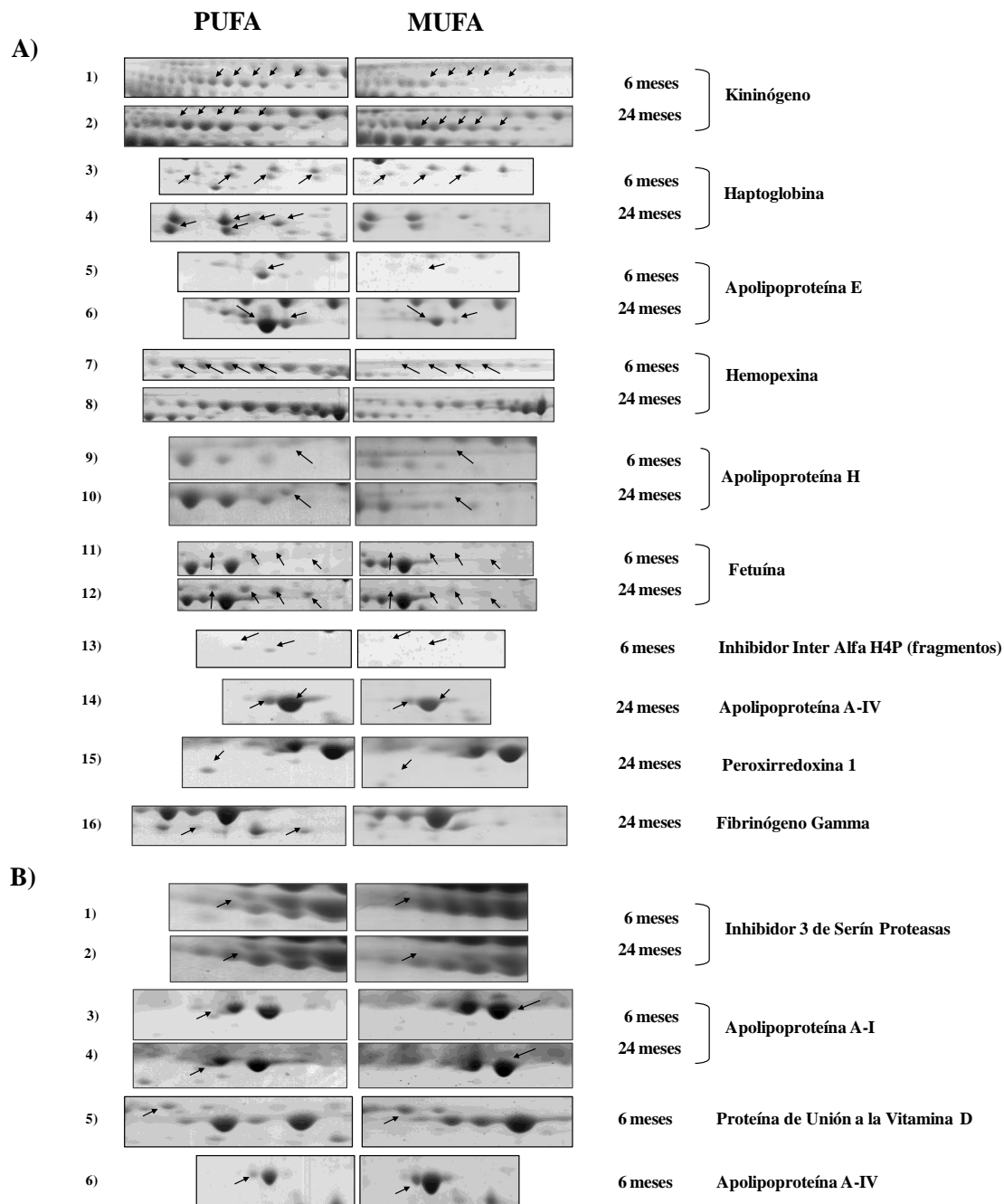
## Resultados y Discusión

SPOT	PROTEÍNA	PUFA vs MUFA (24m)				E	PUFA vs PUFA + Q (24m)				E
		PUFA		MUFA			PUFA		PUFA + Q		
		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)		D.O.	CV (%)	D.O.	CV (%)	
101	Properdina Factor Beta	n.s	n.s	n.s	n.s		0.60	32.30	1.70	45.40	2.83
1101	Haptoglobina	n.s	n.s	n.s	n.s		0.30	44.80	1.30	36.50	4.33
1102	Properdina Factor Beta	n.s	n.s	n.s	n.s		0.80	17.00	2.10	42.70	2.63
1402	Inhibidor de Serín Proteasas III	4.50	44.00	14.90	35.50	3.31	n.s	n.s	n.s	n.s	
2102	Apolipoproteína E	15.50	7.80	0.40	53.50	38.75	n.s	n.s	n.s	n.s	
2704	T- kininógeno I	4.80	16.30	11.90	26.70	2.48	n.s	n.s	n.s	n.s	
2706	T- kininógeno I	n.s	n.s	n.s	n.s		14.30	19.40	26.90	24.90	1.88
3202	Apolipoproteína A-IV	117.20	6.80	75.90	4.20	1.54	130.70	8.70	233.60	32.20	1.79
4101	Apolipoproteína E	8.80	4.80	1.40	78.70	6.29	n.s	n.s	n.s	n.s	
4104	Apolipoproteína E	132.80	20.20	35.00	25.80	3.79	n.s	n.s	n.s	n.s	
4107	Apolipoproteína E	n.s	n.s	n.s	n.s		6.10	10.00	3.20	29.40	1.91
4201	Macroglobulina alfa 1	1.30	34.40	2.30	15.90	1.77	n.s	n.s	n.s	n.s	
4202	Apolipoproteína A-IV	26.70	17.80	2.20	63.80	12.14	n.s	n.s	n.s	n.s	
4402	Alfa 1 Antitripsina	n.s	n.s	n.s	n.s		71.90	11.00	58.90	8.60	1.22
4701	T- Kininogeno I	29.70	6.30	20.40	15.50	1.46	35.40	7.00	41.50	7.30	1.17
4703	T- Kininogeno I	25.90	3.40	13.50	6.40	1.92	n.s	n.s	n.s	n.s	
5003	Apolipoproteína A-I	6.50	26.20	18.80	29.40	2.89	n.s	n.s	n.s	n.s	
5006	Peroxirredoxina 2	3.20	14.10	0.70	18.90	4.57	4.00	18.20	1.30	18.90	3.08
5102	Haptoglobina	20.30	14.10	4.20	63.40	4.83	n.s	n.s	n.s	n.s	
5303	Proteína de Unión a la Vitamina D	49.10	13.50	24.00	21.60	2.05	57.90	15.40	39.70	16.80	1.46
5403	Proteína de Unión a la Vitamina D	n.s	n.s	n.s	n.s		2.40	24.00	5.40	27.30	2.25
5501	Proteína de Unión a la Vitamina D	n.s	n.s	n.s	n.s		10.70	5.80	16.90	22.70	1.58
5601	T- kininogeno I	18.80	2.80	6.40	43.40	2.94	n.s	n.s	n.s	n.s	
5602	T- kininogeno I	8.50	5.60	2.40	67.10	3.54	n.s	n.s	n.s	n.s	
5804	Hemopexina	20.60	7.50	12.30	21.20	1.67	n.s	n.s	n.s	n.s	
6006	Apolipoproteína A-I	62.40	13.10	130.60	25.30	2.09	n.s	n.s	n.s	n.s	
6101	Alfa 1 Macroglobulina	n.s	n.s	n.s	n.s		54.40	17.40	37.30	19.70	1.46
6102	Haptoglobina	25.00	7.30	20.90	8.30	1.20	n.s	n.s	n.s	n.s	
6302	Proteína de Unión a la Vitamina D	11.90	17.30	163.10	12.20	13.71	34.30	91.40	215.30	36.30	6.28
6403	Fetuína	n.s	n.s	n.s	n.s		6.60	28.90	13.80	12.60	2.09
6404	Fetuína	3	6.60	1.20	55.40	2.33	2.70	33.20	6.00	12.00	2.22
6601	Apolipoproteína H	2.30	14.70	0.90	12.60	2.56	n.s	n.s	n.s	n.s	
6701	Hemopexina	37.10	13.60	19.90	18.10	1.86	n.s	n.s	n.s	n.s	
7004	Apolipoproteína A-I	135.40	6.80	237.70	24.00	1.76	167.90	27.30	314.60	16.60	1.87
7101	Haptoglobina	10.30	8.30	5.70	13.90	1.81	12.40	5.70	7.70	14.30	1.61
7202	Fibrinógeno Gamma	2.00	14.40	1.30	14.20	1.54	n.s	n.s	n.s	n.s	
7402	Fetuína	8.00	8.10	2.00	31.80	4.00	8.40	31.20	13.70	4.80	1.63
7406	Fetuína	4.50	10.60	1.10	11.40	4.09	4.90	23.80	8.70	20.70	1.78
7602	Apolipoproteína H	1.20	5.90	0.60	2.20	2.00	1.20	12.40	0	0.00	
7701	Hemopexina	53.80	11.70	28.00	11.20	1.92	57.80	10.90	42.70	23.90	1.35
7702	Hemopexina	59.80	18.40	27.10	11.80	2.21	63.90	12.70	40.40	27.10	1.58
7704	Hemopexina	59.60	19.00	24.80	13.60	2.40	65.20	13.80	31.60	34.40	2.06
7705	Hemopexina	n.s	n.s	n.s	n.s		37.40	29.10	15.90	45.60	2.35
8101	Seroalbúmina (fragmento)	1.00	17.60	0.30	11.40	3.33	n.s	n.s	n.s	n.s	
8307	Fetuína Beta	n.s	n.s	n.s	n.s		0.80	49.60	1.60	22.60	2.00

**Tabla R\_6.** La tabla muestra la lista de los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) tras los análisis realizados en el grupo de ratas de 24 meses de edad alimentadas con las dietas experimentales, de forma que, se presentan los resultados obtenidos tras comparar el grupo PUFA<sub>n-6</sub> frente al grupo MUFA<sub>n-9</sub> y los resultados obtenidos tras comparar el grupo PUFA<sub>n-6</sub> frente al grupo PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>. En las primeras columnas aparecen el número identificativo de cada *spot* y el nombre de la proteína identificada. A continuación se muestran, por grupos de análisis, los datos de cuantificación obtenidos tras el análisis de imagen, donde D.O indica el dato de cuantificación obtenido en cada *spot*; C.V. (%) indica el coeficiente de variación en cada caso y E, el efecto que tiene lugar en cada grupo estudiado mostrado mediante un código de colores, de forma que, en rojo se muestran los *spots* que no aparejen en el grupo alimentado con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, en verde los *spots* que disminuyen y en amarillo los *spots* que aumentan su expresión en el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> tras ser comparada, en cada caso, con las otras dos dietas experimentales (MUFA<sub>n-9</sub> ó PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>).



**Figura R\_12.** Identificación de *spots* que mostraron cambios tras la suplementación de la dieta con CoQ<sub>10</sub>. A) La suplementación de la dieta disminuyó de forma significativa los niveles de Hemopexina (1) (2), Apolipoproteína H (3) (4), Apolipoproteína E (5) (6) y Haptoglobina (7) (8) a los 6 y 24 meses de edad. Inhibidor Inter Alfa H4P (fragmentos) (9), Transferrina (10), Fetuína (a) y Fibrinógeno Gamma (b) (11) a los 6 meses; Alfa -1- Antitripsina (12) y Peroxirredoxina 1 (13) a los 24 meses. B) Por el contrario, la suplementación de la dieta dio lugar al incremento significativo de la Proteína de Unión a la Vitamina D (1) (2) a los 6 y 24 meses de edad; de Inhibidor 3 de Serín Proteasas (3) a los 6 meses; y de Apolipoproteína A-I (4), Fetuína (5), Apolipoproteína A-IV (6) y Factor Properdina Beta (7) a los 24 meses.



**Figura R\_13.** Identificación de *spots* que mostraron cambios tras la ingesta de dietas con diferente contenido graso. A) El consumo de una dieta MUFA <sub>n-9</sub> disminuyó de forma significativa los niveles de Kininógeno (1)(2), Haptoglobina (3) (4), Apolipoproteína E (5) (6), Hemopexina (7) (8), Apolipoproteína H (9) (10) y Fetuína (11) (12) a los 6 y 24 meses de edad; del Inhibidor Inter Alfa H4P (13) a los 6 meses; y de Apolipoproteína A-IV (14), Peroxirredoxina 1 (15) y Fibrinógeno (16) a los 24 meses. B) Por el contrario, la misma dieta dio lugar al incremento significativo de Inhibidor 3 de Serín Proteasas (1) (2) y Apolipoproteína A-I (3) (4) a los 6 y 24 meses y de la Proteína de Unión a la Vitamina D (5) y Apolipoproteína A-IV (6) a los 6 meses de edad

## 6. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE WESTERN BLOT

Con el fin de confirmar algunos de los resultados obtenidos tras los análisis proteómicos realizados en nuestro estudio, se utilizó la técnica de inmunotinción (ó *Western Blot*). Aplicando este método pretendíamos comprobar las diferencias detectadas en los niveles de expresión de algunas de las proteínas identificadas en los análisis realizados en el grupo de ratas jóvenes y viejas (6 y 24 meses de edad) alimentadas con las dietas MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub>, empleando para ello anticuerpos específicos (tabla M\_2 de Materiales y Métodos).

Los niveles observados de **Apolipoproteína E (Apo E)** en el estudio proteómico realizado desveló que había un incremento de la proteína a lo largo del envejecimiento, tanto en el grupo de ratas alimentadas con la dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub> como en el alimentado con la dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub>; pero cuando el grupo de ratas era alimentada con este último tipo de dieta, el incremento era menor que en el caso del grupo que era alimentado con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Los niveles de la proteína observados en las ratas jóvenes son menores en el grupo MUFA<sub>n-9</sub> que en el PUFA<sub>n-6</sub>, lo que nos indica que, desde una edad temprana, los niveles de esta proteína se ven disminuidos tomando una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, lo cual también explicaría los niveles más bajos en este grupo en las ratas viejas al compararse con el otro grupo de intervención dietética. Para validar esta observación, se realizó un experimento de inmunotinción en gel de una dimensión para el que se utilizaron 30 µg de la muestra de plasma representativa para cada grupo e intervención dietética. En el gel apareció una banda de 36KDa que se correspondía con el tamaño de la proteína observado en los geles bidimensionales (figura R\_14-1) y que mostraban el mismo patrón de expresión a lo largo del envejecimiento y con el consumo de ambas dietas.

En el caso de la **Apolipoproteína A-I (Apo A-I)**, en el estudio proteómico encontramos que las ratas alimentadas con una dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub> a lo largo de su vida no modifican los niveles de la proteína de manera significativa; sin embargo, cuando son alimentadas con una dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub>, se observa la disminución de una de sus isoformas. Tanto en el grupo de ratas de 6 como de 24 meses, se observó que

la ingesta de la dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub> aumenta los niveles de la proteína al ser comparada con el grupo de ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Tras realizar la inmunotinción de las muestras para validar estos cambios (figura R\_14-2), apareció una banda de aproximadamente 25 KDa que coincidía con el tamaño de la proteína observado sobre los geles bidimensionales. La cuantificación de las bandas nos confirmó los cambios que habíamos observado en los análisis proteómicos que estudiaban el efecto de la dieta en cada uno de los grupos de edad; sin embargo, disminuyeron los niveles de la proteína a los 24 meses de edad en aquellas ratas que se alimentaron con una dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub>, lo cual no se observó en el estudio proteómico. El efecto observado a lo largo del envejecimiento en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> fue el mismo observado previamente en nuestro estudio proteómico.

En el caso de la **Fetuína-A**, los resultados obtenidos en el análisis proteómico indicaban que la proteína aumentaba de manera llamativa en el grupo de ratas de 24 meses cuando eran comparadas con el grupo de 6 meses, en ambos grupos de intervención dietética. Además, en el grupo de 6 meses, no se veían cambios significativos, cuando se comparaba el grupo alimentado con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> con el grupo alimentado con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, aunque existía una tendencia a la disminución; pero sí se observó una disminución en el grupo de 24 meses en las ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> cuando fue comparado con el grupo de las ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Tras realizar los geles monodimensionales, utilizando para ello 5µg de plasma, tras la inmunodetección se observó una banda de aproximadamente 59KDa (figura R\_14-3), que coincidía con el tamaño de la proteína observada en los geles 2-D, la cual se separaba en varias isoformas. La cuantificación de las bandas confirmó lo observado en los análisis proteómicos, en todos los casos excepto en el en el grupo de ratas jóvenes, donde en este caso obtuvimos una disminución de la banda en el grupo de ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> cuando se comparó con el grupo alimentado con la dieta PUFA<sub>n-9</sub>, efecto que no obtuvimos de forma significativa en los geles 2-D.

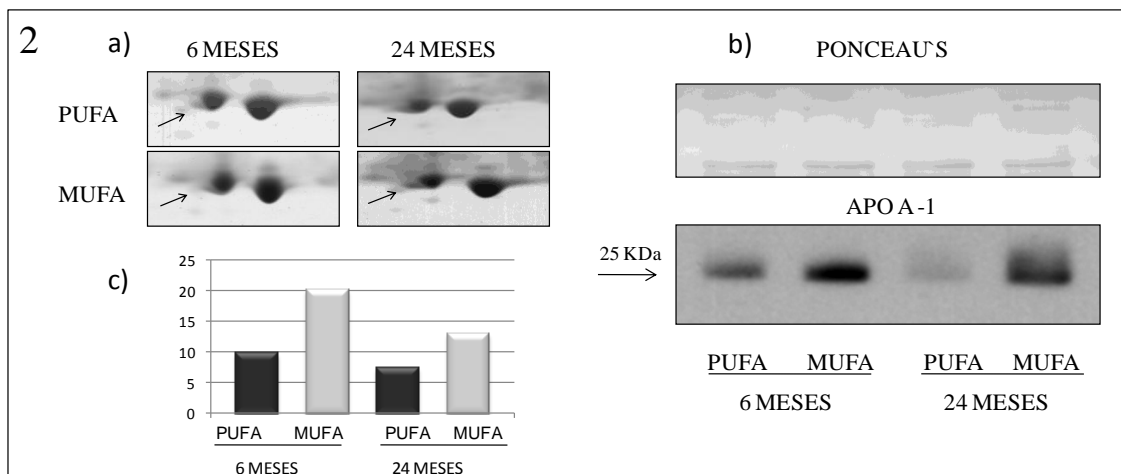
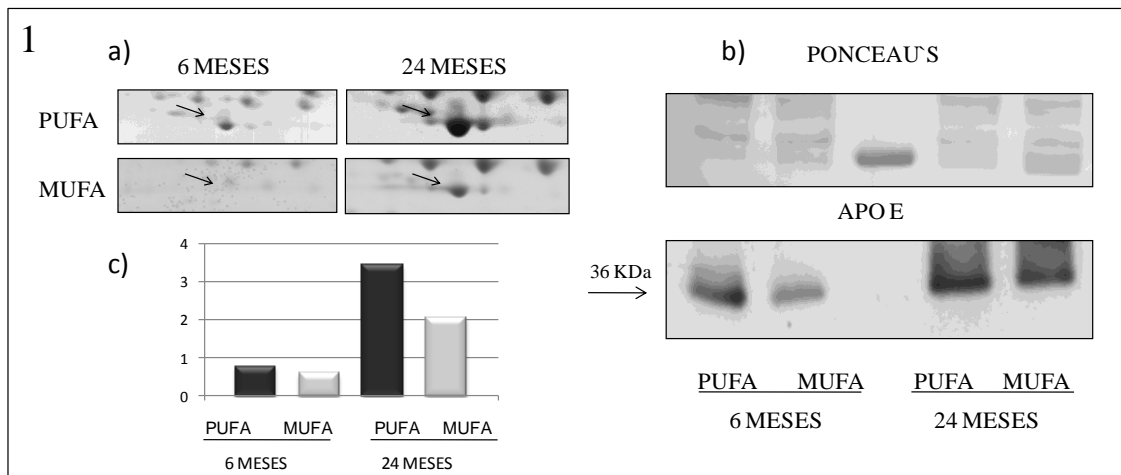
Cuando estudiamos la expresión de **Apolipoproteína A-IV (Apo A-IV)** (figura R\_14-4), observamos que los resultados obtenidos en los análisis proteómicos eran contrarios a los obtenidos tras la inmunodetección. Obtuvimos una banda de 46KDa que

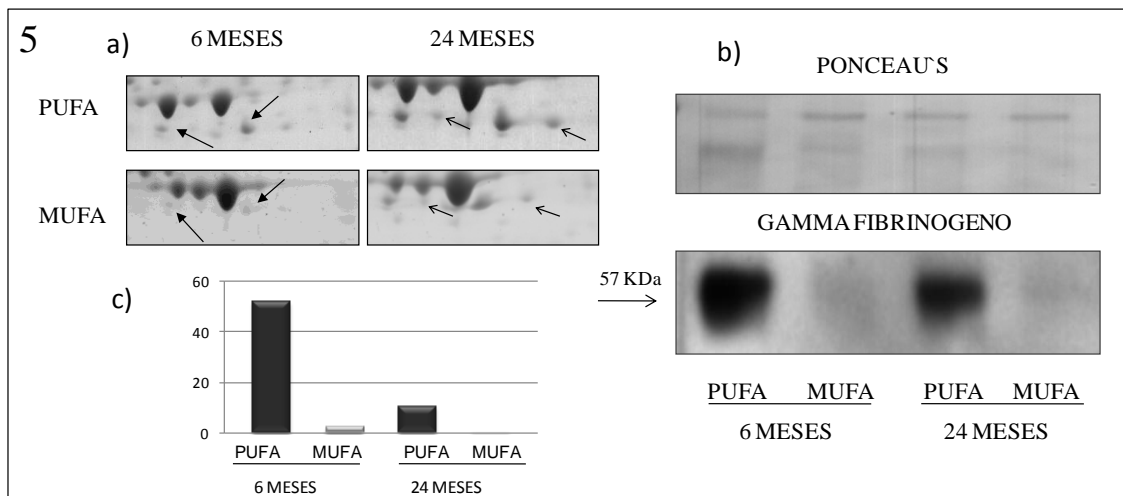
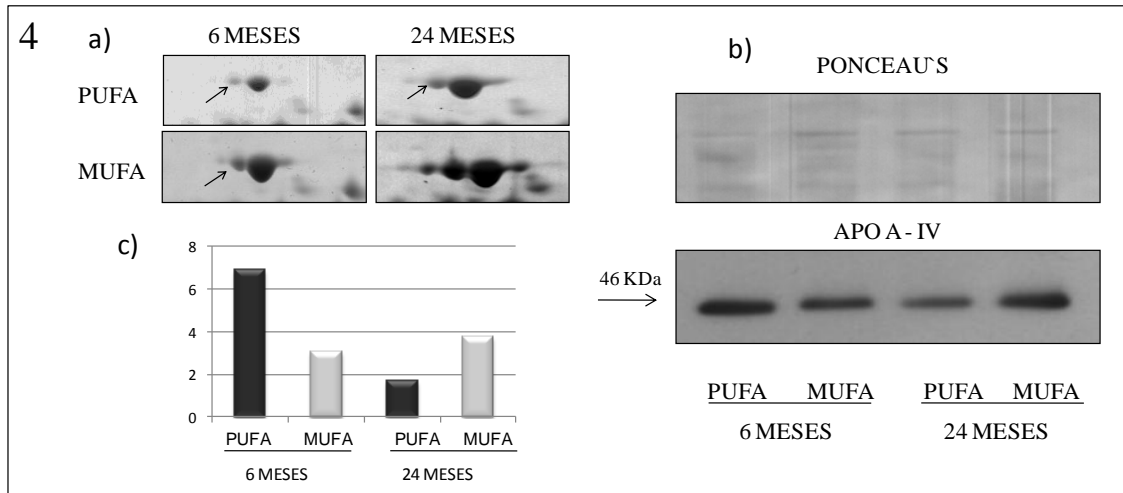
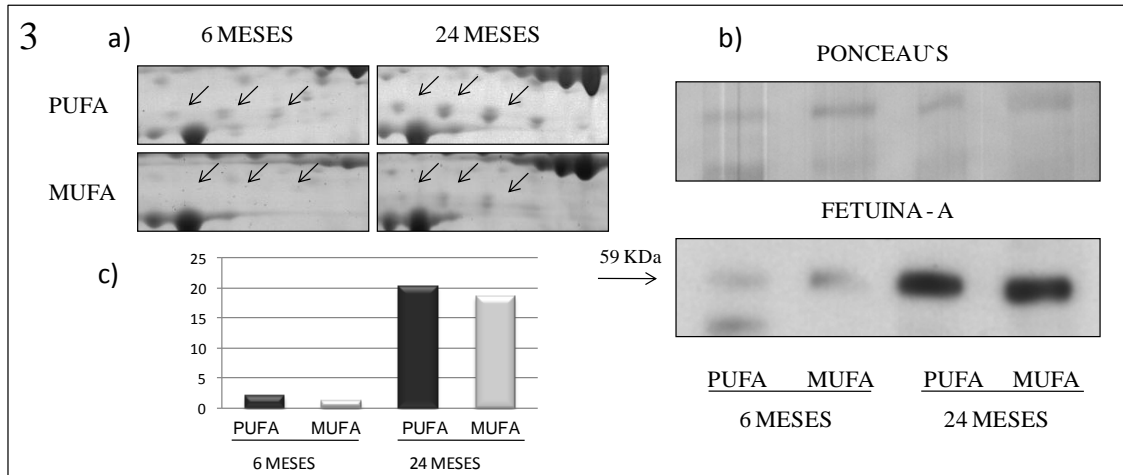
coincidía en tamaño con la proteína obtenida en los geles 2-D; sin embargo, esta se separaba en varias isoformas que poseían el mismo tamaño pero que contenían diferente cantidad en cada una de ellas, de manera que, esto podría darnos una explicación de los resultados obtenidos tras la cuantificación de las bandas. La isoforma que varió en todos los casos era una de las isoformas que se encontraba en menor cantidad, por lo que, es difícil interpretar el resultado de la inmunodetección. De cualquier forma, ésta nos mostró una disminución de la proteína a los 24 meses en el grupo de ratas alimentadas con la dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub> y por el contrario un incremento de la proteína en el mismo grupo de edad cuando se alimentaron a lo largo de toda su vida con una dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub>. Cuando las ratas se alimentaron con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> disminuían los niveles de la proteína al ser comparada con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> en ratas de 6 meses y por el contrario aumentaba con la misma dieta en el grupo de 24 meses.

En el caso de la **Cadena Gamma del Fibrinógeno** (figura R\_14-5), los resultados obtenidos en el análisis proteómico nos mostraron el aumento de la proteína a lo largo del envejecimiento en ambos grupos de intervención dietética; mientras que, no se vieron alterados los niveles en el grupo de 6 meses al comparar ambos grupos dietéticos, pero sí se obtuvo una disminución de alguna de sus isoformas a los 24 meses de edad en el grupo alimentado con la dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub> cuando se comparó con el grupo alimentado con la dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub>. Sin embargo, la inmunodetección dio lugar a una banda de 57 KDa que se vio disminuida a lo largo del envejecimiento cuando las ratas eran alimentadas con ambas dietas de manera independiente. Tanto en el grupo de 6 como de 24 meses, el fibrinógeno disminuyó espectacularmente sus niveles en las ratas alimentadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> al ser comparadas con las ratas alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>.

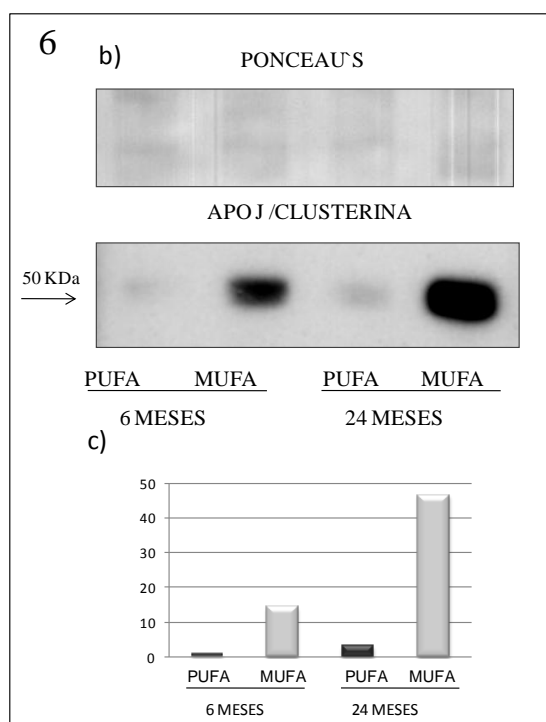
Con el fin de cuantificar los niveles de **Apolipoproteína J / Clusterina**, que consideramos también importantes en nuestro estudio por haber mostrado cambios en los experimentos de intervenciones dietéticas realizados sobre humanos (ver capítulo 2), realizamos la cuantificación sobre las muestras de plasma de ratas. Esta proteína no se detectó sobre los geles bidimensionales, lo cual puede deberse a que las condiciones de separación no han sido las adecuadas y por lo tanto, otras proteínas la han enmascarado en la separación. Aún así, se elaboraron geles monodimensionales,

utilizando para ello 5µg de proteína y se realizó la inmunodetección. La Apolipoproteína J / Clusterina (figura R\_14-6) mostró un tamaño de 50KDa aproximadamente tras la inmunodetección. Los niveles se vieron incrementados a lo largo del envejecimiento en ambos grupos de intervención dietética, siendo mucho más relevantes en el grupo de ratas alimentadas con la dieta rica en MUFA <sub>n-9</sub>. Cuando estudiamos lo que ocurría por grupos de edad se observó que, tanto en 6 como en 24 meses, los niveles de la proteína se veían incrementados con la dieta MUFA <sub>n-9</sub> al ser comparada con la dieta PUFA <sub>n-6</sub>.





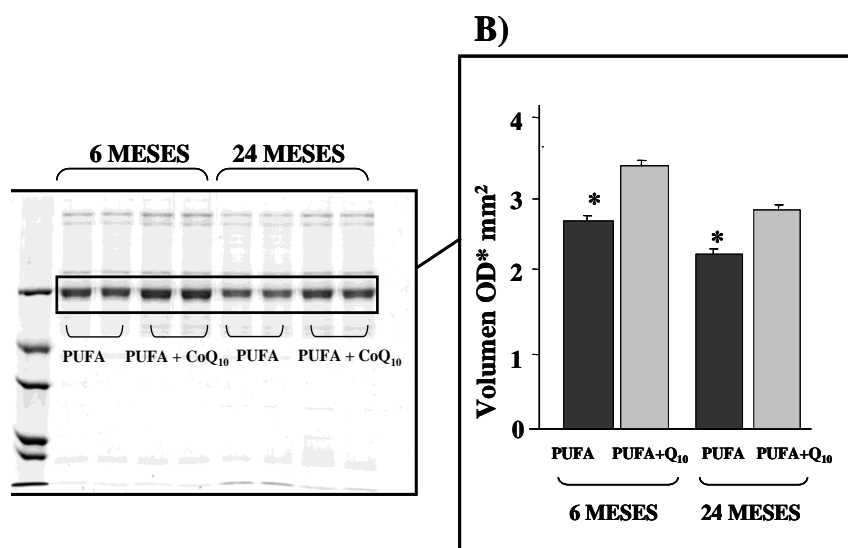




**FIGURA R\_14.** Resultados de las validaciones realizadas sobre las muestras de plasma para confirmar los resultados obtenidos en algunos de los estudios proteómicos realizados (1-5). En la figura 6 se muestra la cuantificación de Apolipoproteína J. En cada una de las figuras se observa el patrón de puntos de la proteína tras separarse la muestra en geles bidimensionales (a), la cuantificación de cada proteína mediante inmunodetección, utilizando en cada caso un anticuerpo específico (b) y la cuantificación de la banda en geles monodimensionales (OD x mm<sup>2</sup>) utilizando el software de análisis de imagen Quantity-One (c). 1) Apolipoproteína E (APOE); 2) Apolipoproteína A-I (APO A-I); 3) Fetuína-A ( $\alpha$ -2-HS Glicoproteína); 4) Apolipoproteína A-IV (APO A-IV); 5) Fibrinógeno Gamma y 6) Apolipoproteína J / Clusterina.

A pesar de que, para llevar a cabo los estudios proteómicos, se eliminaban previamente del plasma las proteínas mayoritarias (Albúmina e IgGs), en los estudios realizados para conocer el efecto de la suplementación de la dieta con CoQ<sub>10</sub> nos resultó llamativa la diferencia de concentración de albúmina que presentaban los geles bidimensionales al comparar ambos grupos de intervención dietética. Los niveles que encontramos en el grupo de ratas alimentadas con la dieta suplementada era mayor que el que observábamos en el grupo de ratas alimentado con la dieta no suplementada en ambos grupos de edad (6 y 24 meses). Unos niveles bajos de albúmina en suero están asociados con el incremento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y, por consiguiente, con una mayor mortalidad. Además, la albúmina es un reactante negativo de la fase aguda en los procesos inflamatorios [290]. Para comprobar esta observación, cuantificamos los niveles de albúmina en geles monodimensionales teñidos con Coomassie coloidal obtenidos tras separar 3 $\mu$ g de plasma sin deplecionar. Como se observa en la figura R\_15. A y B, la cuantificación de la banda de 66KDa obtenida, nos mostró una disminución de los niveles de albúmina que tenía lugar al comparar ratas de 24 con 6 meses de edad, lo cual concuerda con las observaciones previas llevadas a cabo por otros autores [291]. Aunque la albúmina plasmática disminuyó con el envejecimiento en ambas dietas (tanto en la dieta control como en la suplementada con

CoQ<sub>10</sub>), la administración del antioxidante incrementó de manera significativa los niveles de albúmina en ambas edades, de forma que los niveles de esta proteína en 24 meses en el grupo de ratas con dieta suplementada fueron equivalentes a los del grupo de 6 meses con dieta no suplementada. Se ha propuesto que, en ratas, la disminución relacionada con la edad en la albúmina sérica puede ser responsable, al menos en parte, de la disminución de los niveles de grupos tioles en el suero y de un cambio en el equilibrio redox hacia un estado pro-oxidante durante el envejecimiento [292]. Además del papel demostrado del CoQ<sub>10</sub> como inhibidor de la peroxidación lipídica y como regenerador del  $\alpha$ -tocoferol en las lipoproteínas séricas [293-295], el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> podría también mejorar la capacidad antioxidante del plasma sanguíneo aumentando los niveles de albúmina.



**Figura R\_15.** Efectos de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> sobre los niveles de albúmina. A) Se muestra un gel monodimensional donde se han separado muestras del grupo de ratas de 6 y 24 meses de edad alimentadas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>. B) Niveles de albúmina tras la cuantificación (OD X mm<sup>2</sup>). La albúmina plasmática disminuyó con el envejecimiento mientras que el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> aumentó los niveles de dicha proteína tanto a 6 como a 24 meses de edad.

## 7. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en cada uno de los estudios realizados anteriormente conseguimos identificar con éxito un total de 76 *spots*, los cuales corresponden a 18 proteínas diferentes. Esto es debido a que las proteínas plasmáticas sufren, tras su síntesis, diferentes modificaciones posttraduccionales, de manera que, una vez separadas en geles bidimensionales, estas se presentan formando lo que se denomina "trenes de proteínas", que no es sino la misma proteína pero con diferente punto isoeléctrico debido a las diferentes cargas que les otorgan los grupos fosfato u otras modificaciones posttraduccionales. Estas 18 proteínas encontradas en nuestro estudio se clasificaron según su función en 5 categorías:

1. Transporte de Metabolitos: Haptoglobina, Hemopexina, y Proteína de Unión a la Vitamina D.
2. Protección Antioxidante: Seroalbúmina, Peroxirredoxina 2 y Transferrina (además de Haptoglobina y Hemopexina).
3. Metabolismo Lipídico y Transporte: Apolipoproteína A-I (ApoA-I), Apolipoproteína A-IV (ApoA-IV) y Apolipoproteína E (ApoE),
4. Coagulación Sanguínea: Precursor de la cadena Gamma del Fibrinógeno, T - Kininógeno I y Apolipoproteína H ( $\beta$ -2-GP1).
5. Inflamación y Respuesta Inmune: Inhibidor Inter alfa H4P, Factor Properdina beta, Alfa-1-Antitripsina, Inhibidor de Serín Proteasas III, Alfa-2-HS Glicoproteína (Fatuin-A) y Alfa-1-Macroglobulina (así como Haptoglobina y Hemopexina).

Las 18 proteínas y sus correspondientes funciones aparecen resumidas en las tablas R\_7-11.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Haptoglobina	Es una proteína sérica que une hemoglobina y permite su metabolización en el hígado. Tiene funciones antioxidantes ya que previene del estrés oxidativo provocado por la hemoglobina libre.
Hemopexina (Beta-1B-glycoprotein)	Glicoproteína que se une al grupo hemo y lo transporta al hígado para su degradación y recuperación de hierro, después de lo cual la hemopexina libre vuelve a la circulación.
Proteína de unión a la Vitamina D (VDBP)	Glicoproteína sérica abundante, la cual transporta esteroides de vitamina D y une actina monomérica.

**Tabla R\_7.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Transporte de Metabolitos``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Seroalbúmina	Posee múltiples funciones, entre ellas: transporte de ácidos grasos de cadena larga y esteroides, unión y solubilización de drogas, reguladora de la presión coloidal y función antioxidante.
Peroxisredoxina 2 (Prxs-2)	Enzima antioxidante que puede controlar los niveles de peróxido inducidos por citoquinas, y en consecuencia, mediar en la transducción de señales en células de mamíferos. Las peroxirredoxinas pueden ser reguladas por cambios en la fosforilación, redox y posibles estados de oligomerización. Puede participar en la cascada de regulación del TNF-alfa
Transferrina	Transporta hierro del intestino a depósitos de ferritina en diferentes tejidos, y de allí a donde sean necesarios. Protección antioxidante.

**Tabla R\_8.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Protección Antioxidante``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Apolipoproteína A-I (APO A-I)	Participa en el transporte reverso del colesterol de los tejidos al hígado. Lipoproteína del complejo HDL. Cofactor de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa).
Apolipoproteína A-IV (APO A-IV)	Componente principal del complejo HDL y los quilomicrones. Podría participar en el catabolismo de quilomicrones y VLDL. Activador de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa).
Apolipoproteína E (APO E)	Media la unión, internalización y catabolismo de lipoproteínas. Puede servir de ligando para el receptor de LDL (APOB / E) y para el receptor específico de ApoE en los tejidos hepáticos.

**Tabla R\_9.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Metabolismo Lípidico y Transporte``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Fibrinógeno Gamma (FGG)	El fibrinógeno tiene una doble función en la coagulación: al romperse genera monómeros que polimerizan en fibrina y actúa como cofactor en la agregación plaquetaria.
T-Kininógeno 1 (T-KG)	Los kininógenos son inhibidores de tiol-proteasas y participan en la coagulación inhibiendo la agregación de plaquetas inducida por trombina y plasmina.
Apolipoproteína H ( $\beta_2$ -glycoprotein 1)	Proteína con múltiples funciones, entre ellas, la de unirse a cardiolipina formando un complejo con afinidad a fosfolípidos. Además, tiene función anticoagulante mediante la inhibición de factores de coagulación y se ha demostrado su participación en la activación del plasminógeno.

**Tabla R\_10.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría ``Coagulación Sanguínea``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Inhibidor Inter Alfa H4 (ITIH4) (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)	Pertenece a una familia de inhibidores de proteasas plasmáticas de origen hepático, denominadas de forma colectiva como familia de inhibidores inter-alfa. Los niveles de este inhibidor incrementan de manera significativa bajo condiciones inflamatorias
Properdina Beta	Regulador de la vía alternativa del complemento mediante su unión a C3bBb. Estudios previos sugieren que la función de properdina depende de múltiples interacciones entre sus subunidades con sus ligandos
Antitripsina Alfa 1 (inhibidor de proteasas alfa 1)	Es un inhibidor de proteasa sérico (serpina). Protege a los tejidos de las proteasas presentes principalmente en las células inflamatorias, en especial la elastasa. Es un reactante de fase aguda.
Inhibidor Serín Proteasa III	Proteína inhibidora de serín proteasas que se induce en respuesta a los procesos inflamatorios.
Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuin-A)	Proteína de síntesis hepática que inhibe la osteogénesis y puede promover la calcificación arterial. Es un reactante de fase aguda.
Alfa-1-Macroglobulina	Proteína de fase aguda cuya función principal es la de neutralizar las enzimas proteolíticas.

**Tabla R\_11.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría ``Inflamación y Respuesta Inmune``

## 8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se discuten todas las proteínas que han presentado cambios en este estudio:

### 1. *Transporte de Metabolitos.*

La **Preprohaptoglobina** incrementó en mayor o menor medida con las tres dietas experimentales en el grupo de ratas de 24 meses cuando fueron comparadas con el grupo de ratas de 6 meses de edad. Esta proteína disminuyó significativamente hasta 5 veces con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> a los 6 meses de edad y con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> del orden de 5 y 2,6 veces a los 6 y 24 meses de edad respectivamente, al ser comparada ésta con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Por otro lado, la **hemopexina** sufrió diferentes cambios con el envejecimiento dependiendo de la dieta que habían consumido las ratas; de manera que, encontramos una disminución de algunas de sus isoformas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>, un incremento de otras isoformas diferentes con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y cambios no significativos tras la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Esta proteína disminuyó significativamente (alrededor de 2 veces) tras el consumo de una dieta suplementada y tras el consumo de una dieta MUFA<sub>n-9</sub> (7.6 y 1.8 veces) a los 6 y 24 meses de edad respectivamente. La **Haptoglobina** es una proteína sérica que une hemoglobina y permite su metabolización en el hígado. Tiene funciones antioxidantes ya que previene el estrés oxidativo provocado por la hemoglobina libre [296]. Además, se ha mostrado como un marcador potencial para el cáncer [270]. La **Hemopexina** es una glicoproteína plasmática con elevada afinidad por los grupos hemo, el cual es así transportado al hígado. La presencia de grupos hemo en el plasma es debida a la oxidación de la hemoglobina, la cual se encuentra presente durante la enucleación de los eritoblastos o en estados de hemólisis intramedular o intravascular. En humanos la hemólisis está asociada con condiciones patológicas como la isquemia. La hemopexina inhibe también algunas de las reacciones oxidativas catalizadas por el grupo hemo libre y puede proteger los tejidos de la oxidación bajo condiciones en las cuales ocurra una liberación de grupos hemo [297, 298]. Estudios previos han documentado que los niveles de haptoglobina y hemopexina incrementan en el suero de rata con el envejecimiento, y sus niveles se incrementaron de forma más severa en animales cuyo envejecimiento fue acelerado por la irradiación [291]. Resulta interesante el hecho de que estos cambios

relacionados con la edad fueron atenuados tanto por la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> como por la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Esto nos está indicando que la dieta genera un estado protector en los primeros momentos de vida y que además, lo mantiene a lo largo del envejecimiento.

La **proteína de Unión a la Vitamina D** se separa en los geles bidimensionales en varias isoformas. Con el envejecimiento disminuye uno de los *spots* cuando las ratas se alimentan con una dieta PUFA<sub>n-6</sub> y por el contrario, incrementa otra de sus isoformas tras la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, no encontrando cambios significativos con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Esto es debido a modificaciones de los niveles de unas isoformas con respecto a otras (modificaciones postraduccionales) más que a cambios sobre los niveles totales de la proteína, por lo que es difícil interpretar estos resultados y sería necesario realizar más estudios para elucidar el significado fisiológico de estas modificaciones. Por otro lado, tanto a los 6 como a los 24 meses de edad, la proteína incrementó tanto con una dieta MUFA<sub>n-9</sub> (2.6 y 2 veces respectivamente) como con una dieta PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> (2 y 3.3 veces respectivamente) cuando se comparaban con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. La proteína de unión a la vitamina-D, también conocida como Gc-globulina, es una glicoproteína sérica abundante, la cual transporta esteroides de vitamina D y una actina monomérica [299], por lo que le permite actuar como molécula “secuestradora”, favoreciendo la eliminación y evitando la polimerización de la Actina en el plasma [300]. Aunque la función más conocida de esta proteína sea el control de calcio y el metabolismo del hueso, se le han atribuido otras muchas funciones, entre las que destacan la prevención de ciertos tipos de cáncer [301]. El hecho de que tanto el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> como el consumo de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> incrementen los niveles de la proteína de unión a la vitamina D puede indicarnos que tanto el CoQ<sub>10</sub> como los ácidos grasos monoinsaturados de la dieta pueden influenciar la osteogénesis. Con relación a los niveles de la proteína observados con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, estudios realizados sobre ratas alimentadas a lo largo de su vida con una dieta MUFA<sub>n-9</sub> frente a una dieta PUFA<sub>n-6</sub> mostraron que el consumo prolongado de aceite de oliva mejora el contenido mineral óseo total (aproximadamente un 10%) [46]. Por otro lado, es importante hacer notar que, comparadas con sus controles correspondientes, las ratas alimentadas a lo largo de su vida con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados y suplementada con CoQ<sub>10</sub> muestran un incremento en la densidad mineral del hueso

[302]. Este efecto puede estar también relacionado con el papel del CoQ<sub>10</sub> en el suero como antioxidante ya que se conoce que los niveles de estrés oxidativo están asociados negativamente con la densidad mineral del hueso, y los niveles de antioxidantes son menores en pacientes con osteoporosis [303, 304].

## 2. *Protección Antioxidante.*

La **Peroxirredoxina Tipo 2** incrementó con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (con y sin suplementar) y disminuyó con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> a los 24 meses cuando se compararon estas ratas con las de 6 meses de edad. A pesar de que no se observaron diferencias significativas con el suplemento de la dieta a los 6 meses, esta proteína disminuyó entre 3 y 4 veces a los 24 meses de edad. Por otro lado, la dieta MUFA<sub>n-9</sub> incrementó los niveles (4 veces) a los 6 meses y los disminuyó (3 veces) a los 24 meses. Las peroxirredoxinas pertenecen a una familia de peroxidases presentes en todas las especies, que pueden reducir una amplia gama de peróxidos, incluyendo los hidroperóxidos tóxicos de los fosfolípidos, jugando así un importante papel en la protección antioxidante [305, 306]. Esta proteína se induce en condiciones de estrés oxidativo provocado por la deficiencia de vitamina E en la alimentación [306]. El incremento de la peroxirredoxina observado a lo largo del envejecimiento en el grupo de ratas alimentado con la dieta PUFA<sub>n-9</sub> puede estar indicando el efecto prooxidante de este tipo de ácidos grasos en el organismo con la consecuente inducción de la proteína. Por el contrario, la ingesta de una dieta MUFA<sub>n-9</sub> disminuye los niveles reforzando así su papel antioxidante. Por tanto, resulta razonable interpretar que la disminución en los niveles plasmáticos de peroxirredoxina que fue observada en los animales viejos alimentados con las dietas MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> (así como la disminución de hemopexina y preprohaptoglobina, ver anteriormente) pueden ser indicativos de un mejor estado antioxidante comparado con el grupo de animales alimentados con una dieta PUFA<sub>n-6</sub>.

Aparecieron fragmentos de **Transferrina** en los geles estudiados. Esta proteína no se vio afectada con ninguna de las dietas estudiadas al comparar el grupo de ratas jóvenes con el grupo de ratas viejas. Sin embargo, disminuyó del orden de 80 veces con la dieta suplementada a los 6 meses de edad, no encontrando cambios significativos a



los 24 meses. Tampoco se encontraron cambios significativos al comparar la dieta MUFA<sub>n-9</sub> con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> en ningún grupo de edad. La transferrina es una globulina, cuya principal función es la de transportar hierro en su forma férrica, además de unir otros metales. Es importante destacar la capacidad antioxidante de la transferrina, la cual evita la peroxidación lipídica mediante su unión al metal [307]. No olvidemos que el hierro participa en la génesis de derivados oxigénicos muy agresivos. Estudios realizados previamente han destacado los importantes efectos carcinogénicos del metal libre, ya que este puede catalizar la formación de radicales hidroxilos, suprimiendo así la actividad de células de defensa y la multiplicación celular [308]. La acentuada disminución de transferrina en el grupo de ratas alimentadas con la dieta suplementada puede estar indicándonos el posible estado protector que el CoQ<sub>10</sub> aporta al organismo en los primeros momentos de la vida, requiriendo por ello en menor medida la presencia de esta proteína.

### *3. Metabolismo y transporte lipídico.*

Los niveles de **Apolipoproteína A-1** se vieron también alterados por el consumo de las diferentes dietas. Los niveles de la proteína disminuyeron de forma significativa tras el consumo de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> en el grupo de ratas de 24 meses de edad al compararse con el grupo de 6 meses. No encontramos cambios significativos tras el consumo de la dieta PUFA<sub>n-6</sub> (con y sin suplementar) a lo largo del envejecimiento. Estos resultados coincidieron con los obtenidos tras la inmunotinción (figura R\_12.2). En el grupo de ratas jóvenes, la proteína incrementó (6 veces) tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, no encontrando cambios significativos tras la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Por otro lado, en el grupo de ratas viejas, la proteína incrementó tanto con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> como con la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> (del orden de 2 veces en ambos grupos). Todos estos resultados coincidieron con los obtenidos tras la inmunotinción (figura R\_12.2). La Apolipoproteína A-I (ApoA-I) es la apolipoproteína principal en las partículas HDL, estando fuertemente asociados sus niveles plasmáticos a los de estos complejos anti-aterogénicos, que son los principales mediadores del transporte reverso del colesterol desde el vaso sanguíneo hacia el hígado [309]. Se ha sugerido la existencia de una relación inversa entre los niveles plasmáticos de ApoA-I y la enfermedad coronaria [310]. Es importante destacar que unas

concentraciones elevadas de Apo A-1 están asociadas con una baja mortalidad y que retrasan alrededor de 5 años el riesgo de sufrir un infarto de miocardio en aquellos pacientes en los cuales se ha realizado un *bypass* coronario [311]. El suplemento de la dieta con  $\alpha$ -tocoferol, otro antioxidante lipofílico como el CoQ<sub>10</sub>, también eleva los niveles plasmáticos de Apo A-1 en humanos sanos [312]. Nuestros resultados hacen pensar que el incremento de esta proteína tanto a los 6 como a los 24 meses de edad tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, es un reflejo del estado protector antiaterogénico que mantienen las ratas en edad adulta con este tipo de dietas. Es importante destacar el incremento de la proteína tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> en el grupo de ratas viejas, lo cual atribuye al CoQ<sub>10</sub> un efecto cardioprotector.

Los niveles de **Apolipoproteína A-IV** no se vieron modificados significativamente con ninguna de las dietas administradas en las ratas de 24 meses de edad al compararse estas con ratas de 6 meses de edad. La proteína incrementó significativamente (6 veces) con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> en ratas jóvenes y no encontramos cambios significativos cuando el mismo grupo de edad se alimentó con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. En el grupo de ratas viejas, la proteína disminuyó significativamente (alrededor de 7 veces) tras la dieta MUFA<sub>n-9</sub> e incrementó (18 veces) tras la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Contradictoriamente, los resultados obtenidos tras la inmunotinción fueron diferentes a los obtenidos en los estudios proteómicos (figura R\_12.4). Esto podría deberse a que la apolipoproteína A-IV se separa en geles bidimensionales en diferentes isoformas que difieren en punto isoeléctrico y en abundancia. Los cambios de expresión detallados para esta proteína afectaron solamente a alguna de sus isoformas y no a la totalidad, por lo que la cuantificación total de la misma que nos aporta la inmunotinción puede dar lugar a resultados contradictorios. La Apolipoproteína AIV es una glicoproteína de 46 kDa que circula en el plasma formando parte de los quilomicrones, VLDL, HDL, o bien sin asociarse a lipoproteínas [313-315]. La ApoA-IV juega un papel importante en el transporte reverso del colesterol y promueve la formación de partículas HDL [316, 317], mediante la activación de la enzima Lecitín Acil Colesterol Transferasa (LCAT) [318]. Se ha demostrado que la sobreexpresión de esta proteína tiene un efecto protector sobre ratones susceptibles a padecer aterosclerosis, reduciendo las lesiones [319, 320]. Este efecto protector puede estar ligado a la capacidad que tiene la proteína para inhibir la

oxidación de las lipoproteínas [321]. Los datos obtenidos en nuestros estudios sugieren un procesamiento diferente de las isoformas ligado al consumo de una dieta MUFA<sub>n-9</sub>, ya que tanto en 6 como en 24 meses la dieta afecta al procesamiento de estas isoformas más que a los niveles globales de la proteína. Cabe destacar la importancia del incremento de la isoforma más abundante que encontramos en las ratas viejas, tras ser alimentadas con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>.

La **Apolipoproteína E** incrementa significativa e independientemente de la dieta administrada en el grupo de ratas de 24 meses al ser comparadas con el de 6 meses. Los niveles de la proteína se vieron disminuidos con una dieta MUFA<sub>n-9</sub> (17 y 16 veces) y con una dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> (1.5 y 1.9 veces) a los 6 y 24 meses de edad respectivamente. La apolipoproteína E desempeña un papel importantísimo en el metabolismo del colesterol y los triglicéridos, interviniendo en el catabolismo de los quilomicrones y de las partículas VLDL [322]. Son interesantes los estudios realizados sobre ratones deficientes en ApoE para estudiar los mecanismos de la aterogénesis [323]. Entre ellos, encontramos un estudio realizado sobre este tipo de ratones a los que el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> y Vitamina E hace disminuir los procesos ateroscleróticos [324]. Estos datos avalan nuestros resultados obtenidos en el grupo de ratas suplementadas con CoQ<sub>10</sub>, en el que disminuyeron los niveles de la proteína en ratas jóvenes y viejas, ya que niveles elevados de la proteína están asociados a mortalidad cardiovascular. Además, se sabe que uno de los primeros eventos que ocurren en los procesos ateroscleróticos es la oxidación de las LDL, por lo que el aporte de CoQ<sub>10</sub> con la dieta puede frenar estos procesos. Un estudio realizado sobre una población envejecida de sujetos (85 años) concluyó que a edades avanzadas, el incremento de los niveles de Apo E en plasma preceden al incremento de Proteína C Reactiva y está fuertemente asociado con la mortalidad cardiovascular, independientemente del genotipo de la apolipoproteína y los lípidos plasmáticos [325], por lo que de nuevo, la disminución de la proteína tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y la dieta suplementada con Co<sub>10</sub>, refuerzan las características cardioprotectoras de este tipo de dietas.

#### 4. *Coagulación sanguínea.*

Los niveles del precursor de la **Cadena  $\gamma$  del Fibrinógeno** disminuyeron 2 veces con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> a los 6 meses de edad, aunque no se observaron efectos significativos a los 24 meses. Por otro lado, también disminuyó la proteína 1,5 veces a los 24 meses de edad, no encontrando cambios significativos a los 6 meses. El fibrinógeno está fuertemente, consistente e independientemente relacionado con el riesgo cardiovascular [326]. Resultan llamativos numerosos estudios experimentales que indican que el tratamiento exógeno con CoQ<sub>10</sub> puede ser beneficioso para las patologías cardiovasculares [324], y existe una relación entre la baja concentración de CoQ<sub>10</sub> plasmática y la enfermedad coronaria en humanos [327]. Los cambios observados en las proteínas plasmáticas debidos a la dieta suplementada por una lado y la dieta MUFA<sub>n-9</sub> por otro, podrían explicar, al menos parcialmente, estos efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular.

La **Apolipoproteína H** plasmática ( $\beta$ 2-glicoproteína I,  $\beta$ 2GPI) disminuyó en ambos grupos de edad (6 y 24 meses) tras el consumo independiente de las dietas MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub>, al compararse ambas con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Dentro del grupo de animales suplementados, los niveles de  $\beta$ 2GPI se redujeron a la mitad a los 6 meses (comparado con los correspondientes controles) y casi no se detectó la proteína a los 24 meses.  $\beta$ 2GPI es la diana antigénica principal para los anticuerpos antifosfolípido en pacientes con síndrome antifosfolipídico y se ha demostrado su participación en la activación del plasminógeno. Aunque el papel fisiológico exacto de  $\beta$ 2GPI no se conoce bien [328], se sabe que la proteína forma complejos con las LDL oxidadas, que representan un producto metabólico común relevante para la aterosclerosis y constituyen un factor de riesgo significativo para las complicaciones aterotrombóticas en los pacientes autoinmunes [329]. Por otro lado, se le han atribuido propiedades anticoagulantes [330, 331]. De hecho, se sabe que puede intervenir en diversos puntos de la cascada de coagulación [332] y recientemente ha sido propuesto como marcador de infarto cerebral [333]. Los animales alimentados con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> disminuyeron los niveles de la proteína 2 veces a los 6 meses y casi no se detectó a los 24 meses, lo cual refuerza los beneficios del consumo prolongado de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados.

Sobre los niveles de **T- Kininógeno** encontramos que, tras el consumo prolongado de las diferentes dietas, la mayoría de las isosformas que constituyen la proteína, incrementaron con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> en las ratas viejas al ser comparadas con las ratas jóvenes. Por otro lado, el efecto del consumo prolongado de la dieta PUFA<sub>n-9</sub> no era tan claro, ya que algunas de las isoformas incrementaban y otras disminuían. Esta proteína disminuyó a los 6 meses de edad tras el consumo de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, 2 y 1.5 veces respectivamente, al compararse con la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Por el contrario, encontramos una disminución (alrededor de 3 veces) tras el consumo de una dieta MUFA<sub>n-9</sub> y un incremento (1.5 veces) tras la dieta suplementada en el grupo de ratas viejas. El kininógeno es una proteína multifuncional cuya participación en la vía intrínseca de la coagulación está bien establecida, formando parte del sistema Kalikreína-Kininas [334, 335]. El procesamiento proteolítico del Kininógeno implica la liberación del nonapéptido denominado Bradikinina, un mediador vasoactivo y proinflamatorio, mientras que el resto de la molécula posee propiedades antiadhesivas [336] y de inhibición de la agregación plaquetaria [337]. Por lo tanto, la disminución de los niveles de la proteína tras el consumo de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados en ambos grupos de edad contribuye a la disminución de un estado inflamatorio. Por otro lado, el incremento de la proteína tras el consumo de una dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> en ratas envejecidas, atribuye al antioxidante un papel importante en el mantenimiento de estados anticoagulantes, lo cual se refuerza si tenemos en cuenta lo observado sobre los niveles de fibrinógeno (ver apartado correspondiente).

##### *5. Proteínas de fase aguda.*

Junto con la Hemopexina y Preprohaptoglobina (ver anteriormente), otra proteína de la fase aguda se vio modificada tras el consumo de las diferentes dietas. El **Inhibidor Inter- $\alpha$  de la cadena pesada H4P** disminuyó con el consumo de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (3 veces) y PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> (más de 10 veces) a los 6 meses de edad, al ser comparadas con una dieta PUFA<sub>n-6</sub>; no encontrando cambios significativos en el grupo de 24 meses. El Inhibidor Inter- $\alpha$  de la cadena pesada H4P, pertenece a una familia de

inhibidores de proteasas plasmáticas de origen hepático, denominadas de forma colectiva como familia de inhibidores inter-alfa. Los niveles de este inhibidor incrementan de manera significativa bajo condiciones inflamatorias [338].

Por otro lado, los niveles del *precursor de Alfa-1- Antitripsina* se vieron reducidos a la mitad en el grupo de ratas de 24 meses alimentadas con la dieta suplementada, aunque no se observaron cambios significativos a los 6 meses. También observamos que la proteína incrementaba con el consumo prolongado de una dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Esta proteína, al igual que la anterior, se ve incrementada considerablemente durante la respuesta de fase aguda [339] Una vez más, nuestros resultados indican que, tanto la grasa monoinsaturada como el CoQ<sub>10</sub> juegan un papel muy importante como reguladores de la inflamación. De acuerdo con esto, estudios previos han documentado que una cosuplementación de la dieta con vitamina E y CoQ<sub>10</sub> reducen los marcadores circulatorios de inflamación en los babuinos [340]; así como en células tratadas con CoQ<sub>10</sub>, donde disminuyen los marcadores de inflamación [341].

A pesar de lo observado sobre los niveles de estas proteínas y su consecuente implicación sobre los estados antiinflamatorios, el **Inhibidor de Serín Proteasas III (SPI 3)** (otra proteína implicada en la fase aguda) incrementó tanto con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> como con la dieta suplementada con el antioxidante, consideración a tener en cuenta en futuros estudios.

El **Factor Properdina Beta** incrementó hasta 3 veces en las ratas viejas tras la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>, no encontrando cambios significativos en los demás grupos experimentales estudiados. Esta proteína es un regulador de la vía alternativa del complemento cuya función depende de múltiples interacciones entre sus subunidades y ligandos [342]. El incremento de la proteína con la dieta suplementada nos indica que el CoQ<sub>10</sub> puede estar regulando de alguna forma el sistema del complemento a edades avanzadas. Este resultado puede ser objeto de futuros estudios.

La **Fetuína** incrementó tras la ingesta prolongada de las tres dietas experimentales, aunque disminuyó tras el consumo de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (del orden de 3 veces) y, acusadamente, en el caso de la dieta PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> en el grupo de ratas de 6 meses de edad. La fetuína es una proteína sérica que en rata inhibe la osteogénesis y puede promover la calcificación arterial [343, 344]. Además, las concentraciones de fetuína están fuertemente asociadas con el síndrome metabólico y un

perfil lipídico aterogénico en humanos [345]. El hecho de que la grasa monoinsaturada y el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> incrementen los niveles de la proteína de unión a la vitamina D y disminuyan los de la fetuína puede indicarnos que este tipo de dietas pueden influenciar la osteogénesis.

Por último encontramos modificaciones sobre los niveles de **Alfa 1-Macroglobulina**. Esta proteína incrementó con el consumo prolongado de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y disminuyó con el de la dieta PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>, no encontrando un efecto claro tras el consumo de la dieta PUFA<sub>n-6</sub>. Los resultados obtenidos en ratas jóvenes mostraron un incremento de la proteína con la dieta suplementada y cambios no significativos con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>; mientras que en las ratas viejas encontramos un incremento con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y una disminución con la dieta suplementada. La Alfa 1 Macroglobulina es una proteína de fase aguda cuya principal función es la de neutralizar enzimas proteolíticas. Los resultados obtenidos son contradictorios por lo que deberían ser estudiados en mayor profundidad.

Si tenemos en cuenta todos los resultados obtenidos sobre la modificación de proteínas en ratas tras la ingesta de las diferentes dietas experimentales, observamos que en muchos casos, el consumo de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA<sub>n-9</sub>) tiene efectos parecidos a la suplementación de la dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados con CoQ<sub>10</sub> (PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub>). En este sentido, en un estudio reciente realizado por Quiles et al [346] se ha observado que la ingesta de dietas ricas en MUFA<sub>n-9</sub> protege a las mitocondrias de cardiomiocitos de los cambios relacionados con la edad, disminuyendo los niveles de hidroperóxidos y aumentando la actividad mitocondrial; y que la dieta rica en PUFA<sub>n-6</sub> + CoQ<sub>10</sub> presenta beneficios semejantes a los de esta dieta, siendo superiores en algunos casos.

---

---

## CAPÍTULO II: ESTUDIO EN SUJETOS MAYORES DE 65 AÑOS

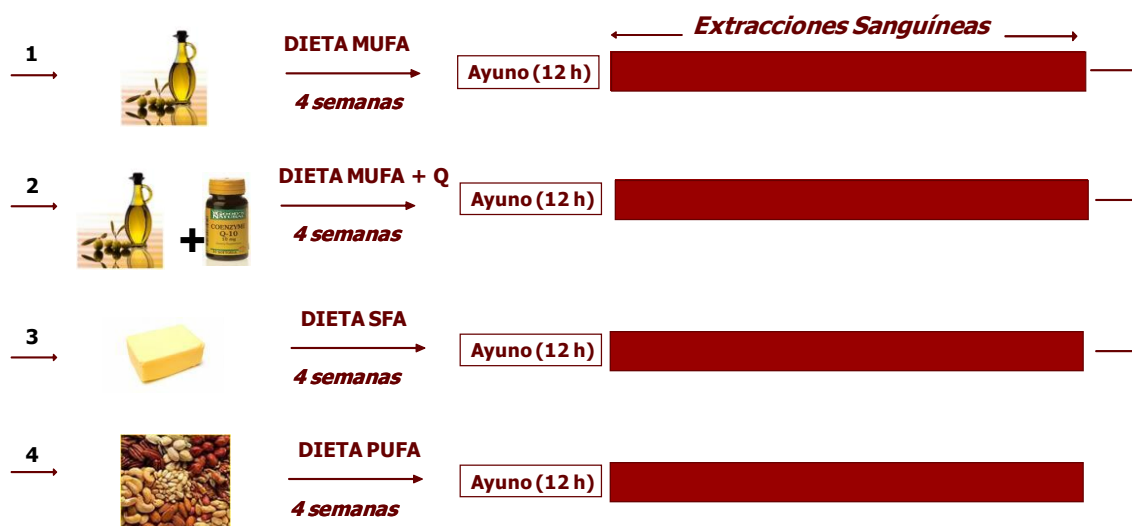
### 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio se llevó a cabo sobre una población envejecida (> de 65 años) de sujetos (hombres y mujeres), normolipémicos y homocigóticos para el alelo E3 de la apolipoproteína E (E3/E3), fenotipo más común que encontramos en la población general. Los sujetos que presentaban un fenotipo diferente no fueron incluidos en el estudio, ya que queríamos evitar variaciones genéticas que pudieran influir en la respuesta lipémica tras la ingesta de las dietas. Los diferentes fenotipos causados por los polimorfismos de ApoE modifican los niveles de las lipoproteínas [347] causando en los sujetos E2/E2 la hiperlipoproteinemia tipo III [348].

Como se explica en el apartado 2.2. Materiales y Métodos, los individuos fueron sometidos de forma randomizada y cruzada siguiendo un diseño de cuadrados latinos, a cuatro períodos de intervención dietética de 16 semanas de duración en total, como se representa en la figura R\_16. Para realizar el estudio comparativo de los geles, las muestras de plasma de cada sujeto (aquellas que no presentaban hemólisis) fueron agrupadas según la dieta que habían tomado durante los períodos de intervención dietética creando así cuatro grupos: MUFA<sub>n-9</sub>, MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, SFA y PUFA<sub>n-3</sub>. Esto se realizó con el fin de minimizar las posibles variaciones que fueran debidas a diferencias entre individuos más que las ocasionadas por la ingesta de las diferentes dietas. Se tuvo en cuenta la cantidad de proteína en cada una de las muestras de plasma individuales tomando de ellas la misma proporción para elaborar muestras representativas (*pools*).

Para cada uno de estos *pool* se crearon entre tres y cuatro réplicas que fueron procesadas de forma independiente y paralela, manteniendo en todo momento las mismas condiciones en el método para evitar con ello las diferencias inter-experimentales.





**Figura R\_16.** Administración de dietas experimentales y toma de muestras. Dieta 1. Dieta mediterránea, cuya principal fuente grasa es el aceite de oliva (rica en ácido oleico); Dieta 2. Igual que en el caso anterior pero con un suplemento de CoQ<sub>10</sub> (200mg/día); Dieta 3. Dieta rica en ácidos grasos saturados, cuya fuente grasa principal es la mantequilla; y Dieta 4. Dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 3, cuya fuente grasa principal es una mezcla de aceite de pescado y nueces. Tras la administración de las dietas y 12 horas de ayuno, se extrajeron muestras sanguíneas tras una sobrecarga grasa.

Sujeto	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Q03	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q05	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q06	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q07	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q09	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q11	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q12	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q14	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q16	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q17	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q23	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q24	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q18	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q19	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA
Q20	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q21	MUFA + Q	MUFA	SFA	PUFA
Q22	MUFA	MUFA + Q	SFA	PUFA

**Tabla R\_12.** En la tabla se muestran todos los sujetos que cumplieron los criterios establecidos y que formaron parte el estudio (n = 17). Todos ellos habían tomado cada una de las dietas experimentales. Cada grupo representa la dieta que toma cada sujeto por orden cronológico, de manera que, el grupo 1 representa a los sujetos que tomaron la dieta Mediterránea ó Mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub>, el grupo 2 a los sujetos que tomaron la dieta contraria a la que habían tomado en el grupo 1, el grupo 3 representa a los sujetos cuando tomaron la dieta saturada y el grupo 4 a los sujetos tras la administración de la dieta poliinsaturada.

## 2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CoQ<sub>10</sub> MEDIANTE HPLC

Con el fin de comprobar si el suplemento de la dieta estaba teniendo lugar correctamente en el organismo y poder atribuir a ello parte de los cambios observados sobre modificaciones de proteínas plasmáticas, se midieron los niveles de este antioxidante en todas las muestras de plasma extraídas de los sujetos cuando tomaron la dieta mediterránea rica en MUFA<sub>n-9</sub> y la misma dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Por otro lado también se midieron los niveles del antioxidante en las demás dietas experimentales (SFA y PUFA<sub>n-3</sub>) con el fin de comprobar si variaban dichos niveles en sangre tras la administración de dietas con diferente contenido graso (tabla R\_13).

Tras llevar a cabo el análisis estadístico de los datos como se indica en el apartado 6.3 Materiales y Métodos, encontramos diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las dietas MUFA<sub>n-9</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> (200mg/día) (figura R\_17) al igual que con las demás dietas experimentales.

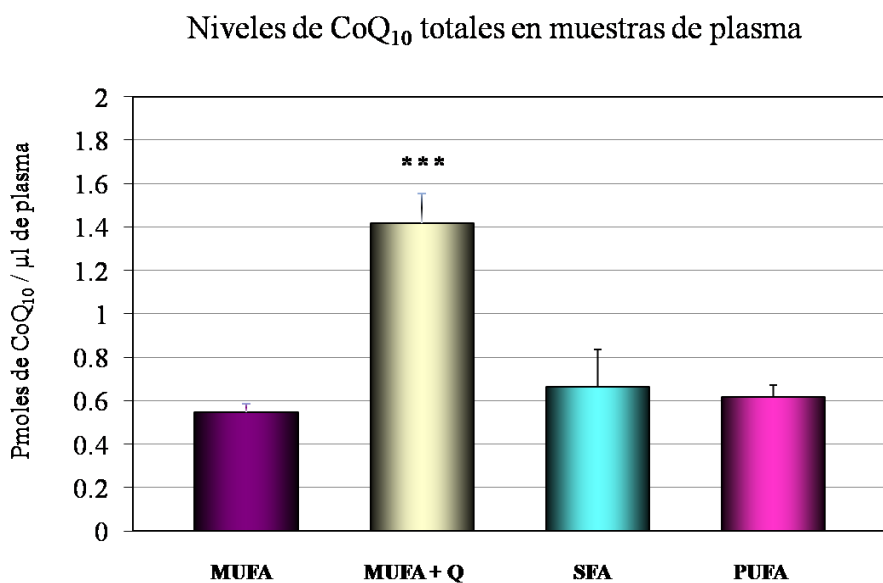
SUJETO	MUFA <sub>n-9</sub> t0	MUFA <sub>n-9</sub> + Q T0	SFA T0	PUFA <sub>n-3</sub> T0
Q01	0.326601317	2.025902891	0.187431853	0.262768431
Q03	0.367470365	1.507878782	0.445998852	0.958572757
Q05	0.701208205	1.236069023	0.431038589	0.544742963
Q06	0.254716184	1.173438555	0.161528596	0.354629016
Q07	0.560547425	1.509236649	0.764258378	0.710651332
Q08	0.50731728	1.683730602	0.231678621	0.449010364
Q09	0.715175149	0.40383454	0.333199063	0.69810999
Q10	0.445793876	0.813955008	-	0.465968386
Q11	0.714145668	0.980171149	0.53267	0.519864034
Q12	0.499679306	0.62959982	0.195852081	0.459572938
Q14	0.398245075	1.305989603	0.356303053	0.654857184
Q16	0.722527219	1.438569314	0.761176002	0.622713468
Q17	0.807031664	2.151634502	0.854178634	0.860457196
Q18	0.31638208	1.12204876	0.320714448	0.306542494
Q19	0.383133925	1.019171226	0.18749118	0.299291342
Q20	0.649278754	1.472908043	0.96563765	0.632713019
Q21	0.905417585	2.431852347	0.788691638	0.939625843
Q22	0.580119059	0.863100656	0.669442222	0.74381895
Q23	0.448964572	1.564092156	3.530809049	0.761301083
Q24	0.642775871	2.972550968	0.876758822	1.114252646
<b>MEDIA</b>	<b>0.547326529</b>	<b>1.41528673</b>	<b>0.6628873</b>	<b>0.617973172</b>
<b>CV (+/-)</b>	<b>0.18062334</b>	<b>0.621146256</b>	<b>0.74460194</b>	<b>0.236571121</b>

**Tabla R\_13.** Niveles de CoQ<sub>10</sub> en plasma (µM) medidos en cada uno de los sujetos (n = 20) mediante cromatografía líquida de fase reversa (HPLC). Se muestra la media de cada uno de los grupos experimentales con su desviación estándar (CV (+/-)). Se observa que los niveles del antioxidante presente en las muestras del grupo MUFA +Q son superiores a los que encontramos en los demás grupos, los cuales a su vez no mostraron mucha diferencia entre ellos.

En el plasma de humanos, a diferencia de otros órganos como cerebro (23%) o pulmón (24%), encontramos el CoQ<sub>10</sub> reducido (CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub>) como isoforma predominante [39]. A diferencia de lo que observamos en ratas, la proporción de los niveles de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> es diferente, encontrando en humanos casi la totalidad del lípido en forma de CoQ<sub>10</sub>. Además, los niveles de CoQ<sub>10</sub> obtenidos en nuestro estudio, se encuentran dentro del rango descrito en humanos [349]. El CoQ<sub>10</sub> reducido o ubiquinol posee una gran capacidad antioxidante, ya que es capaz de prevenir la peroxidación lipídica en la mayoría de las membranas subcelulares [39, 350]. Estudios realizados sobre los mecanismos de acción de este lípido sugieren que el CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> actúan en los procesos de iniciación y prevención de formación del radical peroxil lipídico (LOO), mientras que la vitamina E actúa aplacando estos radicales [351]. Por otro lado, está bien establecido que el CoQH<sub>2</sub> regenera los radicales  $\alpha$ -tocoferoxilos de la Vitamina E. Propiedades como la solubilidad lipídica, la eficiencia de regeneración y su implicación en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica, son algunos de los factores que explican el porqué el CoQ<sub>10</sub> es considerado como un potente antioxidante de las membranas biológicas, considerándose si cabe este más eficiente aún que la Vitamina E [352]. Además, la oxidación de las proteínas de membrana pueden prevenirse también con el CoQH<sub>2</sub> [353].

Tras cuantificar el lípido en las muestras de plasma obtenidas, observamos que la mayoría del CoQ<sub>10</sub> se encontraba en su forma reducida (CoQH<sub>2</sub>) (figuras R\_18 y R\_19), lo cual supone un refuerzo antioxidante a nivel endotelial, evitando con esto el inicio de la peroxidación lipídica, tanto de los ácidos grasos poliinsaturados incorporados por la dieta, como de las membranas que constituyen las células endoteliales, con lo que podría evitarse la iniciación de un proceso inflamatorio en la pared vascular y con ello la progresión del proceso aterosclerótico. Además, al comparar los niveles entre las diferentes dietas pudimos ver que las muestras obtenidas a partir de sujetos que siguieron una dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> presentaban niveles de CoQ<sub>10</sub> reducido superiores a los encontrados en las muestras de plasma obtenidas de los sujetos cuando tomaban la dieta sin suplementar (figura R\_19). Esto es lógico ya que el suplemento de la dieta está dando lugar a la incorporación del lípido al torrente circulatorio y con ello a un incremento de la forma reducida.

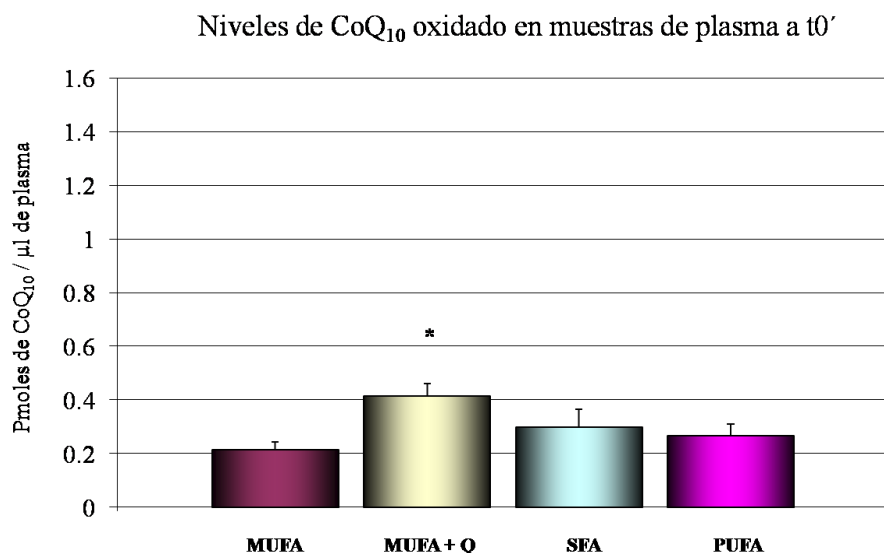
Por otro lado, es importante no olvidar el efecto que tienen las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la oxidación de biomoléculas como las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales son muy susceptibles a la oxidación. Las LDLox participan activamente en el inicio y progresión de la placa aterosclerótica [71, 354], por lo que el incremento del lípido en sangre podría paliar los efectos oxidativos por parte de estas moléculas y con ello el desarrollo de la aterosclerosis.



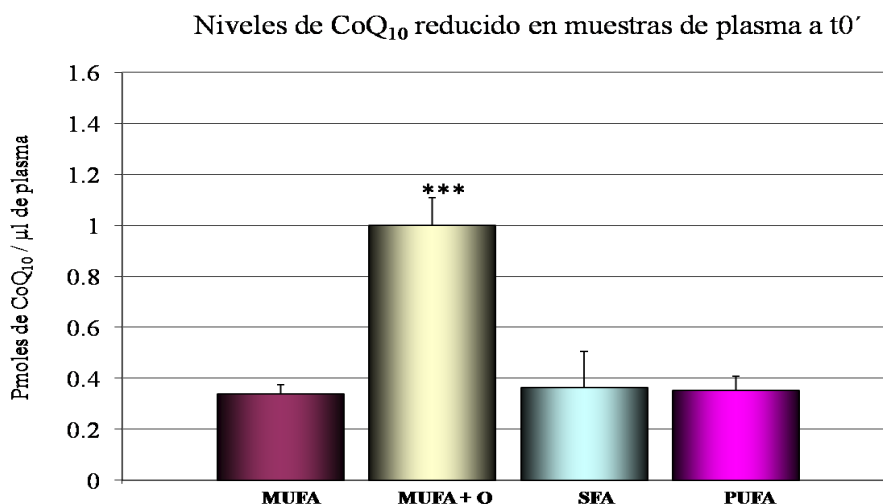
**Figura R\_17.** Niveles de CoQ<sub>10</sub> totales en muestras de plasma obtenidas de sujetos a los que se les administró dietas con diferente contenido graso y antioxidante. En el gráfico se muestran las medias con sus errores estándar (n=20). Las diferencias entre las dietas están indicadas con asteriscos (\*\*\*) P < 0.001, siendo claramente significativo el incremento de CoQ<sub>10</sub> en la dieta suplementada con el antioxidante (MUFA + CoQ<sub>10</sub>) con respecto a la dieta sin suplementar (MUFA). Por otro lado, también encontramos diferencias significativas con el mismo p valor en la dieta MUFA + Q frente a las dietas SFA y PUFA. a) MUFA, b) MUFA + CoQ<sub>10</sub>, c) SFA y d) PUFA.

En relación a las lesiones ateroscleróticas, son muchos los estudios realizados que muestran que la administración de CoQ<sub>10</sub> supone un incremento de los niveles de este lípido y del  $\alpha$ -Tocoferol a nivel de la aorta, así como una disminución de la concentración de hidroperóxidos, lo cual supone una disminución del tamaño de la lesión [355, 356]. Por otro lado, la disminución en la expresión de factores de adhesión inhibe el reclutamiento de monocitos en la pared arterial y por tanto, afecta a la progresión de la enfermedad. Todos estos eventos que se relacionan con la disfunción endotelial están también ligados a otras enfermedades como la diabetes. La

administración de CoQ<sub>10</sub> a pacientes con diabetes tipo 2 hizo que disminuyera la presión sanguínea diastólica [357].



**Grafico R\_18.** Niveles de CoQ<sub>10</sub> oxidado en muestras obtenidas de sujetos a los que se les administró dietas con diferente contenido graso y suplemento de CoQ<sub>10</sub>. Se muestran las medias con sus errores estándar (n = 20). Las diferencias entre las dietas están indicadas con asteriscos (\* P < 0.05), siendo significativo el incremento de CoQ<sub>10</sub> oxidado en la dieta suplementada con el antioxidante (MUFA + CoQ) con respecto a la dieta sin suplementar (MUFA). No se encontraron diferencias significativas de este grupo con las demás dietas ni entre ellas. a) MUFA, b) MUFA + Q, c) SFA y d) PUFA. One-Way Analysis of Variance (ANOVA). Tukey – Kramer Multiple Comparisons Test.



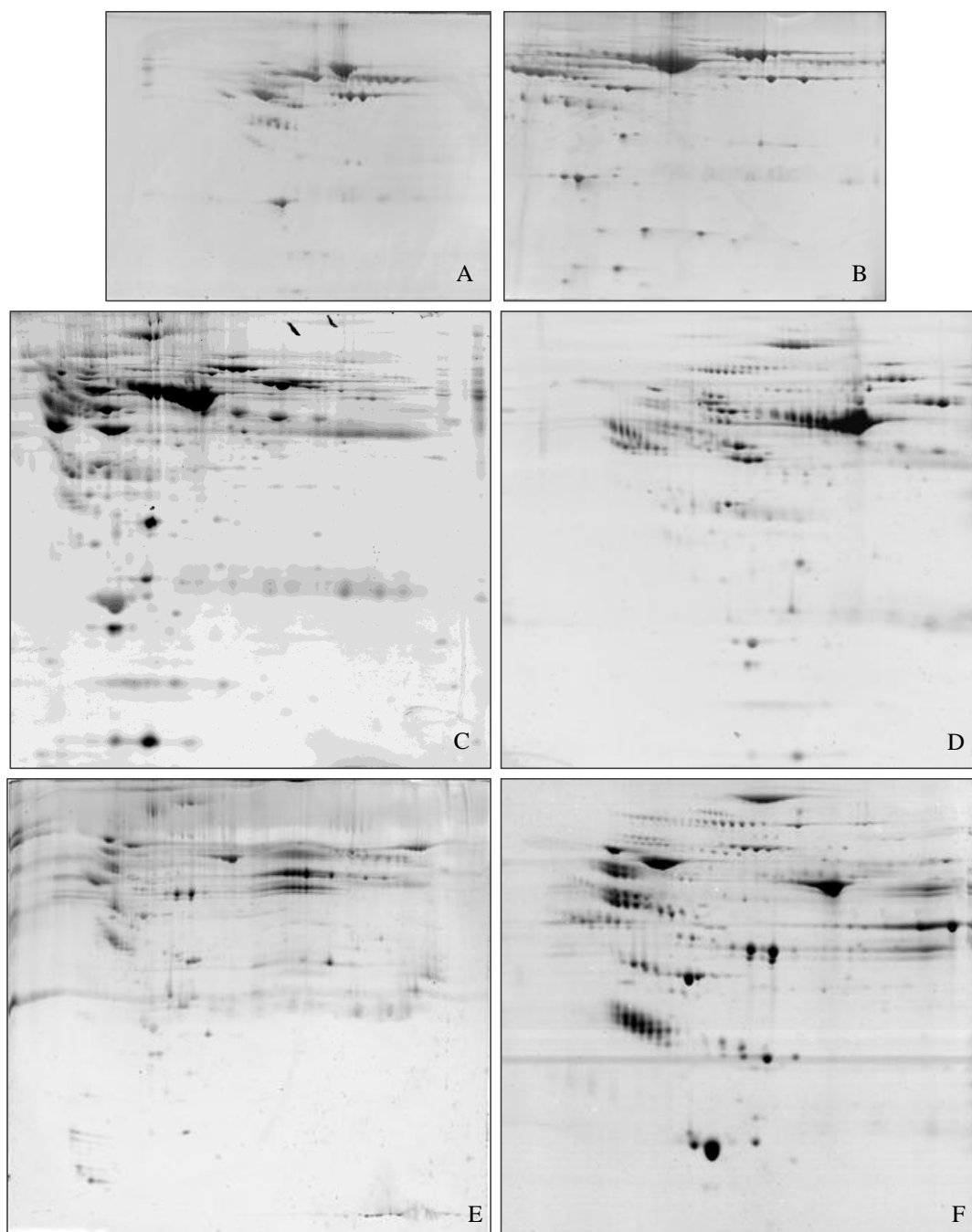
**Figura R\_19.** Niveles de CoQ<sub>10</sub> reducido en plasma de sujetos a los que se les administró dietas con diferente contenido graso y antioxidante. Se muestran las medias con sus errores estándar (n = 20) . Las diferencias entre las dietas están indicadas con asteriscos ( \*\*\* P < 0.001), siendo significativo el incremento de CoQ<sub>10</sub> reducido en la dieta suplementada con el antioxidante (MUFA + CoQ) con respecto a la dieta sin suplementar (MUFA). Además, también encontramos diferencias significativas con el mismo p-valor entre la dieta MUFA + Q y SFA y MUFA + Q y PUFA. Las dietas MUFA, SFA y PUFA no mostraron cambios significativos entre si. a) MUFA, b) MUFA + Q , c) SFA y d) PUFA. One-Way Analysis of Variance (ANOVA). Tukey – Kramer Multiple Comparisons Test.

### 3. ESTUDIO PROTEÓMICO. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

A la vista de los resultados obtenidos por Pieper y colaboradores [183] consideramos que para una primera aproximación al análisis de la expresión diferencial de proteínas en el plasma de sujetos que habían tomado diferentes dietas experimentales, podría ser adecuada la metodología de depleción de las proteínas mayoritarias del plasma. Para ello, decidimos utilizar el sistema comercial más eficaz y reproducible que existía en el mercado en el momento de comenzar nuestro estudio y que era semejante al que utilizaron Pieper y colaboradores. Estamos hablando del Kit ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion (PROT20) (SIGMA-ALDRICH) (consultar el apartado 7.2. Materiales y Métodos), el cual está optimizado para la depleción de las 20 proteínas mayoritarias del plasma humano. Con ello, estudiaríamos proteínas menos abundantes.

Por otra parte, durante el desarrollo de esta tesis surgieron métodos cromatográficos más novedosos que subsanaban algunos de los inconvenientes que presentaba la cromatografía de afinidad, como la eliminación no deseada de proteínas. Entre estos métodos encontramos los que normalizan el rango dinámico de proteínas en la muestra sin eliminar ninguna de ellas. Esta tecnología supone un gran avance, ya que permite el estudio de todas las proteínas plasmáticas reproducibles en geles bidimensionales. Para llevarla a cabo, utilizamos el Kit comercial Proteo Miner™ Protein Enrichment Kit (Bio-Rad) el cual, como se explica en el apartado 7.3 Materiales y Métodos, utiliza la tecnología de una biblioteca combinatoria de hexapéptidos unidos a una columna de cromatografía.

De la misma manera que se hizo con las muestras de plasma de rata, y una vez elegidos los métodos de pre-tratamiento de las muestras (los cuales fueron también ensayados), se realizaron varias pruebas utilizando diferentes tamaños de IPGs y rangos de pH, así como métodos de tinción de geles (figura R\_20) para determinar las condiciones de separación más adecuadas. Tras varias pruebas, decidimos realizar el estudio en geles de 20 x 20cm, separando previamente las proteínas en un gradiente de



**Figura R\_20.** Imágenes representativas de geles bidimensionales obtenidas tras el uso de varios métodos de procesamiento. A y B son el resultado de la separación de muestras de plasma tratadas con ProteoExtract™ Albumin/IgG Removal Kit (Merck Darmstadt, Germany) utilizando para la primera dimensión IPGs de 11 cm con gradientes de pH 3-10 (A) y 5-8 (B). En el caso de C y D las muestras fueron procesadas con el Kit ProteoPrep® 20 Plasma Immunodepletion Kit (PROT20) (SIGMA-ALDRICH), utilizando para la primera dimensión IPGs de 17 cm con gradientes de pH 3-10NL (C) y 4-7 (D). En el caso de E y F las muestras fueron procesadas con Proteo Miner™ (Bio-Rad), utilizando para la primera dimensión IPGs de 17 cm con gradientes de pH 3-10NL (E) y 4-7 (F). Con respecto al método de tinción utilizado, los geles A y B fueron teñidos con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad) y C - F con Sypro Ruby Protein Stains (Bio-Rad). Para la segunda dimensión se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% (A, B, C y E) o al 10% (D y F).

pH de 4-7 (IPG Strips, BioRad, Hercules, CA, USA) para una primera dimensión y utilizando geles de poliacrilamida al 12% (PROT20) ó 10% (Proteo Miner<sup>TM</sup>) para una segunda dimensión. La proteína de la muestra resultante tras la aplicación de ambos métodos de pre-tratamiento (PROT20 ó Proteo Miner<sup>TM</sup>) fue cuantificada mediante el método de Bradford [358] y entre 400-500 µg de proteína fueron separados en los geles bidimensionales.

Para la detección de las proteínas se utilizó la tinción fluorescente Sypro Ruby Protein Stains (Bio-Rad), que es más sensible y capaz de detectar un mayor rango de concentración de proteínas que la tinción de Coomasie coloidal. Las imágenes resultantes fueron tomadas con Molecular Imager FX (Bio-Rad).

#### **4. CAMBIOS EN EL PROTEOMA TRAS LA DEPLECIÓN DE 20 PROTEÍNAS MAYORITARIAS**

Tras la optimización del método (ProteoPrep20), para llevar a cabo el estudio de expresión diferencial, realizamos previamente una colección de muestras de plasma obtenidas a partir de los diferentes grupos de intervención dietética. De esta forma comparando estas muestras podemos estudiar qué cambios ocurren en el proteoma plasmático tras la administración de dietas con diferente contenido graso o de dietas suplementadas con CoQ<sub>10</sub>.

El análisis comparativo de los geles se realizó, al igual que el estudio llevado a cabo en plasma de ratas, utilizando el programa PD Quest 2-D Analysis Software (Bio-Rad) como se indica en el apartado 11 de Materiales y Métodos, utilizando en cada uno de los estudios al menos cuatro réplicas representativas de cada grupo experimental. Tras seleccionar en cada uno de los geles las regiones a estudiar, se realizó un filtrado de las imágenes utilizando la herramienta ``sal y pimienta`` gaussiana 9 x 9. El análisis de los geles suponía una detección automática de los *spots* y el emparejamiento uno a uno de los mismo en cada uno de los geles. La normalización de los datos se realizó con la opción ``Local Regression Model``. Una vez creados los grupos de réplicas realizamos un análisis cualitativo, cuantitativo y estadístico mediante una T-Sudent para comparar la expresión diferencial de las manchas entre los diferentes grupos, considerando significativos y de especial interés, aquellos *spots* que mostraron cambios



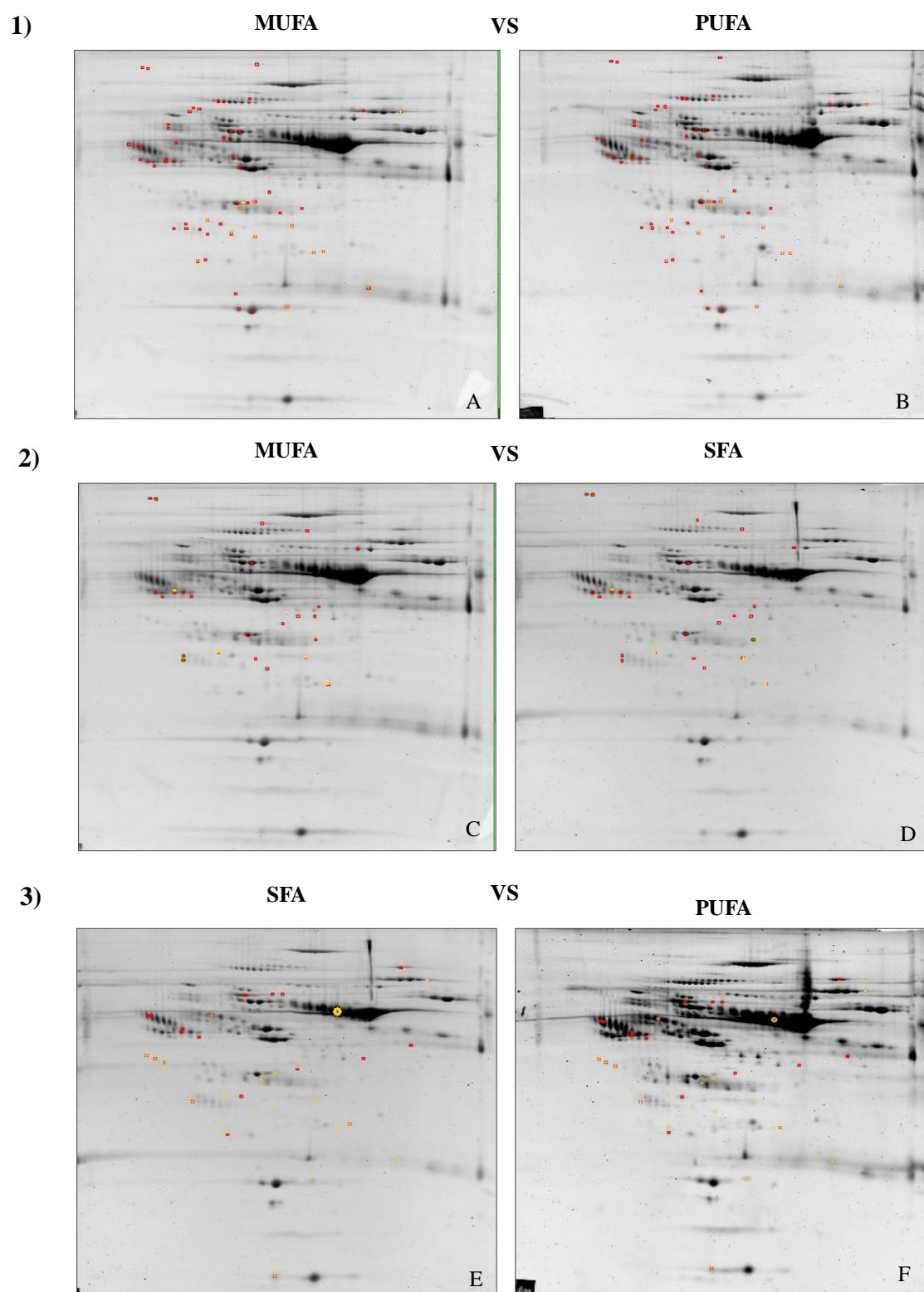
con valores  $p < 0.05$ . Se prestó especial atención a aquellos *spots* que presentaron cambios estadísticamente significativos con valores por encima del doble o por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia o que afectaban a la gran mayoría de las isoformas de una misma proteína.

#### **4.1. EFECTOS TRAS LA INGESTA DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO GRASO Y SUPLEMENTOS CON CoQ<sub>10</sub>**

Tras llevar a cabo el análisis de estos geles, el programa detectó en este caso un valor medio de 313 *spot* para el grupo MUFA<sub>n-9</sub>, de 313 *spots* para el grupo MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, de 314 *spots* en el grupo SFA y de 313 *spots* en el grupo PUFA<sub>n-3</sub>, donde el 100% de ellos casaron en los geles duplicados. Tras analizar los datos obtuvimos cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 48 *spots* para el análisis comparativo realizado entre el grupo MUFA<sub>n-9</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, de los cuales 6 aumentaban y 13 disminuían en MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>; 25 *spots* para el análisis realizado entre el grupo MUFA<sub>n-9</sub> y SFA, entre los cuales 6 aumentaban y 4 disminuían en la dieta SFA; 54 *spots* significativos para el análisis entre los grupos MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-3</sub>, donde 8 aumentaban y 13 disminuían en la dieta PUFA<sub>n-3</sub> y 22 *spots* para el análisis entre los grupos SFA y PUFA<sub>n-3</sub>, donde ninguno aumentaba y 13 disminuían en PUFA<sub>n-3</sub>, en todos los casos con valores por encima del doble o por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia (MUFA<sub>n-9</sub> en los tres casos primeros y SFA en el último caso). Los resultados de los análisis obtenidos tras la ingesta de dietas con diferente contenido graso se muestran en la figura R\_21 (A-F) y tras la suplementación con CoQ<sub>10</sub> de la dieta en la Figura R\_22 (A-B). Como se puede observar, el número de *spots* detectado en estos geles es diferente al de los geles obtenidos tras el pretratamiento de las muestras con ProteoPrep20, ya que al no eliminar ninguna de las proteínas, las mayoritarias pueden enmascarar y dificultar la separación de las minoritarias.

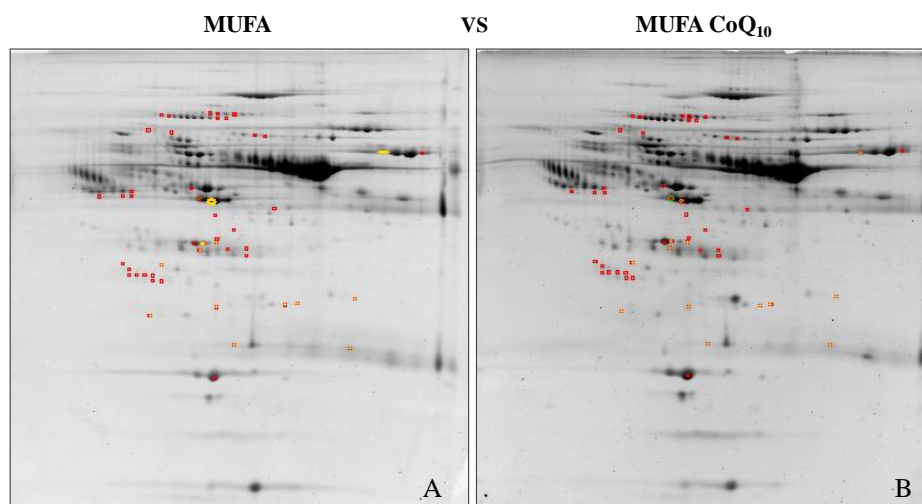
En todos los análisis realizados en este bloque observamos *spots* que, a pesar de no mostrar cambios por encima del doble o por debajo de la mitad de la condición tomada como control, mostraron cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ )

menos acentuados (valores por encima y por debajo de 1.5 veces). Estos cambios han sido tomados en cuenta.



**Figura R\_21.** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales. Se muestran los cambios obtenidos en las proteínas plasmáticas por grupos de análisis (1-3) tras la ingesta de diferentes dietas experimentales, donde se observan los *spots* que mostraron cambios estadísticamente

significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* significativos que aumentaron por encima del doble (círculo verde) y disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) su expresión tomando como dieta control la dieta mediterránea rica en ácido oleico en los estudios 1 y 2 (A-D) y la dieta rica en ácidos grasos saturados en el estudio 3 (E-F). Modificaciones tras el consumo de una dieta mediterránea rica en ácido oleico frente a una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (A y B), de una dieta mediterránea rica en ácido oleico frente a una dieta rica en ácidos grasos saturados (C y D) y de una dieta rica en ácidos grasos saturados frente a una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (E y F), respectivamente.



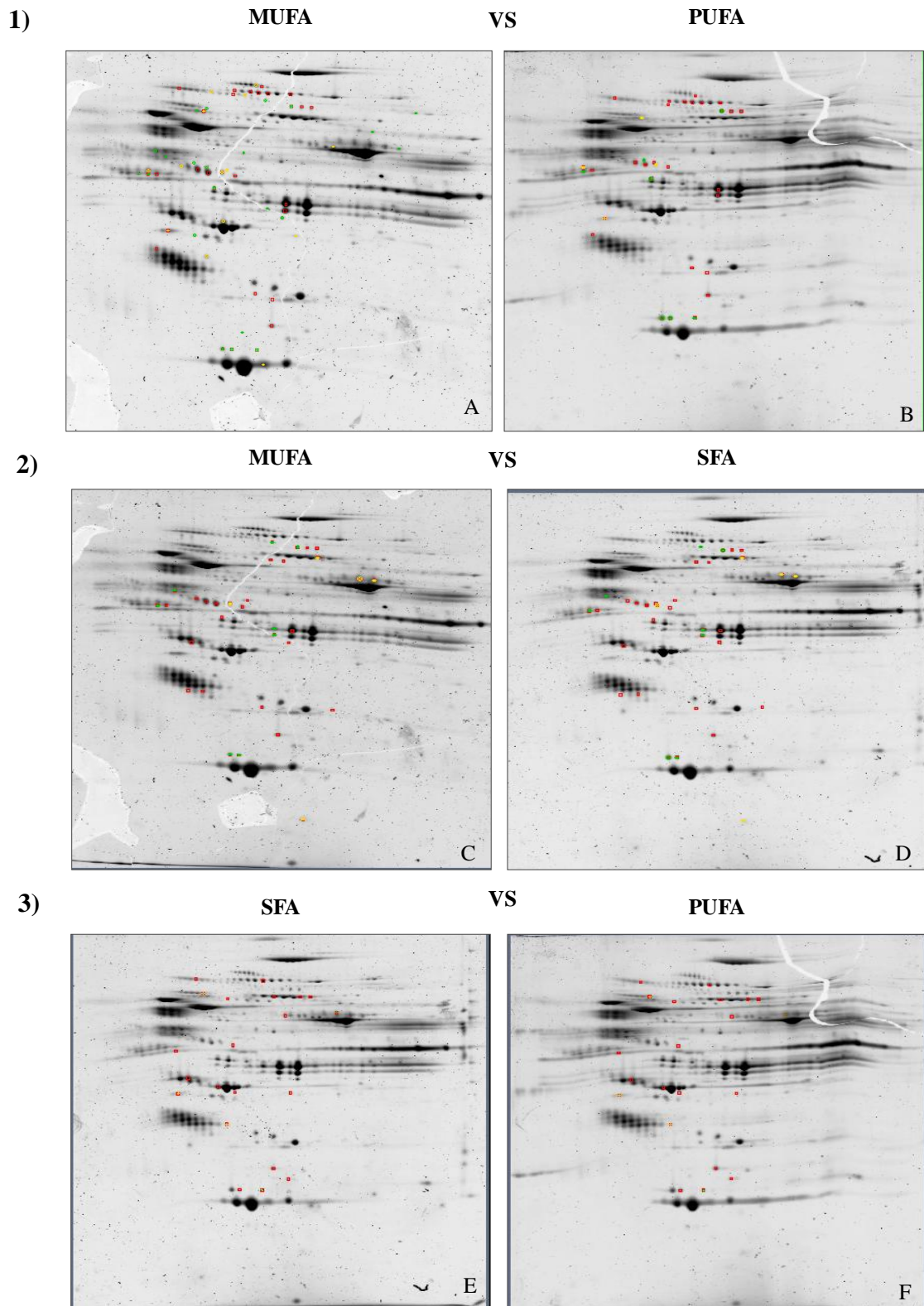
**Figura R\_22.** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales realizados tras el pre-tratamiento de las muestras con el Kit ProteoPrep20 (SIGMA). Se muestran los cambios obtenidos sobre los niveles de las proteínas plasmáticas tras el suplemento de una dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub> (200mg/día) donde A representa el proteoma resultante del grupo de sujetos cuando tomaron la dieta mediterránea (MUFA<sub>n-9</sub>) y B cuando tomaron la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> (MUFA + CoQ<sub>10</sub>). En la imagen se observan los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* que aumentaron por encima del doble (círculo verde) y disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) su expresión en la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> al ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>.

## 5. CAMBIOS EN EL PROTEOMA PLASMÁTICO TRAS LA NORMALIZACIÓN DEL RANGO DINÁMICO

De la misma manera que en el apartado anterior, se realizó el estudio de las muestras de plasma tras ser pre-tratadas con el Kit Proteo Miner<sup>TM</sup> Protein Enrichment. Todo el proceso y análisis de los datos se realizó en las mismas condiciones. En este caso el proteoma obtenido fue diferente, lo cual es lógico, ya que no se eliminaba ninguna de las proteínas del plasma, al contrario que en el caso anterior.

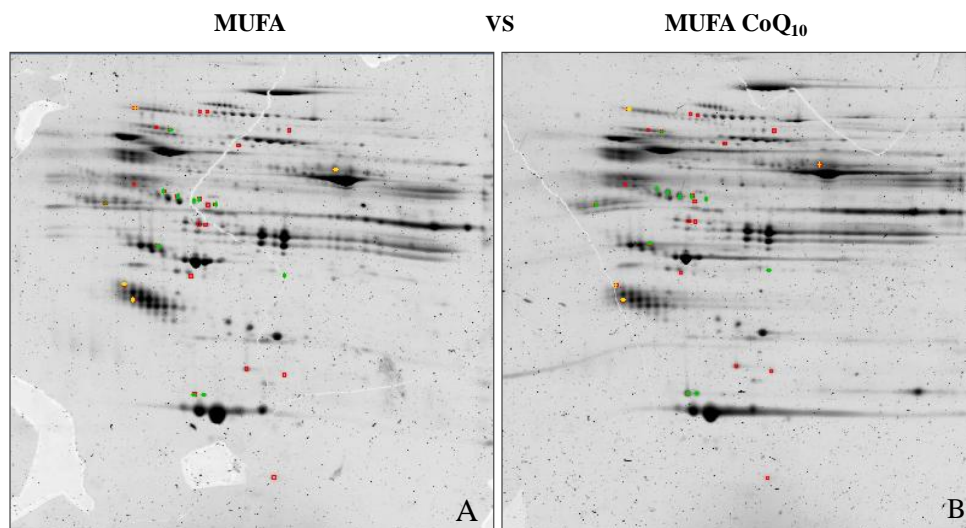
## 5.1. EFECTOS TRAS LA INGESTA DE DIETAS CON DIFERENTE CONTENIDO GRASO Y SUPLEMENTOS CON CoQ<sub>10</sub>

Tras llevar a cabo el análisis de estos geles, el programa detectó en este caso un valor medio de 238 *spot* para el grupo MUFA<sub>n-9</sub>, de 239 *spots* para el grupo MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, de 240 *spots* en el grupo SFA y de 240 *spots* en el grupo PUFA<sub>n-3</sub>, donde el 100% de ellos casaron en los geles duplicados. Tras analizar los datos obtuvimos cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en un total de 28 *spots* para el análisis realizado entre el grupo MUFA<sub>n-9</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, entre los cuales 11 aumentaban y 4 disminuían; 33 *spots* para el análisis realizado entre el grupo MUFA<sub>n-9</sub> y SFA, entre los cuales 8 aumentaban y 5 disminuían; 32 *spots* significativos para el análisis entre los grupos MUFA<sub>n-9</sub> y PUFA<sub>n-3</sub>, donde 7 aumentaban y 4 disminuían y 21 *spots* para el análisis entre los grupos SFA y PUFA<sub>n-3</sub>, donde 2 aumentaban y 3 disminuían, en todos los casos con valores por encima del doble y por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia (MUFA<sub>n-9</sub> en los tres casos primeros y SFA en el último caso). Los resultados de los análisis obtenidos tras la ingesta de dietas con diferente contenido graso se muestran en la figura R\_23 (A-F) y tras la suplementación con CoQ<sub>10</sub> de la dieta en la figura R\_24 (A-B). Como se puede observar, el número de *spots* detectado en estos geles es diferente al de los geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras con ProteoPrep20, ya que al no eliminar ninguna de las proteínas, las mayoritarias pueden enmascarar y dificultar la separación de las minoritarias.



**Figura R\_23.** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los gels bidimensionales realizados tras el pre-tratamiento de las muestras con el Kit Proteo Miner<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Se muestran los cambios obtenidos en las proteínas plasmáticas por grupos de análisis (1-3) tras la ingesta de diferentes dietas experimentales, donde se observan los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* significativos que aumentaron por encima del doble (círculo verde) y disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) su expresión tomando como dieta control la dieta mediterránea rica en ácido oleico en los estudios 1 y 2 (A-D) y la dieta rica en ácidos grasos saturados en

el estudio 3 (E-F). Modificaciones tras el consumo de una dieta mediterránea rica en ácido oleico frente a una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (A y B), de una dieta mediterránea rica en ácido oleico frente a una dieta rica en ácidos grasos saturados (C y D) y de una dieta rica en ácidos grasos saturados frente a una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (E y F), respectivamente.

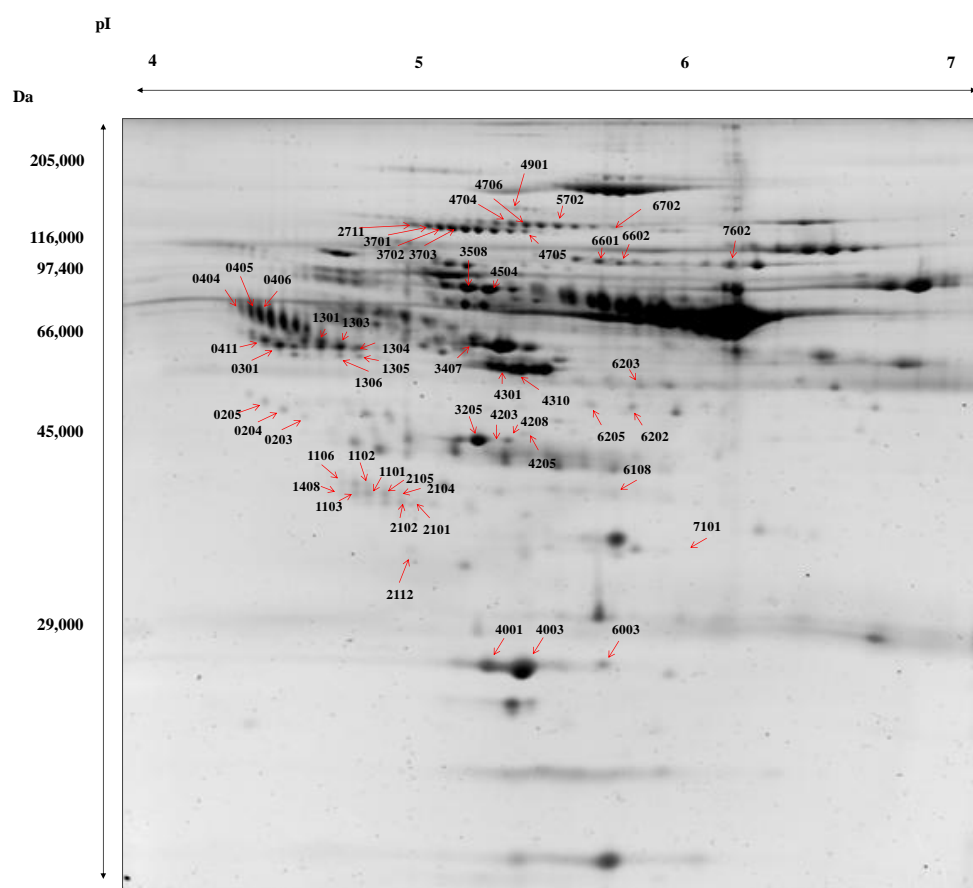


**Figura R\_24.** Imágenes representativas obtenidas tras el análisis de los geles bidimensionales realizados tras el pre-tratamiento de las muestras con el Kit Proteo Miner™ (Bio-Rad). Se muestran los cambios obtenidos sobre los niveles de las proteínas plasmáticas tras el suplemento de una dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub> (200mg/día) donde A representa el proteoma resultante del grupo de sujetos cuando tomaron la dieta mediterránea (MUFA<sub>n-9</sub>) y B cuando tomaron la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> (MUFA + CoQ<sub>10</sub>). En la imagen se observan los *spots* que mostraron cambios estadísticamente significativos con  $p < 0.05$  (cuadros rojos), los *spots* que aumentaron por encima del doble (círculo verde) y disminuyeron por debajo de la mitad (círculo amarillo) su expresión en la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> al ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>.



## 6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Tras comparar los resultados de todos los estudios realizados sobre los geles bidimensionales, se llevó a cabo una puesta en común de todos los *spots* que mostraron cambios significativos con valores por encima del doble y por debajo de la mitad de la condición tomada como referencia en cada caso, así como de aquellos *spots* que mostraron cambios en un gran número de sus isoformas. Tras determinar qué *spots* eran óptimos para ser identificados, se intentaron identificar 124 *spots*, de los cuales 104 fueron identificados con éxito, mientras que el resto quedó sin identificar (figuras R\_25 y R\_26).



**Figura R\_25.** Proteínas identificadas con éxito en el conjunto de todos los estudios realizados previamente pre-tratadas las muestras de plasma con el Kit comercial ProteoPrep20 (SIGMA).

SPOT	PROTEÍNA	MOWSE	p.I.	MM (Da)	P. C.	C. S. (%)	NCBI ID
203	Alfa 2 Glicoproteína Rica en Leucina (LRG)	120	4.58	47.073	12	13	gi 16418467
204	Alfa 2 Glicoproteína Rica en Leucina (LRG)	302	4.67	45.937	10	14	gi 16418467
205	Alfa 2 Glicoproteína Rica en Leucina (LRG)	231	4.72	44.95	20	13	gi 16418467
301	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	125	5.43	40.098	8	12	gi 112910
404	Alfa 1 Antiquimiotripsina (cadena A)	400	5.09	40.689	17	51	gi 443345
405	Alfa 1 Antiquimiotripsina (cadena A)	393	5.09	40.689	19	51	gi 443345
406	Alfa 1 Antiquimiotripsina (cadena A)	393	5.09	40.689	19	51	gi 443345
411	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	203	5.43	40.197	8	12	gi 2521983
1101	Clusterina / Apo J	90	5.97	46.356	8	32	gi 338057
1102	Clusterina / Apo J	89	5.97	46.356	6	12	gi 338057
1103	Clusterina / Apo J	208	6.27	49.342	11	27	gi 178855
1106	Clusterina / Apo J	244	6.27	49.342	11	20	gi 178855
1108	Clusterina / Apo J	165	5.74	36.997	10	23	gi 338305
1301	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	182	5.22	38.142	5	12	gi 2116653
1303	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	153	5.22	38.142	4	11	gi 2116653
1304	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	136	5.43	40.197	7	12	gi 2521983
1305	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	149	5.22	38.142	4	11	gi 2116653
1306	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	159	5.22	38.142	4	11	gi 112910
2101	Clusterina / Apo J	159	6.27	49.342	9	34	gi 178855
2102	Clusterina / Apo J	193	6.27	49.342	12	24	gi 178855
2104	Clusterina / Apo J	86	6.27	49.342	9	36	gi 178855
2105	Clusterina / Apo J	156	6.27	49.342	9	23	gi 178855
2112	Complejo Glicoproteína-HC (Alfa 1 Microglobulina)	86	5.84	20.592	5	41	gi 223373
2711	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	166	6.21	101.52	19	24	gi 19585669
3205	Apolipoproteína AIV	253	5.22	43.358	21	72	gi 178779
3407	Inhibidor de Serín Proteasa Clase C (Antitrombina)	385	5.95	49.35	20	55	gi 999513
3508	Alfa 1 Beta Glicoproteína	387	5.65	52.478	16	40	gi 69990
3701	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	223	6.64	103.536	21	23	gi 4096840
3702	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	298	6.51	103.549	26	28	gi 1483187
3703	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	356	6.64	103.536	27	30	gi 4096840
4001	Apolipoproteína A1 (estructura libre del lípido)	581	5.27	28.061	26	60	gi 90108664
4003	Apolipoproteína A1 (estructura libre del lípido)	555	5.56	30.758	25	32	gi 4557321
4203	Apolipoproteína AIV	537	5.22	43.358	33	76	gi 178779
4205	Beta-Actina	277	5.56	41.32	13	45	gi 14250401
4208	Apolipoproteína AIV	732	5.28	45.371	40	50	gi 93163358
4301	Proteína de unión a Vitamina D (cadena A)	204	5.22	52.806	11	18	gi 21730549
4310	Proteína de unión a Vitamina D (cadena A)	400	5.17	52.793	20	42	gi 28373620
4504	Alfa 1 Beta Glicoproteína	535	5.65	52.478	19	41	gi 69990
4704	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	365	6.51	103.521	29	31	gi 31542984
4705	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	155	6.51	103.522	20	22	gi 19585668
4706	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	298	6.51	103.549	26	21	gi 1483187
4901	Ceruloplasmina (Ferroxidasa), isoforma CRAc	149	5.48	117.54	13	13	gi 19599290
5702	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	189	6.21	101.52	21	25	gi 19585669
6003	Apolipoproteína A1 (estructura libre del lípido)	346	5.27	28.061	19	72	gi 90108664
6108	Antígeno MHC de Clase I	68	5.88	21.181	8	54	gi 10304435
6202	Fibrinógeno Gamma, isoforma CRAi	130	6.02	48.277	9	34	gi 119625320
6203	Fibrinógeno Gamma (fragmento carboxi terminal)	133	5.9	30.417	8	42	gi 2098510
6205	Fibrinógeno Gamma, isoforma CRAi	183	6.02	48.277	11	34	gi 119625320
6601	Complemento C1	166	5.89	81.687	14	19	gi 66347875
6602	Complemento C1	136	5.89	81.787	16	24	gi 62896521
6702	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAB	278	6.21	101.52	24	30	gi 19585669
7101	Apolipoproteína E, cadena A (fragmento de 22KDa)	78	5.76	22.169	5	26	gi 15826311
7602	Gelsolina (isoforma b)	314	5.58	80.875	21	32	gi 38044288

**TablaR\_14.** Lista de todas las proteínas identificadas correctamente mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF) en el estudio realizado sobre muestras de plasma pre-tratadas con el Kit comercial ProteoPrep20 (SIGMA). La tabla muestra por orden: la identificación numérica de cada uno de los spots analizados, el nombre de la proteína obtenido, la puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT (MOWSE SCORE), el punto isoeléctrico (pI), la masa molecular en Dalton, el número de péptidos contados para la identificación (C.P), el porcentaje de cobertura de secuencia (C.S en %) y el número asignado por la base de datos NCBI a cada proteína (NCBI ID).





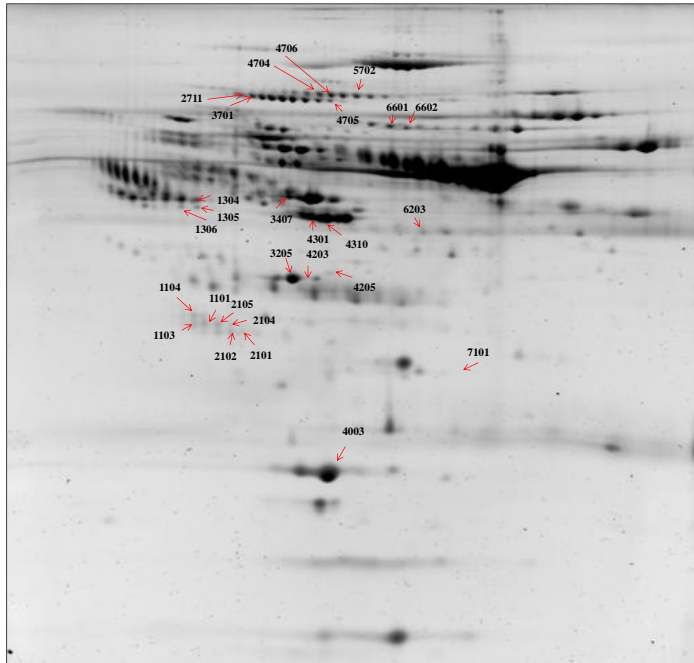
SPOT	PROTEÍNA	MOWSE	p.I.	MM (Da)	P. C.	C. S. (%)	NCBI ID
1304	Clusterina / Apo J	244	6.27	49.342	11	20	gi 178855
1504	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	182	5.22	38.142	5	12	gi 2116653
1506	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	153	5.22	38.142	4	11	gi 2116653
1509	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	136	5.43	40.197	7	12	gi 2521983
1603	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	149	5.22	38.142	4	11	gi 2116653
2201	Clusterina / Apo J	159	6.27	49.342	9	34	gi 178855
2210	Clusterina / Apo J	156	6.27	49.342	9	23	gi 178855
2304	Precursor de Paraoxonasa 1	525	5.08	39.877	16	58	gi 19923106
2402	Precursor de Paraoxonasa 1	513	4.96	37.982	15	51	gi 190194
2403	Precursor de Paraoxonasa 1	513	4.96	37.982	15	51	gi 190194
2501	Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	203	5.43	40.197	8	12	gi 2521983
2606	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	871	5.43	44.355	25	64	gi 6137432
3208	Clusterina / Apo J	244	6.27	49.342	11	20	gi 178855
3213	Proteína C Reactiva (Cadena A)	215	5.28	23.146	9	35	gi 1942435
3310	Apolipoproteína A IV	537	5.22	43.358	33	76	gi 178779
3501	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	794	5.37	44.279	27	64	gi 157831596
3503	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	1,090	5.37	44.279	29	71	gi 157831596
3507	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	926	5.37	44.279	29	71	gi 157831596
3509	Gamma Fibrinógeno, isoforma gamma-β	1,170	5.37	52.106	24	66	gi 70906439
3603	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	1,140	5.43	44.355	27	70	gi 6137432
3604	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	1,090	5.37	44.279	29	71	gi 157831596
3608	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	926	5.37	44.279	29	71	gi 157831596
3807	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	166	6.21	101.52	19	24	gi 19585669
3809	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	223	6.64	103.536	21	23	gi 4096840
4205	Proteína C Reactiva (Cadena A)	215	5.28	23.146	9	35	gi 1942435
4307	Apolipoproteína AIV	732	5.28	45.371	40	50	gi 93163358
4501	Fibrinógeno Gamma, isoforma gamma-β	1,170	5.37	52.106	24	66	gi 70906439
4503	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	926	5.37	44.279	29	71	gi 157831596
4504	Inhibidor de Serín Proteasas Clase C (Antitrombina)	385	5.95	49.35	20	55	gi 999513
4506	Fibrinógeno Gamma, isoforma gamma-β	1,170	5.37	52.106	24	66	gi 70906439
4606	Alfa 1 Antitripsina (cadena A)	926	5.37	44.279	29	71	gi 157831596
4804	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	356	6.64	103.536	27	30	gi 4096840
4810	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	365	6.51	103.521	29	31	gi 31542984
5203	Precursor de Apolipoproteína E	708	5.81	36.241	25	35	gi 178853
5210	Complemento C4A	233	5.92	48.036	9	23	gi 40737308
5217	Precursor de Apolipoproteína E	723	5.65	36.245	26	68	gi 4557325
5302	Fibrinógeno Gamma, isoforma CRAi	1,150	6.02	48.277	21	66	gi 19625320
5404	Fibrinógeno Gamma (cadena C)	1,170	5.54	47.008	22	62	gi 237823916
5406	Fibrinógeno Gamma, isoforma CRAi	1,150	6.02	48.277	21	66	gi 19625320
5408	Fibrinógeno Gamma, isoforma CRAi	1,150	6.02	48.277	21	66	gi 19625320
5409	Fibrinógeno Gamma (cadena C)	1,170	5.54	47.008	22	62	gi 237823916
5703	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAa	660	6.51	103.52	25	26	gi 19585668
5705	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4, isoforma CRAa	647	6.21	101.52	24	30	gi 19585669
5707	Hemopexina	89	6.43	49.948	10	16	CAA26382
5803	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	155	6.51	103.522	20	22	gi 19585668
5806	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	298	6.51	103.549	26	21	gi 1483187
5811	Fibrinógeno Gamma	804	5.61	50.077	19	55	gi 182439
6209	Precursor de Apolipoproteína E	78	5.76	22.169	5	26	gi 15826311
6801	Inhibidor de Inter Alfa Globulina H4	356	6.64	103.536	27	30	gi 4096840
6804	Fibrinógeno Gamma	801	5.61	52.091	19	50	gi 182439
6814	Fibrinógeno Gamma	794	5.61	50.077	19	55	gi 182439

**Tabla R\_15.** Lista de todas las proteínas identificadas correctamente mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF) en el estudio realizado sobre muestras de plasma pre-tratadas con el Kit comercial Proteo Miner™ (Bio-Rad). La tabla muestra por orden: la identificación numérica de cada uno de los *spots* analizados, el nombre de la proteína obtenido, la puntuación obtenida por la identificación en el programa MASCOT (MOWSE SCORE), el punto isoeléctrico (pI), la masa molecular en Dalton, el número de péptidos contados para la identificación (C.P), el porcentaje de cobertura de secuencia (C.S en %) y el número asignado por la base de datos NCBI a cada proteína (NCBI ID).

A continuación se muestran imágenes de los geles obtenidos (figura R\_27-30) tras cada una de las comparaciones realizadas por grupos de análisis y con ambos métodos de pre-tratamiento de la muestra; así como las tablas de cuantificación de *spots* (tablas R\_16-17) y las secciones de los geles que afectan a cada una de ellos (figuras R\_31-32).

## 6.1. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA MEDITERRÁNEA FRENTE A UNA DIETA MEDITERRÁNEA SUPLEMENTADA CON CoQ10

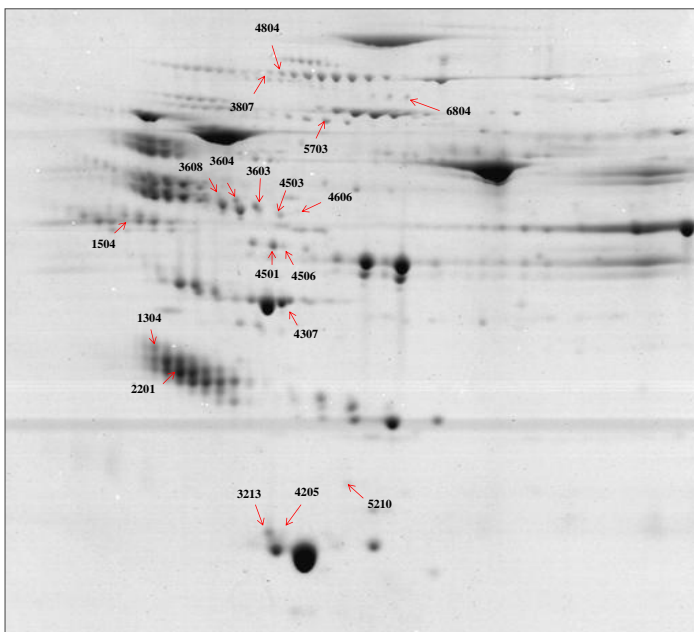
A)



Con el suplemento de CoQ<sub>10</sub>:

- Apolipoproteína E ↓
- Apolipoproteína A-I ↑
- Apolipoproteína J ↑
- Apolipoproteína A-IV { ↑ ↓ }
- β- Actina ↓
- α-2-HS Glicoproteína (FetuinA) ↓
- Proteína de Unión a la Vitamina D { ↑ ↓ }
- Inhibidor de Serín Proteasas Clase C ↑
- Fibrinógeno Gamma ↑
- Inhibidor Inter α H4P ↑
- Complemento C1 ↑

B)



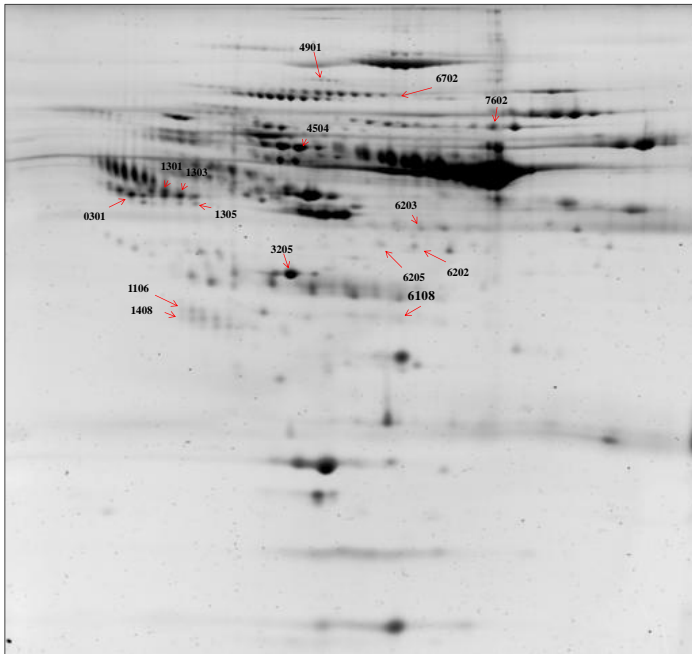
Con el suplemento de CoQ<sub>10</sub>:

- Proteína C Reactiva ↑
- Complemento C4A ↑
- Apolipoproteína J ↓
- Apolipoproteína A-IV ↓
- Fibrinógeno Gamma ↓
- α-2-HS Glicoproteína (FetuinA) ↑
- α-1-Antitripsina ↑
- Inhibidor Inter α H4P ↑

**Figura R\_27.** Proteínas identificadas en el estudio MUFA n-9 vs MUFA n-9 + CoQ<sub>10</sub> en geles obtenidos tras el tratamiento de las muestras con ProteoPrep 20 (A) y con ProteoMiner (B).

## 6.2. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA MEDITERRÁNEA FRENTE A UNA DIETA SATURADA

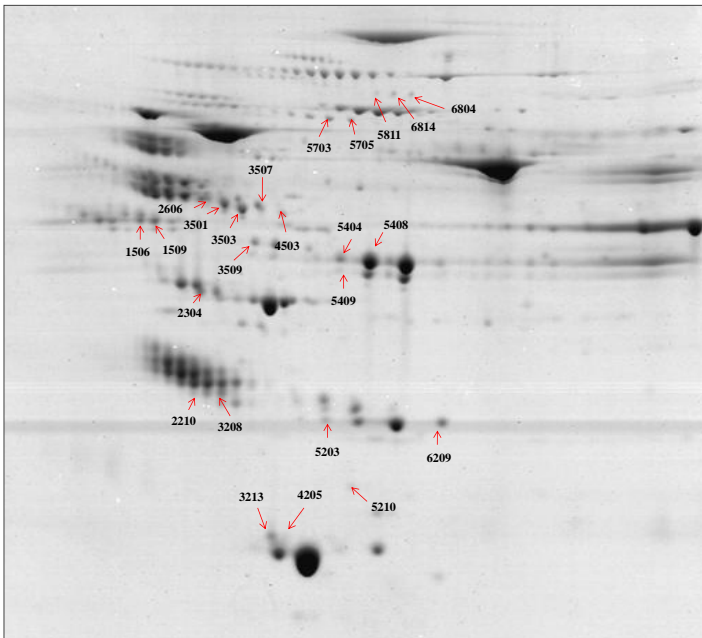
A)



Con la dieta Saturada (SFA):

- Antígeno MHC clase I ↓
- Apolipoproteína J ↑
- Apolipoproteína A-IV ↑
- Gelsolina ↓
- $\alpha$ -2-HS Glicoproteína (FetuinA) ↑
- Fibrinógeno Gamma ↑
- $\alpha$  1  $\beta$  Glicoproteína ↑
- Ceruloplasmina ↓
- Inhibidor Inter  $\alpha$  H4P ↓

B)



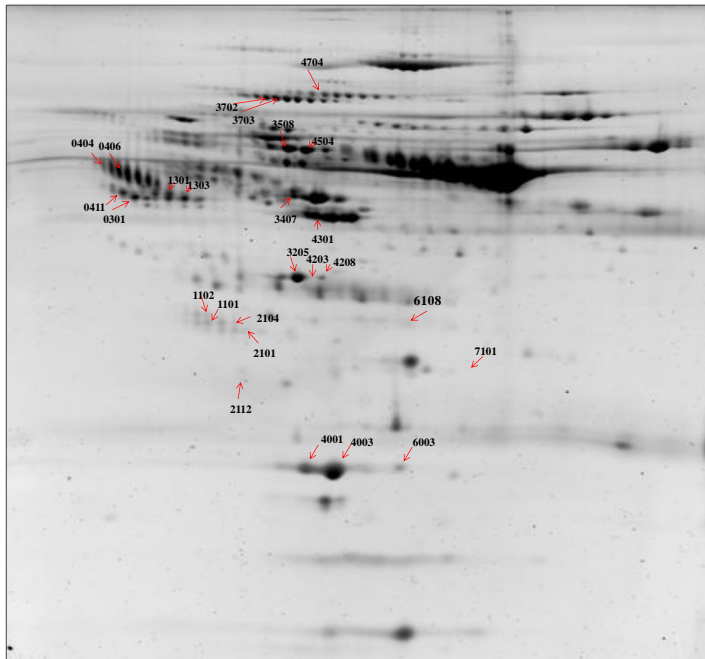
Con la dieta Saturada (SFA):

- Proteína C Reactiva ↑
- Complemento C4A ↑
- Apolipoproteína E { ↑ ↓ }
- Apolipoproteína J ↓
- $\alpha$ -2-HS Glicoproteína (FetuinA) ↑
- Fibrinógeno Gamma ↑
- $\alpha$  1 Antitripsina ↓
- Paraoxonasa 1 ↓
- Inhibidor Inter  $\alpha$  H4P ↑

**Figura R\_28.** Proteínas identificadas en el estudio MUFA n-9 vs SFA en geles obtenidos tras el tratamiento de las muestras con ProteoPrep 20 (A) y con ProteoMiner (B).

### 6.3. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA MEDITERRÁNEA FRENTE A UNA DIETA POLIINSATURADA

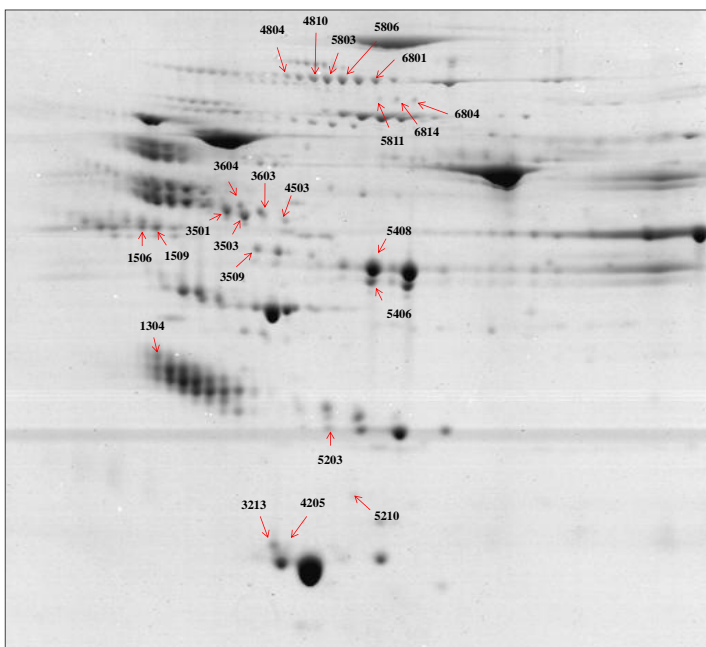
A)



Con la dieta Poliinsaturada (PUFA<sub>n-3</sub>):

- Apolipoproteína E ↓
- Apolipoproteína A-I ↓
- Apolipoproteína J ↑
- Apolipoproteína A-IV { ↓ ↑ }
- Antígeno MHC Clase I ↓
- α-2-HS Glicoproteína (FetuinA) ↑
- Proteína de Unión a la Vitamina D ↑
- Inhibidor de Serín Proteasas Clase C ↑
- α-1-β Glicoproteína ↑
- Inhibidor Inter α H4P ↑
- α-1-Antiquimiotripsina { ↓ ↑ }
- Complejo Glicoproteína-HC ↑

B)



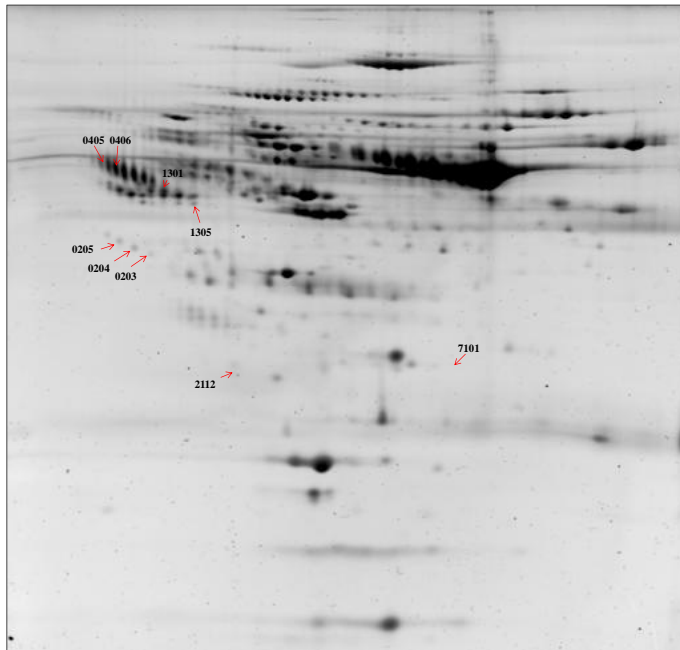
Con la dieta Poliinsaturada (PUFA<sub>n-3</sub>):

- Proteína C Reactiva ↑
- Complemento C4A ↑
- Apolipoproteína E ↓
- Apolipoproteína J ↓
- α-2-HS Glicoproteína (FetuinA) ↑
- Fibrinógeno Gamma ↑
- α 1 Antitripsina ↓
- Inhibidor Inter α H4P ↑

**Figura R\_29.** Proteínas identificadas en el estudio MUFA n-9 vs PUFA n-3 en geles obtenidos tras el tratamiento de las muestras con ProteoPrep 20 (A) y con ProteoMiner (B).

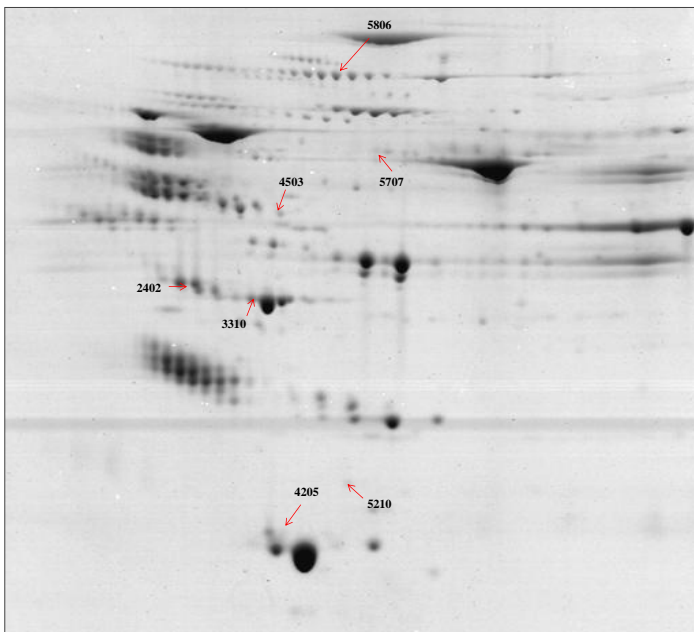
## 6.4. ESTUDIO DEL CONSUMO DE UNA DIETA POLIINSATURADA FRENTE A UNA DIETA SATURADA

A)

Con la dieta Poliinsaturada (PUFA<sub>n-3</sub>):

- $\alpha$ -1-Antiquimiotripsina  $\begin{matrix} \uparrow \\ \downarrow \end{matrix}$
- Apolipoproteína E  $\downarrow$
- Complejo Glicoproteína-HC  $\uparrow$
- $\alpha$ -2-Glicoproteína rica en Leucina  $\downarrow$
- $\alpha$ -2-HS Glicoproteína (FetuinA)  $\downarrow$

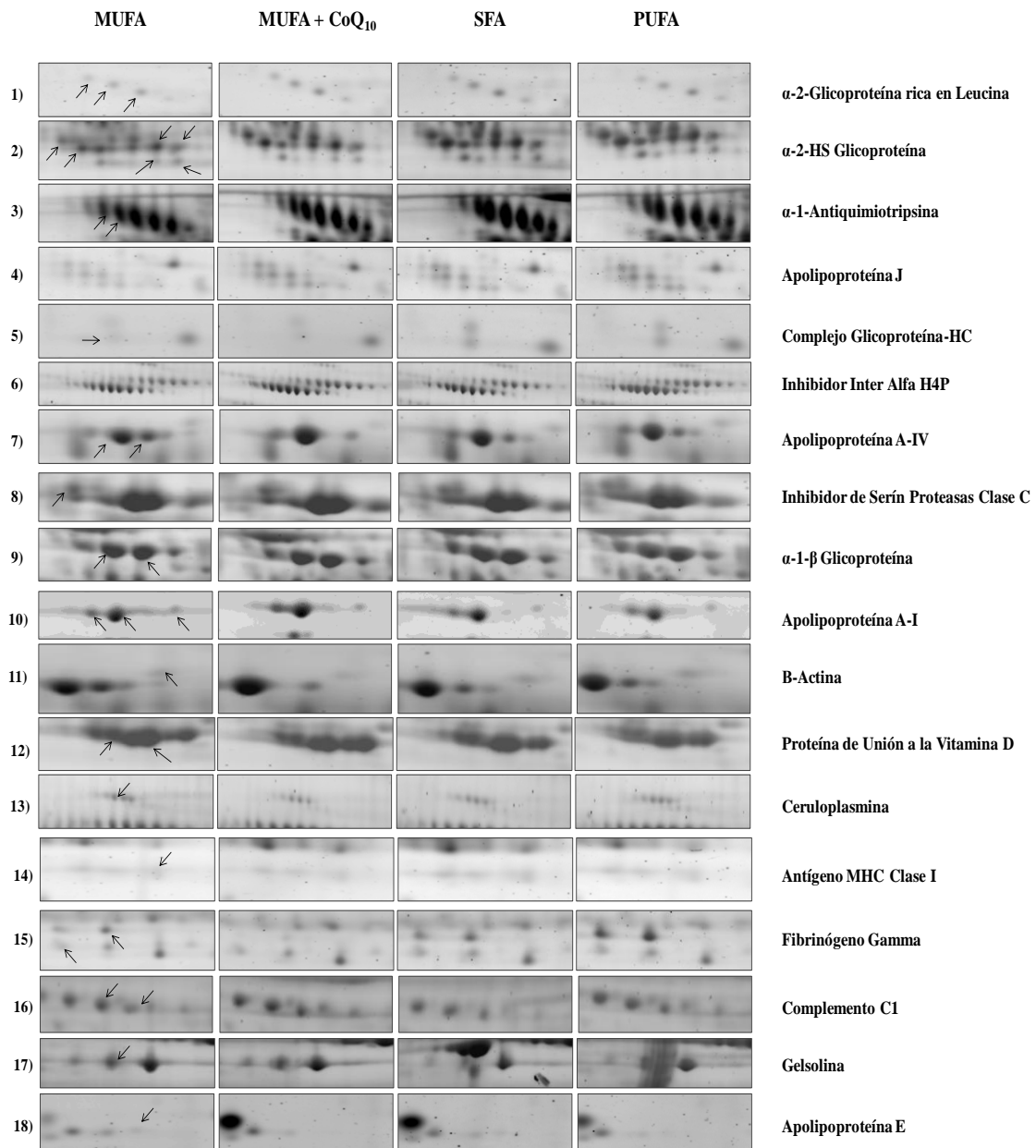
B)

Con la dieta Poliinsaturada (PUFA<sub>n-3</sub>):

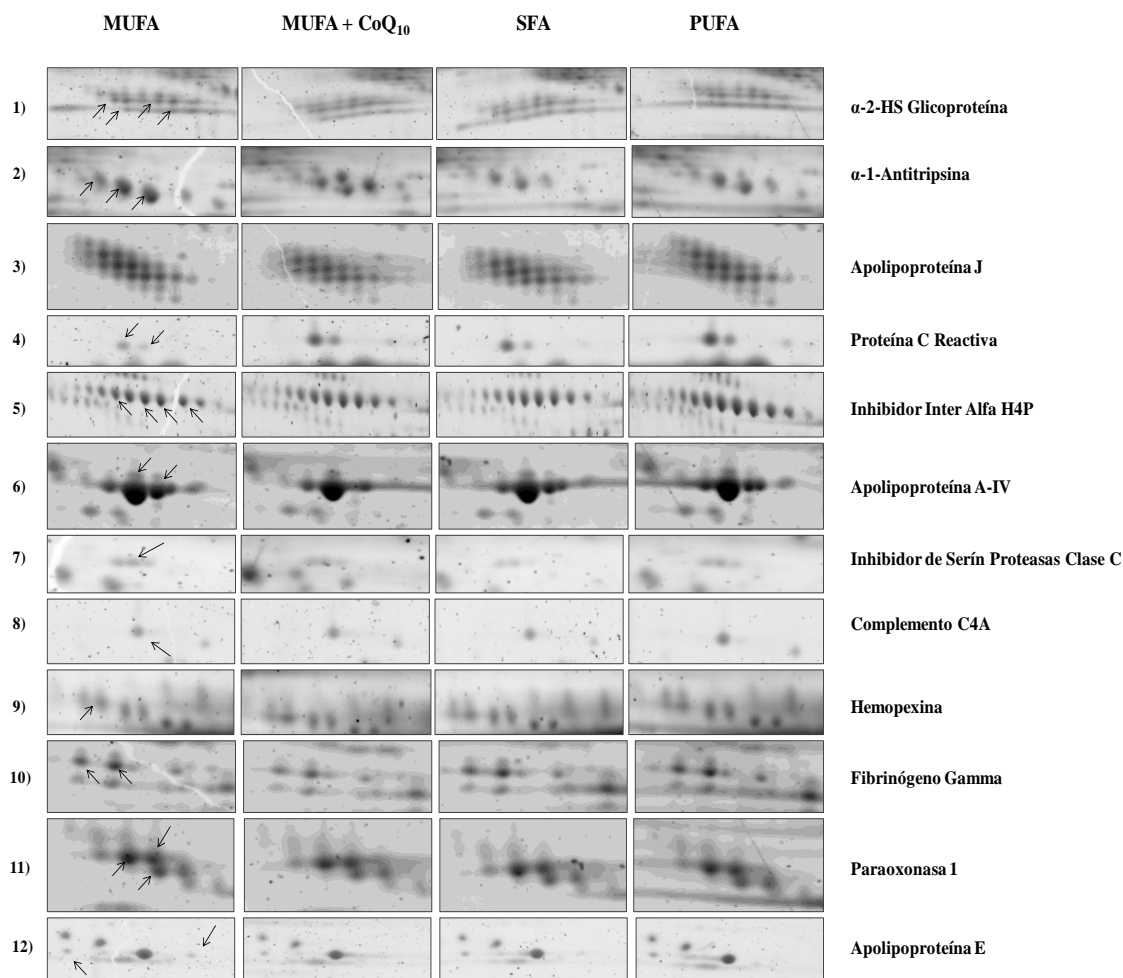
- Proteína C Reactiva  $\uparrow$
- Complemento C4A  $\uparrow$
- Apolipoproteína A-IV  $\uparrow$
- Paraoxonasa 1  $\uparrow$
- Hemopexina  $\downarrow$
- $\alpha$  1 Antitripsina  $\uparrow$
- Inhibidor Inter  $\alpha$  H4P  $\downarrow$

**Figura R\_30.** Proteínas identificadas en el estudio SFA vs PUFA n-3 en geles obtenidos tras el tratamiento de las muestras con ProteoPrep 20 (A) y con ProteoMiner (B).



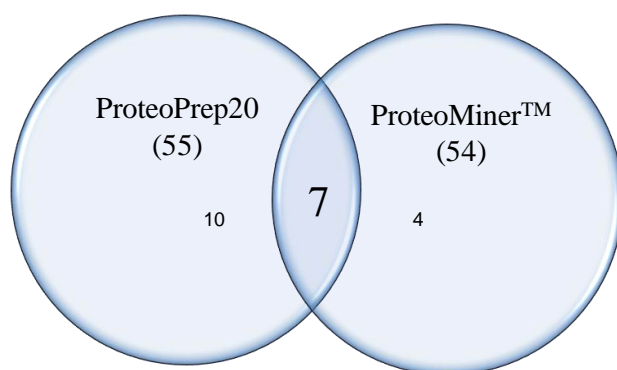


**Figura R\_31.** Secciones de los geles obtenidos tras el pretratamiento de las muestras con ProteoPrep 20 que mostraron diferencias significativas tras la administración de las cuatro dietas experimentales. Como se observa en la figura se vieron afectadas un total de 18 proteínas.



**Figura R\_32.** Secciones de los geles obtenidos tras el pretratamiento de las muestras con Proteo Miner que mostraron diferencias significativas tras la administración de las cuatro dietas experimentales. Como se observa en la figura se vieron afectadas un total de 12 proteínas.

Si comparamos ambos métodos de estudio (figura R\_33) observamos que coinciden siete proteínas entre ambos, de las cuales, no todas muestran los mismos cambios (mirar figuras R\_28-31).



**Figura R\_33.** Diagrama de Venn que ilustra las manchas proteicas que mostraron cambios estadísticamente significativos en los estudios realizados. 55 proteínas en total fueron identificadas en los geles obtenidos tras procesar las muestras con ProteoPrep20 (18 proteínas diferentes), mientras que 54 fueron identificadas tras el procesamiento de las muestras con Proteo Miner<sup>TM</sup> (11 proteínas diferentes). De las proteínas identificadas 7 coincidieron entre los grupos comparados (aunque los cambios eran contradictorios), 10 sólo se encontraron tras el uso de ProteoPrep20 y 4 tras el uso de Proteo Miner<sup>TM</sup>.



## Resultados y Discusión

SSP	MUFA n-9	CV	Ratio	MUFA n-9 + Q	CV	Ratio	SFA	CV	Ratio	PUFA n-3	CV	Ratio
301	5716071.5	15.60%	1	7014588.5	14.90%	1.23	907575	6.60%	1.59	10313562	7.20%	1.8
303	1278464.9	7.40%	1	861002.7	19.70%	0.67	2190179	21.70%	1.71	1994070.3	13.00%	1.56
404	4076270.3	12.40%	1	2710569	30.20%	0.66	3990334.3	25.40%	0.98	3169584.5	4.00%	0.78
406	1318727	7.10%	1	12638070	12.60%	0.96	13187083	17.40%	1	17715342	4.70%	1.34
411	290996.8	81.00%	1	5574467	5.40%	1.92	6447147.5	8.20%	2.22	7696833.5	9.60%	2.64
910	27114.8	14.50%	1	30715.4	2.80%	1.13	85394.9	25.30%	3.15	70284.1	23.90%	2.59
911	23829.8	22.30%	1	26997.6	20.80%	1.13	95580.5	39.80%	4.01	58961.4	8.20%	2.47
1101	432244.5	12.20%	1	605316.1	8.60%	1.4	786370.4	45.40%	1.82	626557.5	15.50%	1.45
1102	245635.6	25.20%	1	294453.3	4.60%	1.2	401760.4	50.70%	1.64	378047.4	6.70%	1.54
1103	31367.2	11.40%	1	446105.1	14.60%	1.43	489235.5	59.20%	1.57	209812.9	46.40%	0.67
1104	299117.1	13.50%	1	508581.7	5.60%	1.7	713353.7	38.10%	2.38	465576.7	25.20%	1.56
1106	77479	28.00%	1	90997.1	14.10%	1.17	208676.8	34.60%	2.69	119662.1	31.10%	1.54
1107	39876.6	74.90%	1	95329.6	15.50%	2.39	150029.4	44.40%	3.76	77819	27.20%	1.95
1108	57222.4	1.20%	1	120139.9	39.10%	2.1	158651.7	28.50%	2.77	65964.3	7.30%	1.15
1301	1212422.8	35.70%	1	2848171.8	43.60%	2.35	8836944	18.90%	7.29	5500171	12.90%	4.54
1302	6782003.5	0.70%	1	5959252.5	21.70%	0.88	2413746	24.40%	0.36	4616490	18.00%	0.68
1303	5217497	9.80%	1	6312798	10.80%	1.21	8226933	11.30%	1.58	8642419	7.40%	1.66
1304	3334438.3	5.10%	1	2792998	4.00%	0.84	2965378.3	13.70%	0.89	3479720.8	9.20%	1.04
1305	1363882	5.90%	1	744462.9	11.00%	0.55	1664368.8	8.30%	1.22	1285363.3	11.00%	0.94
1306	981576.2	23.90%	1	500963.6	4.50%	0.51	1344673	26.50%	1.37	1145152.5	21.60%	1.17
1506	2210549.8	15.60%	1	3604861.5	61.40%	1.63	2802645.8	41.90%	1.27	3959842.8	18.00%	1.79
1509	1456673.3	3.10%	1	3194782.8	103.10%	2.19	1524741.8	67.60%	1.05	2197547.8	12.80%	1.51
1611	1148437.8	7.30%	1	1890097.8	46.80%	1.65	1583612.5	78.50%	1.38	2245998.5	13.80%	1.96
2101	107149.9	20.10%	1	178774.1	14.90%	1.67	308747	44.80%	2.88	270729.7	13.90%	2.53
2102	290098.7	13.90%	1	449706.6	7.80%	1.55	573566.1	63.20%	1.98	369591	19.60%	1.27
2104	95232.2	31.90%	1	187877.3	9.20%	1.97	198875.2	99.70%	2.09	151890.5	5.60%	1.6
2105	400512.2	23.70%	1	647922.3	8.00%	1.62	759002.4	53.30%	1.9	547226.6	17.90%	1.37
2106	164511.7	27.50%	1	46759.4	16.00%	0.28	54751.4	89.20%	0.33	60476.4	35.00%	0.37
2112	146002.7	102.70%	1	62099.3	50.30%	0.43	264340.3	30.90%	1.81	476877.5	13.60%	3.27
2113	135137.5	14.40%	1	24406.3	139.50%	0.18	46683.1	138.30%	0.35	2846.2	170.60%	0.02
2604	399508.5	22.30%	1	581727.1	4.40%	1.46	307968.3	66.60%	0.77	484640.8	33.30%	1.21
2605	294428.8	29.90%	1	514859	34.50%	1.75	682951.4	82.90%	2.32	486632.9	6.60%	1.65
2606	575843.4	28.90%	1	569933.3	32.20%	0.99	690727.8	55.80%	1.2	976189	15.70%	1.7
2607	449046.4	17.40%	1	696665.4	41.20%	1.55	533225.8	54.90%	1.19	595370	2.90%	1.33
2711	673487.4	63.50%	1	1600401.4	22.60%	2.38	1309420.6	70.50%	1.94	1257549.3	18.90%	1.87
3002	712239.1	18.30%	1	573980.5	53.50%	0.81	1070461.5	52.20%	1.5	1355841.1	19.10%	1.9
3101	1608566.6	13.20%	1	1262552.5	11.70%	0.78	1326251.9	4.80%	0.82	1057786.1	7.50%	0.66
3103	650208.4	30.10%	1	445288.7	41.90%	0.68	381831.7	46.60%	0.59	159193.7	56.70%	0.24
3205	1019459	1.90%	1	1319777.2	4.50%	1.29	1342489.6	14.60%	1.32	11924568	7.40%	1.17
3407	1350262.9	19.10%	1	2185859.8	3.30%	1.62	6085054.5	111.90%	4.51	4549338	24.80%	3.37
3504	2876296.5	18.60%	1	4707709.5	28.00%	1.64	3235870.5	36.80%	1.13	4245904	10.00%	1.48
3508	1287611.1	2.30%	1	14210209	8.50%	1.1	15942514	24.30%	1.24	14855028	5.90%	1.15
3609	147639	15.80%	1	205607.4	13.10%	1.39	204453.6	23.60%	1.38	217282.1	24.60%	1.47
3701	1738925.5	7.40%	1	2168893.5	10.80%	1.25	2218792.3	56.40%	1.28	1911366.6	32.10%	1.1
3702	2677065.5	8.80%	1	3252082.8	12.40%	1.21	3411891	30.00%	1.27	3816549.3	4.30%	1.43
3703	3632103.3	6.90%	1	4552601	13.30%	1.25	4508036.5	21.80%	1.24	4766920.5	12.40%	1.31
4001	8185748.5	7.80%	1	9594150	38.70%	1.17	12960040	106.10%	1.58	4308710.5	53.70%	0.53
4003	22245854	1.90%	1	31427582	8.60%	1.41	20624764	61.80%	0.93	19127162	7.10%	0.86
4102	393872.1	8.50%	1	383100.8	11.70%	0.97	506032.1	10.50%	1.28	383854.3	14.40%	0.97
4103	618506.6	12.50%	1	446637.1	31.50%	0.72	381835.3	31.20%	0.62	287087.8	29.70%	0.46
4104	609497	29.70%	1	258052.2	22.80%	0.42	341838.3	83.50%	0.56	870626.3	22.80%	1.43
4203	4971436.5	6.60%	1	1347427.6	24.40%	0.27	3358056.3	28.70%	0.68	2298196.3	16.60%	0.46
4205	716444.6	18.00%	1	423671.8	1.00%	0.59	688373.3	17.30%	0.96	751544.9	7.50%	1.05
4206	517780.8	9.30%	1	113561.8	93.90%	0.22	650871.5	50.20%	1.26	170381.9	96.40%	0.33
4208	1689059.9	13.90%	1	1348780.9	11.80%	0.8	1473685.5	74.40%	0.87	945012.3	33.60%	0.56
4209	110995.3	5.40%	1	88437.9	7.00%	0.8	209124.8	46.50%	1.88	198258.1	42.90%	1.79
4210	3649021.8	7.50%	1	721207.8	9.90%	0.2	2068120.9	63.60%	0.57	1116494.1	7.80%	0.31
4301	4058608.8	24.50%	1	9448435	17.20%	2.33	7885744.5	38.10%	1.94	8091247	13.30%	1.99
4310	19102982	12.50%	1	7851835.5	79.10%	0.41	16635717	41.10%	0.87	12974529	40.60%	0.68
4504	14197727	4.80%	1	15013722	11.20%	1.06	18701408	4.60%	1.32	18475894	12.40%	1.3
4704	1744903	9.10%	1	2424812	6.20%	1.39	1844015.9	33.50%	1.06	2609465.5	18.10%	1.5
4705	1200972.5	8.00%	1	786486.8	4.10%	0.65	875591.8	63.10%	0.73	967899.3	22.40%	0.81
4706	2069040.4	7.10%	1	3106573.8	11.60%	1.5	2161852.8	20.80%	1.04	2621222.5	7.40%	1.27
4901	440605.8	22.40%	1	277904.6	35.80%	0.63	240971.9	28.90%	0.55	390588.3	29.00%	0.89
4908	1577088.1	18.80%	1	1545962	59.30%	0.98	1636449.4	94.50%	1.04	2513126	16.40%	1.59
5102	704871.3	23.00%	1	326591.5	32.30%	0.46	948995.3	23.70%	1.35	637171.3	14.10%	0.9
5105	417476.2	15.70%	1	1374329.1	25.40%	3.29	1765825.8	50.20%	4.23	938683.4	30.90%	2.25
5203	348905.5	5.80%	1	406629.8	6.90%	1.17	504838.5	16.80%	1.45	436449.3	1.70%	1.25
5205	653203.9	28.80%	1	2141612.5	38.30%	3.28	1620845.8	52.30%	2.48	626924.3	50.70%	0.96
5206	206699.9	23.60%	1	966014.6	44.90%	4.67	932030.9	67.60%	4.51	278412.5	38.60%	1.35
5702	1820549.1	11.10%	1	2276088.5	7.30%	1.25	1840811.5	11.40%	1.01	1987850	7.80%	1.09
5704	398041.1	10.10%	1	247469.3	9.10%	0.62	527672.5	109.00%	1.33	338484.3	26.40%	0.85
6003	2393548.5	26.40%	1	1595621.3	20.70%	0.67	1796084.3	30.60%	0.75	855377.9	33.20%	0.36
6105	359532	16.90%	1	145134.8	22.00%	0.4	136281.8	27.80%	0.38	87683.7	53.60%	0.24
6108	480470	20.20%	1	300003.4	70.30%	0.62	222567.5	28.80%	0.46	215200.7	39.70%	0.45
6202	637412.5	6.00%	1	665693.9	8.10%	1.04	869110.3	12.40%	1.36	724173.8	17.40%	1.14
6203	359809.8	27.80%	1	567936	11.70%	1.58	705404.7	10.10%	1.96	512507.4	34.10%	1.42
6205	498472.5	11.50%	1	493134.8	10.50%	0.99	743444.3	12.10%	1.49	609372.3	23.90%	1.22
6206	171480.8	36.70%	1	291769.9	37.70%	1.7	377394.3	25.80%	2.2	287830.3	12.10%	1.68
6601	1922580.4	12.20%	1	2637155.3	8.70%	1.37	2118399.8	26.90%	1.1	1858885.4	9.10%	0.97
6602	967643.1	20.10%	1	1569128.9	17.00%	1.62	1054013.1	30.20%	1.09	881578.1	8.90%	0.91
6702	421821.5	21.30%	1	517627.8	22.00%	1.23	244744.5	12.20%	0.58	368276.7	24.50%	0.87
7101	117766.7	17.30%	1	1527.9	51.10%	0.01	100605.1	26.40%	0.85	5415.7	97.30%	0.05
7103	1426559.6	11.90%	1	343021.1	38.10%	0.24	1158598.8	45.50%	0.81	580210.9	8.90%	0.41
7104	218628.9	32.60%	1	71390.1	30.10%	0.33	155236.7	66.30%	0.71	106818.8	95.50%	0.49
7602	4634834	17.00%	1	825995.1	99.10%	1.78	2648052.3	20.00%	0.57	5815582	104.00%	1.25
7606	3887888.3	26.90%	1	6076537	66.90%	1.56	6842271	59.30%	1.76	6751324.5	19.30%	1.74
8511	2920229.8	22.80%	1	4632568.5	16.50%	1.59	5011041.5	60.60%	1.72	3805454	13.80%	1.3
8514	10770796	18.50%	1									

SSP	MUFA n-9	CV	Ratio	MUFA n-9 + Q	CV	Ratio	SFA	CV	Ratio	PUFA n-3	CV	Ratio
203	438550.7	21.90%	0.54	555328.6	10.60%	0.68	812240.6	27.90%	1	364534.3	27.80%	0.45
204	338762.2	37.40%	0.58	438009.9	9.10%	0.75	587112.3	20.60%	1	241120.8	39.30%	0.41
205	176121	36.20%	0.53	239147.5	7.00%	0.72	331707.1	34.90%	1	104775.6	50.60%	0.32
405	10586210	25.30%	1.17	7845242	20.60%	0.87	9026526	4.80%	1	6186471.5	25.80%	0.69
406	13187727	7.10%	1	12638070	12.60%	0.96	13187083	17.40%	1	17715342	4.70%	1.34
1108	57222.4	1.20%	0.36	120139.9	39.10%	0.76	158651.7	28.50%	1	65964.3	7.30%	0.42
1301	1212422.8	35.70%	0.14	2848171.8	43.60%	0.32	8836944	18.90%	1	5500171	12.90%	0.62
1302	6782003.5	0.70%	2.81	5959252.5	21.70%	2.47	2413746	24.40%	1	4616490	18.00%	1.91
1305	1363882	5.90%	0.82	744462.9	11.00%	0.45	1664368.8	8.30%	1	1285363.3	11.00%	0.77
2112	146002.7	102.70%	0.55	62099.3	50.30%	0.23	264340.3	30.90%	1	476877.5	13.60%	1.8
2411	2021962.6	20.80%	0.47	4494558	35.90%	1.05	4284392	32.70%	1	1484374.1	19.40%	0.35
3101	1608566.6	13.20%	1.21	1262552.5	11.70%	0.95	1326251.9	4.80%	1	1057786.1	7.50%	0.8
3606	6297786.5	27.50%	0.65	9789281	52.20%	1.01	9684174	28.90%	1	4933520	18.20%	0.51
4005	1341133.8	51.80%	0.51	1390929.6	48.70%	0.52	2649536.3	18.60%	1	1137682	34.70%	0.43
4605	964481.8	35.20%	0.88	1233129.3	2.20%	1.12	1100987.5	12.80%	1	784359.2	5.30%	0.71
5204	153018.6	21.30%	0.84	128680.9	12.00%	0.71	181403.8	6.20%	1	126548.1	8.00%	0.7
5609	693024.4	40.20%	0.72	1123208.8	21.70%	1.17	961472.9	4.30%	1	680547.4	20.70%	0.71
6513	27519810	70.70%	0.68	20114150	78.80%	0.5	40497876	12.00%	1	15873140	19.40%	0.39
7101	117766.7	17.30%	1.17	1527.9	51.10%	0.02	100605.1	26.40%	1	5415.7	97.30%	0.05
7203	185209.1	89.20%	0.54	164896.3	32.90%	0.48	345387.4	17.00%	1	218923	16.90%	0.63
8202	2835812	37.00%	1.05	1930572.9	24.00%	0.71	2706918.8	11.70%	1	1743402	18.40%	0.64
8706	8387854.5	42.10%	1.22	14419490	11.70%	2.09	6896003	30.10%	1	11651298	7.30%	1.69

**Tabla R\_16.** Datos de cuantificación de los *spots* sobre geles obtenidos tras el procesamiento de las muestras con el Kit ProteoPrep20 (SIGMA). Se muestran los cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) (los que se presentan en negrita) tras administrar a los sujetos dietas ricas en MUFA n-9, PUFA n-3 y SFA, tomando como control la dieta mediterránea rica en ácido oleico (MUFA n-9) (primera tabla) y tomando como control la dieta rica en SFA (segunda tabla). Aparecen por columnas, de izquierda a derecha, el número asignado a cada una de los *spots* (SSP), la cuantificación de cada *spot* tras la normalización de los datos al comparar cada uno de los grupos de intervención dietética, la desviación estándar para cada dato (CV) y el efecto que tiene lugar en cada una de las proteínas tras la comparación por grupos. Se muestra mediante un código de colores los cambios obtenidos tras las comparaciones, donde el amarillo representa una bajada de expresión del *spot* con respecto a la dieta control y el verde un incremento, siendo estos de color más oscuro cuando son cambios por encima del doble o por debajo de la mitad. En gris se muestran los datos que no presentaron cambios estadísticamente significativos en cada uno de los análisis realizados. La localización de cada uno de los *spots* sobre los geles bidimensionales puede verse en la figura R\_ 7.

## Resultados y Discusión

SSP	MUFA n-9	CV	Ratio	MUFA n-9 + Q	CV	Ratio	SFA	CV	Ratio	PUFA n-3	CV	Ratio
1304	678819.4	1.90%	1	210687.5	34.90%	0.31	593629.4	58.80%	0.87	345443	8.30%	0.51
1504	228176.2	6.80%	1	712694	2.70%	3.12	632528.6	37.30%	2.77	570490.6	41.50%	2.5
1506	147816.1	22.50%	1	201964.2	72.20%	1.37	455077.3	9.10%	3.08	393201.3	6.40%	2.66
1509	408733.7	14.20%	1	597740.4	13.90%	1.46	752253.4	3.30%	1.84	808839	0.50%	1.98
1603	404407.8	5.10%	1	557436	14.90%	1.38	276293.2	69.00%	0.68	182243.7	10.60%	0.45
2201	1626483.3	2.90%	1	344180.1	28.50%	0.21	1324763.6	15.60%	0.81	2567290.5	44.80%	1.58
2210	272996.8	5.20%	1	64779.8	125.00%	0.24	149493.9	10.50%	0.55	203169.9	17.90%	0.74
2304	1132041	2.50%	1	975243.3	12.90%	0.86	941674.1	2.50%	0.83	1049539.3	19.60%	0.93
2308	941413.8	8.00%	1	1115107.6	16.70%	1.18	639940.1	18.00%	0.68	261506.1	7.60%	0.28
2403	297219.9	30.10%	1	959336.1	8.70%	3.23	599301.9	8.10%	2.02	406606.6	42.50%	1.37
2601	1018049.8	6.60%	1	1766503.3	9.10%	1.74	2225026.3	10.60%	2.19	2110388.8	18.60%	2.07
2606	769833.3	7.60%	1	768896.6	9.70%	1	497702.4	5.40%	0.65	455622.8	24.00%	0.59
2801	255003.3	17.30%	1	46737.6	73.80%	0.18	250984.6	15.70%	0.98	131207.7	84.40%	0.51
2805	348595.2	4.30%	1	281291.1	31.50%	0.81	352227.1	16.00%	1.01	294610	1.80%	0.85
2808	454780.9	4.70%	1	594154.8	4.20%	1.31	529552.6	23.00%	1.16	328796.7	32.90%	0.72
3208	787963.1	0.80%	1	504057.5	36.30%	0.64	626514	3.80%	0.8	593639	11.00%	0.75
3213	311686.1	16.80%	1	1028935.6	21.20%	3.3	900551.8	13.20%	2.89	1190089.8	10.00%	3.82
3309	213801.8	4.30%	1	174886.2	0.90%	0.82	198769.9	7.40%	0.93	197738.8	5.40%	0.92
3501	1343309.4	5.10%	1	1033028.8	24.40%	0.77	721859.4	9.50%	0.54	844237.8	8.50%	0.63
3503	1258519.5	0.90%	1	1008161.1	26.30%	0.8	715368.4	7.40%	0.57	749225.5	1.90%	0.6
3507	-	0.00%	1	-	0.00%	0.8	176136.2	5.80%	251.65	156167.4	14.40%	223.12
3509	121066	5.70%	1	59022.1	39.60%	0.49	227133.9	1.70%	1.88	297269.2	11.70%	2.46
3603	373896.6	5.00%	1	1193526.3	14.70%	3.19	166198.8	4.70%	0.44	157458.5	12.90%	0.42
3604	69661.8	44.20%	1	969901.1	14.70%	13.92	104397.3	73.40%	1.5	176905.2	2.40%	2.54
3607	22736.7	120.70%	1	203645.3	4.80%	8.96	6759	85.40%	0.3	320.2	75.40%	0.01
3608	31618.9	97.40%	1	457913.8	9.60%	14.48	218673.6	81.40%	6.92	214939.7	91.00%	6.8
3704	300654	8.40%	1	161650.1	35.60%	0.54	329205.6	83.00%	1.09	134190.3	8.20%	0.45
3807	66396.2	9.30%	1	107526.4	10.80%	1.62	111151.7	19.20%	1.67	121927.2	29.50%	1.84
3810	237816	18.20%	1	510683.2	8.60%	2.15	376673.6	12.70%	1.58	172360.8	20.00%	0.72
4205	90859.7	0.20%	1	451883.1	2.10%	4.97	234130.9	19.10%	2.58	396628.9	3.70%	4.37
4307	1466512.8	77.30%	1	219022.3	24.90%	0.15	1916422.3	15.10%	1.31	1178641.6	34.10%	0.8
4501	1109014.1	2.40%	1	743237.6	9.40%	0.67	984189.3	12.90%	0.89	928363.7	21.80%	0.84
4503	289521.3	6.50%	1	177311.9	5.90%	0.61	153060.4	5.10%	0.53	191396.3	5.10%	0.66
4504	94413.4	4.40%	1	54753.1	56.50%	0.58	74252.4	4.10%	0.79	61330.5	26.50%	0.65
4506	239217.8	4.60%	1	134741	6.80%	0.56	242812.6	11.00%	1.02	237545.6	12.10%	0.99
4606	13093.7	86.00%	1	172573.8	9.10%	13.18	6089.6	16.30%	0.47	15294.4	68.70%	1.17
4803	106248.8	5.90%	1	108928.9	14.20%	1.03	87783.6	5.30%	0.83	73478.1	11.40%	0.69
4804	130028.1	12.90%	1	209133	0.80%	1.61	208432.1	10.10%	1.6	240748.5	12.00%	1.85
4810	368332.8	14.20%	1	508246.2	11.90%	1.38	477073.7	11.50%	1.3	570396.1	5.10%	1.55
5203	162797.4	2.10%	1	169883.1	26.90%	1.04	213148.1	2.90%	1.31	204177.3	6.10%	1.25
5210	524691.6	1.80%	1	627848.6	1.90%	1.2	561371.4	0.80%	1.07	758085.8	1.70%	1.44
5214	9388.6	66.40%	1	13754.6	0.30%	1.47	48259.6	41.00%	5.14	109363.6	3.00%	11.65
5217	227735.5	2.10%	1	80856	90.50%	0.36	132729.3	24.20%	0.58	124454.6	0.90%	0.55
5302	136475.3	1.80%	1	189997.4	22.40%	1.39	264134.5	1.40%	1.94	285409.5	34.40%	2.09
5404	734514.6	20.30%	1	740781.3	11.00%	1.01	1476974.3	9.20%	2.01	1228600	7.20%	1.67
5406	1686085	10.20%	1	1976121.8	8.40%	1.17	2092911.8	13.90%	1.24	2383514	5.60%	1.41
5408	2884038.3	1.50%	1	3795849.3	41.60%	1.32	5207396	1.90%	1.81	4715111.5	11.40%	1.63
5409	158155.7	53.90%	1	248952	6.10%	1.57	443831.3	4.10%	2.81	477535	13.70%	3.02
5703	177872.5	1.70%	1	212520.2	1.60%	1.19	244795.7	4.80%	1.38	191486.1	10.50%	1.08
5705	118079.8	5.40%	1	130293.3	1.00%	1.1	181765.1	5.90%	1.54	135306.1	9.10%	1.15
5803	480626.8	8.20%	1	692328.7	8.50%	1.44	622903.1	5.10%	1.3	725520.8	5.20%	1.51
5804	157635.2	0.70%	1	160854.8	0.70%	1.02	128321	28.90%	0.81	91507.5	9.60%	0.58
5806	537230.3	7.90%	1	632403.3	6.40%	1.18	601546.9	0.70%	1.12	730112.8	3.60%	1.36
5811	74940.2	19.90%	1	110009.6	7.40%	1.47	150092.8	3.10%	2	188593.5	10.60%	2.52
5812	16872	25.20%	1	19955.5	2.80%	1.18	45091.9	1.20%	2.67	39455.8	15.50%	2.34
6103	182155.6	3.00%	1	142878.9	1.80%	0.78	59596.2	53.50%	0.33	153209.1	11.50%	0.84
6207	139018.9	3.40%	1	183355.7	0.70%	1.32	196818.5	21.40%	1.42	219537.3	12.30%	1.58
6209	108994.4	0.40%	1	46026.7	131.50%	0.42	66451.4	18.10%	0.61	83790.6	105.40%	0.77
6302	42933.3	28.40%	1	103007.9	7.10%	2.4	78351.2	13.90%	1.82	65620	5.10%	1.53
6705	879073.8	5.50%	1	786858.1	10.50%	0.9	436186.1	11.80%	0.5	670133.2	7.50%	0.76
6801	394758.9	2.60%	1	394675	0.70%	1	442901.2	5.30%	1.12	505279.9	5.60%	1.28
6804	152733.2	1.30%	1	180559.3	4.90%	1.18	250379.9	7.40%	1.64	260880.3	5.20%	1.71
6814	185095.6	6.60%	1	203659.2	3.00%	1.1	284410.9	9.40%	1.54	318272.3	3.70%	1.72
7604	1820452.4	5.60%	1	131472.3	96.00%	0.07	601195.1	13.70%	0.33	1608433.8	1.60%	0.88
7610	1944424.3	11.60%	1	2598438	74.70%	1.34	820978.5	14.10%	0.42	2166398	49.60%	1.11

SSP	MUFA n-9	CV	Ratio	MUFA n-9 + Q	CV	Ratio	SFA	CV	Ratio	PUFA n-3	CV	Ratio
2308	941413.8	8.00%	1.47	1115107.6	16.70%	1.74	639940.1	18.00%	1	261506.1	7.60%	0.41
2402	2122994.8	3.70%	1.07	2158622	4.20%	1.09	1980388.3	0.50%	1	2160824.8	1.70%	1.09
2501	558583.7	36.90%	1.89	385948.6	74.80%	1.31	295451.8	6.20%	1	411327.5	0.40%	1.39
2809	298097.4	43.70%	0.91	281687.5	14.30%	0.86	328314.8	1.40%	1	266705.2	3.10%	0.81
3212	120084.7	9.80%	0.81	126959.9	5.70%	0.86	148214.8	6.10%	1	66449.8	26.30%	0.45
3310	2026142.3	32.20%	1.32	1721310.9	15.10%	1.12	1540406.6	0.00%	1	2599163.5	1.40%	1.69
3809	39314.8	108.70%	0.48	72410.7	44.50%	0.88	81932.8	11.50%	1	41347.4	17.50%	0.5
3810	237816	18.20%	0.63	510683.2	8.60%	1.36	376673.6	12.70%	1	172360.8	20.00%	0.46
4205	90859.7	0.20%	0.39	451883.1	2.10%	1.93	234130.9	19.10%	1	396628.9	3.70%	1.69
4306	101095.5	27.50%	0.93	87187.4	4.70%	0.8	108717.2	0.40%	1	122081.6	0.20%	1.12
4503	289521.3	6.50%	1.89	177311.9	5.90%	1.16	153060.4	5.10%	1	191396.3	5.10%	1.25
5210	524691.6	1.80%	0.93	627848.6	1.90%	1.12	561371.4	0.80%	1	758085.8	1.70%	1.35
5211	186737.3	10.40%	1.08	153504.7	57.60%	0.89	172776.3	5.00%	1	209359.1	2.50%	1.21
5214	9388.6	66.40%	0.19	13754.6	0.30%	0.29	48259.6	41.00%	1	109363.6	3.00%	2.27
5304	179664.2	31.00%	1.25	216704.5	1.30%	1.51	143519.5	5.00%	1	81426	8.10%	0.57
5706	1337837.6	9.50%	1	1414336.3	20.80%	1.06	1338478.6	2.50%	1	1104242	4.30%	0.82
5707	251802.6	13.50%	0.87	266906.4	17.60%	0.92	289861.4	5.80%	1	208494.1	8.00%	0.72
5806	537230.3	7.90%	0.89	632403.3	6.40%	1.05	601546.9	0.70%	1	730112.8	3.60%	1.21
6705	879073.8	5.50%	2.02	786858.1	10.50%	1.8	436186.1	11.80%	1	670133.2	7.50%	1.54
6707	382998.8	17.20%	1.11	431275.2	18.10%	1.25	344723.1	8.70%	1	474159.8	0.40%	1.38
7604	1820452.4	5.60%	3.03	131472.3	96.00%	0.22	601195.1	13.70%	1	1608433.8	1.60%	2.68

**Tabla R\_17.** Datos tras la cuantificación de los *spots* sobre geles obtenidos tras el procesamiento de las muestras con el Kit Proteo Miner™ (Bio-Rad).. Se muestran los cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) (los que se presentan en negrita) tras administrar a los sujetos dietas ricas en MUFA n-9, PUFA n-3 y SFA, tomando como control la dieta mediterránea rica en ácido oleico (MUFA n-9) (primera tabla) y tomando como control la dieta rica en SFA (segunda tabla). Aparecen por columnas, de izquierda a derecha, el número asignado a cada una de los *spots* (SSP), la cuantificación de cada *spot* tras la normalización de los datos al comparar cada uno de los grupos de intervención dietética, la desviación estándar para cada dato (CV) y el efecto que tiene lugar en cada una de las proteínas tras la comparación por grupos. Se muestra mediante un código de colores los cambios obtenidos tras las comparaciones, donde el amarillo representa una bajada de expresión del *spot* con respecto a la dieta control y el verde un incremento, siendo estos de color más oscuro cuando son cambios por encima del doble o por debajo de la mitad. En gris se muestran los datos que no presentaron cambios estadísticamente significativos en cada uno de los análisis realizados. La localización de cada uno de los *spots* sobre los geles bidimensionales puede verse en la figura R\_8.

Si tenemos en cuenta todos los resultados obtenidos en los estudios proteómicos utilizando ambos métodos de procesamiento de las muestras (ProteoPrep20 y ProteoMiner), observamos que existen discrepancias entre los resultados. Esto es de esperar, ya que ambos métodos tienen una finalidad distinta y nos aportan diferente tipo de información. Por un lado, el ProteoPrep20, al ser un método de depleción que elimina del orden de 20 proteína mayoritarias del plasma, estudia posibles cambios sobre las proteínas minoritarias que se encuentran muy poco concentradas y que son difíciles de detectar en presencia de proteínas mayoritarias. Como se observa en nuestros resultados (figura R\_25), hemos observado cambios sobre proteínas como  $\beta$ -actina ó gelsolina, las cuales se encuentran dentro del 1% de proteínas que forman parte del total (figura M\_I) y que serían imposibles de detectar si no realizamos una depleción previa de la muestra. Por otro lado, el ProteoMiner, no elimina ninguna de las proteínas presentes en el plasma pero sí normaliza el enorme rango dinámico de concentración que presenta este tipo de muestras. De esta forma, los cambios observados sobre los niveles de proteínas (figura R\_26) han afectado a proteínas que se encuentran en mayor

concentración, como el fibrinógeno o la alfa 1 antitripsina, las cuales eran eliminadas con el anterior método.

Por lo tanto, es importante tener en cuenta los resultados de ambos métodos de procesamiento de las muestras y conocer muy bien el mecanismo de acción de cada uno de los métodos utilizados para interpretar posteriormente nuestros resultados.

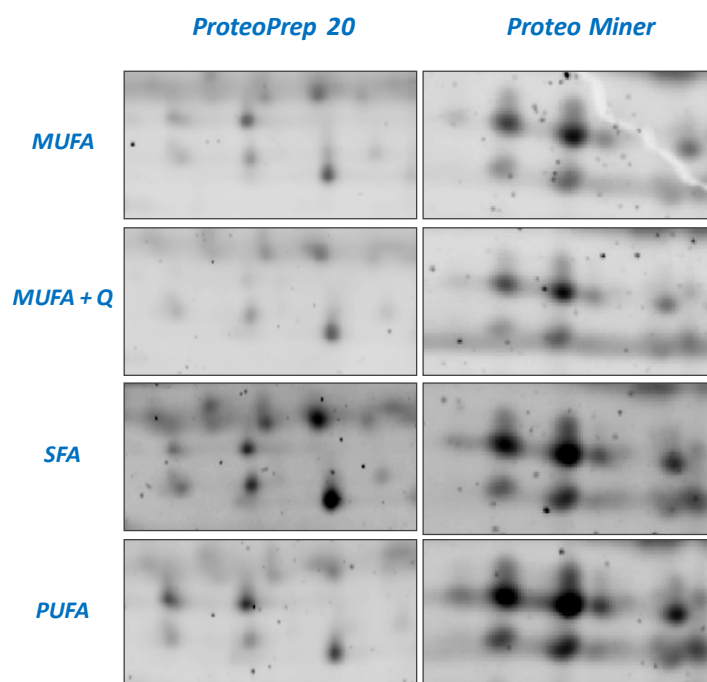
## 7. VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS MEDIANTE WESTERN BLOT

Los cambios observados para algunas de las proteínas a lo largo este estudio, fueron validados mediante inmunotinción (Western Blot) empleando para ello anticuerpos específicos (tabla M\_2. Materiales y Métodos).

El **Fibrinógeno** se separa en varias isoformas sobre los geles bidimensionales (que difieren en masa y en carga) las cuales corresponden a las cadenas Alfa, Beta y Gamma de la proteína. Una vez realizamos los análisis sobre los geles 2-D, observamos que utilizando previamente en las muestras el Kit de depleción ProteoPrep 20 (el cual elimina el fibrinógeno) encontramos restos de la proteína que se corresponden con la cadena Gamma del fibrinógeno. Estos *spots* mostraron cambios de expresión entre las diferentes dietas experimentales, de manera que una de sus isoformas incrementó significativamente con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> a la mitad, mientras que el resto de isoformas no mostraron cambios significativos. Por el contrario, todas estas isoformas incrementaron por encima del doble con la dieta SFA y no mostraron cambios significativos con la dieta PUFA<sub>n-3</sub>, todas ellas al ser comparadas con una dieta mediterránea (MUFA<sub>n-9</sub>). Por otro lado, tras analizar los geles 2-D obtenidos tras utilizar el Kit Proteo Miner<sup>TM</sup> (no elimina ninguna de las proteínas), encontramos once isoformas de Gamma Fibrinógeno que variaban su expresión con las diferentes dietas experimentales, de manera que, tres de ellas (las mismas que en el caso anterior) disminuían significativamente tras el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub>, mientras que las mismas isoformas mostraron un incremento con las dietas SFA y PUFA<sub>n-3</sub>. El resto de isoformas incrementaron mucho de manera significativa con las dietas SFA y PUFA<sub>n-3</sub> al ser comparadas con una dieta mediterránea, mientras que no mostraron cambios

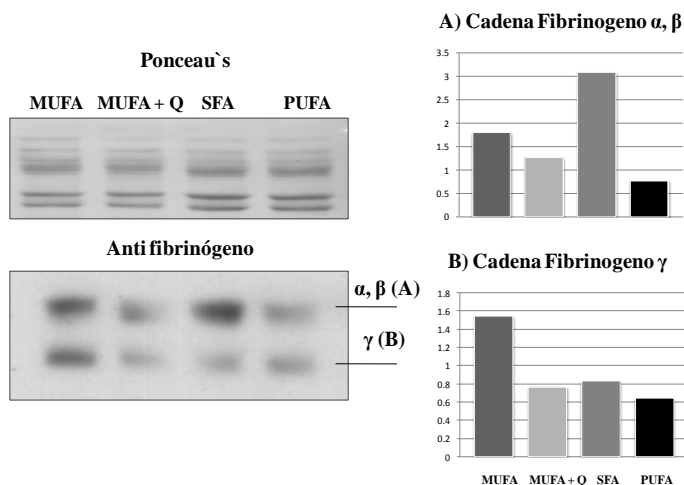
estadísticamente significativos tras la suplementación de la dieta con CoQ<sub>10</sub> (Figura R\_34).

Para comprobar estos cambios observados en los geles bidimensionales, cuantificamos la proteína mediante inmunotinción. En un primer lugar, estudiamos la expresión sobre *pools* representativos de las cuatro dietas experimentales, con el fin de comprobar si se mantenía el mismo patrón de expresión observado sobre los geles 2-D. Para ello 5µg de proteína fueron separados en geles de 7.5% de poliacrilamida. Como se puede ver en la figura R\_35, se detectaron sobre los geles varias bandas con tamaños comprendidos entre 40 y 66 KDa, que correspondían con los pesos teóricos de las cadenas Alfa, Beta y Gamma de la proteína (47, 55 y 66 KDa respectivamente). Con ello, consideramos que las bandas más pesadas correspondían a las cadenas Alfa y beta y la menos pesada a la cadena Gamma del Fibrinógeno. La expresión de Alfa y Beta Fibrinógeno se vio disminuida con las dietas PUFA<sub>n-3</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> e incrementada con la dieta SFA al ser comparadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (figura R\_35. A). Por otro lado, la cadena Gamma del Fibrinógeno se vio disminuida en las dietas MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub>, SFA y PUFA<sub>n-3</sub> al ser comparadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (figura R\_35.B).



**Figura R\_34.** Imagen representativa de parte de los geles bidimensionales donde encontramos el fibrinógeno. Se observan proporciones de geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras de plasma con ambos métodos de procesamiento (ProteoPrep20 y ProteoMiner<sup>TM</sup>). En los geles 2-D se aprecia claramente, tanto el efecto que tienen las diferentes dietas sobre los niveles de fibrinógeno, como

la eficiencia de ambos métodos de procesamiento. Como se observa, las diferencias obtenidas son mucho mayores cuando utilizamos el Kit ProteoMiner™, lo cual es lógico ya que el ProteoPrep20 elimina esta proteína, a pesar de encontrar restos de la misma en los geles bidimensionales.



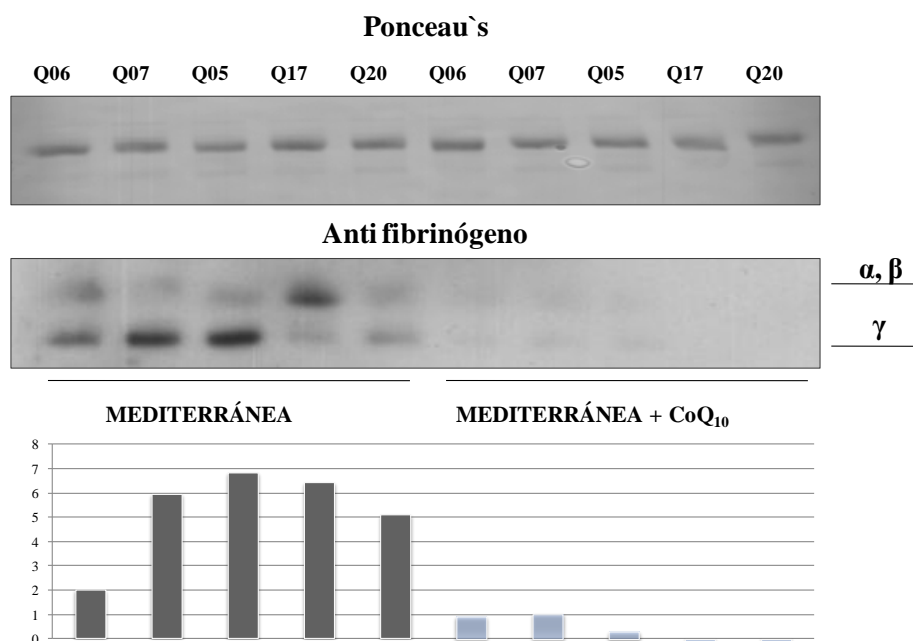
**Figura R\_35.** Cuantificación de Fibrinógeno sobre *pools* representativos de las cuatro dietas experimentales procesadas con Proteo Miner™. A la derecha de la imagen se observa el gel monodimensional al 7.5% de poliacrilamida teñido con Rojo Ponceau (arriba) e incubado con el anticuerpo (abajo). A la izquierda de la imagen se observan los gráficos obtenidos tras la cuantificación de Alfa y Beta Fibrinógeno (A) y de Gama Fibrinógeno (B) finalizada la inmunotinción.

Como detectamos que los niveles de la proteína disminuían en los *pools* con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>, quisimos verificarlo también sobre sujetos individuales de la población elegidos al azar. Para ello 5µg de proteína fueron separados en los geles monodimensionales (7.5%) e incubados posteriormente con el anticuerpo. Como se observa en la figura R\_36 el Fibrinógeno, en todas sus variantes, disminuyó en todos los sujetos tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> al compararse con la dieta sin suplementar.

Como se puede observar, las diferencias son mucho mayores en las muestras originales que en las procesadas con el Kit ProteoMiner, lo cual es de esperar, ya que este Kit, al normalizar el rango dinámico de concentración de proteínas, está reduciendo las diferencias existentes y por lo tanto los cambios observados sobre proteínas tan abundantes como el fibrinógeno pueden perderse en parte. Por otro lado, tenemos que tener cautela con los resultados obtenidos sobre esta proteína tras el pretratamiento de las muestras con ProteoPrep, ya que este Kit la elimina. El que encontremos restos en los geles bidimensionales puede ser debido a la elevada concentración de la misma. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los resultados más fiables son los obtenidos tras cuantificar la proteína con un anticuerpo específico en sujetos individuales. Como



se observa en la figura R\_36, la disminución obtenida tras la ingesta de la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> es un resultado concluyente .

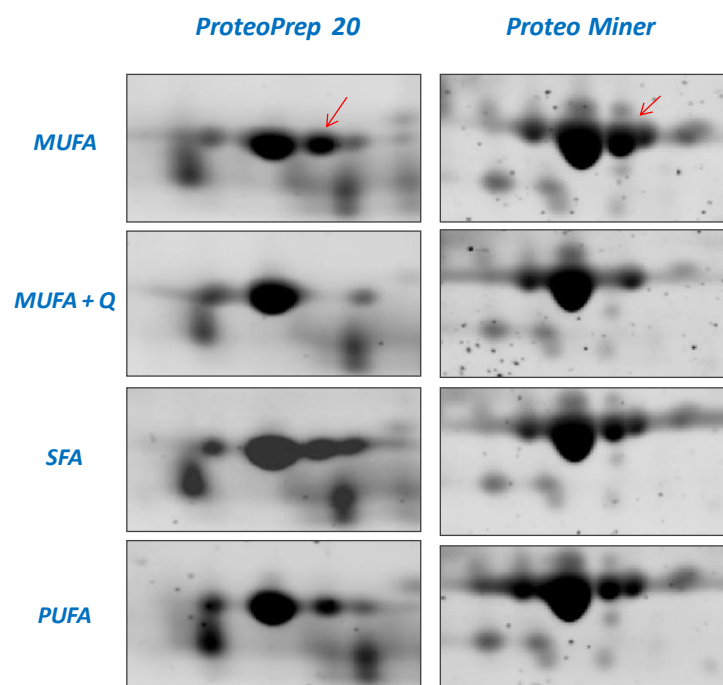


**Figura R\_36.** Cuantificación de Fibrinógeno sobre sujetos individuales elegidos al azar que tomaron en dos momentos diferentes una dieta rica en MUFA n-9 y la misma dieta pero suplementada con CoQ<sub>10</sub>. De arriba abajo se observan: una imagen del gel monodimensional teñido con Rojo Ponceau; imagen del blot incubado con el anticuerpo; y finalmente el gráfico obtenido tras la cuantificación de sus bandas con el software Quantity One (Bio-Rad).

La **Apolipoproteína A-IV** se distribuye en geles bidimensionales a lo largo de varias isoformas que difieren entre sí en su carga (más ácidas a más básicas), de manera que se separan alcanzando diferentes puntos isoeléctricos. Tras el análisis de los geles 2-D obtenidos con las muestras pre-tratadas con el Kit ProteoPrep20 (no elimina esta proteína), detectamos un incremento significativo de la isoforma más abundante tras el consumo de la dieta MUFA n-9 + CoQ<sub>10</sub>, SFA y PUFA n-3 al compararse con la dieta MUFA n-9 y la disminución significativa de dos isoformas más básicas y menos abundantes tras el consumo de MUFA + CoQ<sub>10</sub> y PUFA n-3, no encontrando cambios significativos para esta isoforma en la dieta SFA (figura R\_37). Por otro lado, tras estudiar los geles 2-D obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras con el Kit Proteo Miner™ observamos unos cambios similares (figura R\_37). Las isoformas más básicas y menos abundantes disminuyeron con la dieta MUFA n-9 + CoQ<sub>10</sub> y PUFA n-3 e incrementaron con la dieta SFA, aunque en ninguno de los casos de manera significativa, al ser comparadas con una dieta MUFA n-9. Por otro lado, encontramos



que la isoforma más ácida de la proteína incrementaba de manera significativa con la dieta PUFA  $n-9$  al ser comparada con la dieta SFA, no encontrando cambios significativos cuando era comparada con las otras dos dietas (MUFA  $n-9$  y MUFA  $n-9$  + CoQ<sub>10</sub>). En este caso, la isoforma más abundante de todas no mostró cambios estadísticamente significativos en cada una de las tres dietas con la dieta MUFA  $n-9$ . Este cambio de expresión de algunas isoformas con respecto a otras puede interpretarse como modificaciones postraduccionales que está sufriendo la proteína tras el consumo de las diferentes dietas. Esto puede dar lugar a que no encontremos un cambio significativo en cuanto a la cantidad total de proteína al comparar su expresión entre las dietas experimentales, pero sí en cuanto a la distribución de sus isoformas.

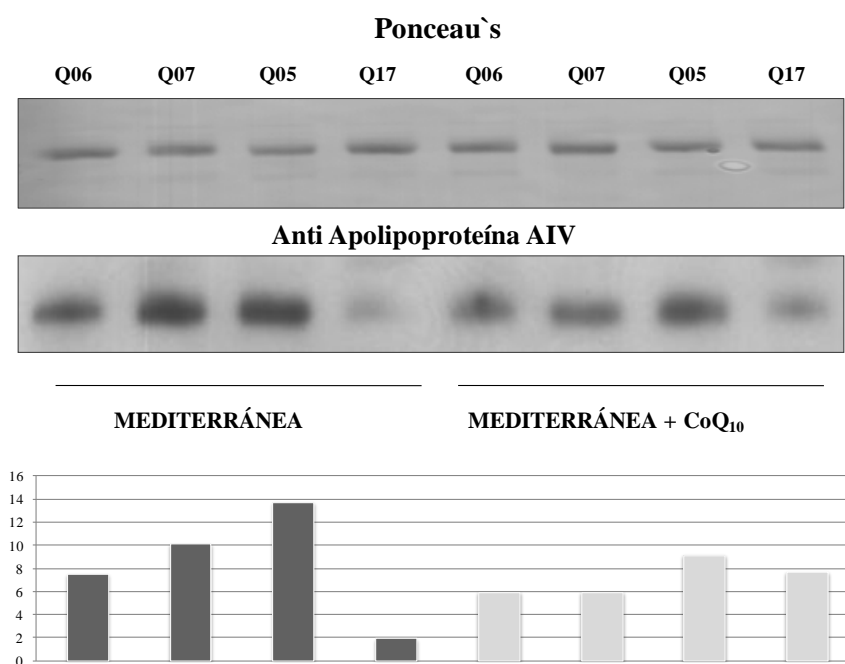


**Figura R\_37.** Imagen representativa de parte de los geles bidimensionales donde encontramos la Apolipoproteína A-IV. Se observan proporciones de geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras de plasma con ambos métodos de procesamiento (ProteoPrep20 y ProteoMiner<sup>TM</sup>). En los geles 2-D se aprecia claramente como la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> disminuye una de las isoformas más básicas de la proteína con respecto a las demás dietas.

Para validar este resultado acerca de la disminución de Apolipoproteína A-IV tras el suplemento de la dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub>, decidimos cuantificar los niveles de la proteína mediante inmunodetección en sujetos elegidos al azar que tomaron esta dieta y la dieta sin suplementar. Para ello, 5  $\mu$ g de proteína fueron separados en los geles monodimensionales al 10% de poliacrilamida e incubados posteriormente con el anticuerpo. Como se observa en la figura R\_38, la Apolipoproteína A-IV (46 KDa)

disminuyó en tres sujetos y aumentó en uno tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> al compararse con la dieta sin suplementar.

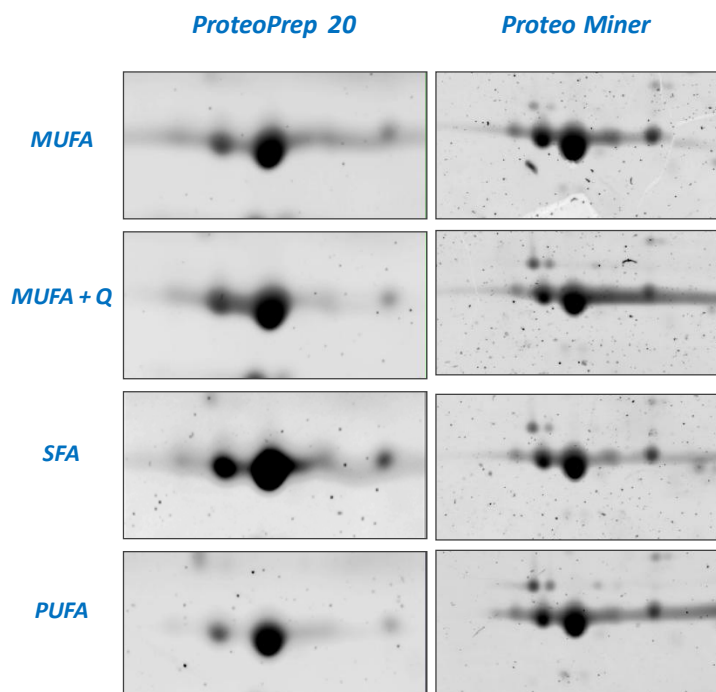
Todos estos resultados nos pueden estar indicando que a nivel de proteína total, no hay una respuesta clara del efecto que tienen sobre su expresión las diferentes dietas, pero sí a nivel de modificaciones posttraduccionales, las cuales incrementan más acentuadamente tras la ingesta de una dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub>.



**Figura R\_38.** Cuantificación de Apolipoproteína A-IV sobre sujetos individuales elegidos al azar que tomaron en dos momentos diferentes una dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub> y la misma dieta pero suplementada con CoQ<sub>10</sub>. De arriba abajo se observa una imagen del gel monodimensional (7.5%) teñido con Rojo Ponceau e incubado con el anticuerpo y el gráfico obtenido tras la cuantificación de sus bandas (46 KDa) con el software Quantity One (Bio-Rad).

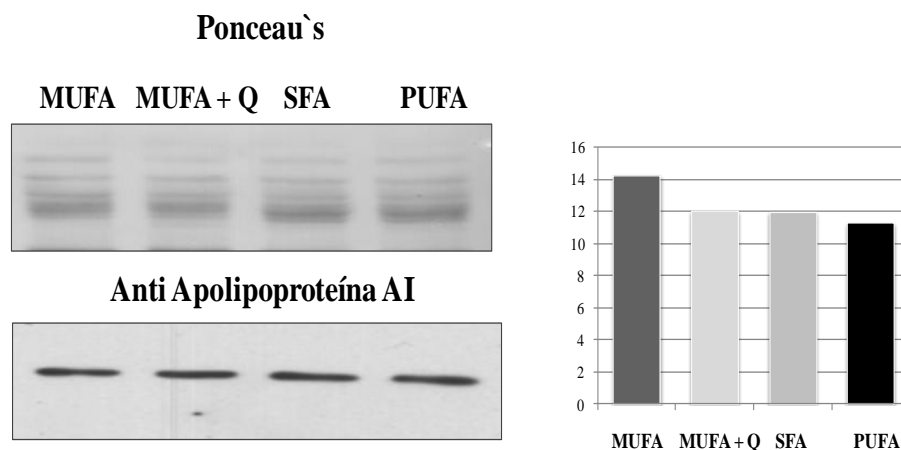
Cuando estudiamos la **Apolipoproteína A-I** observamos que, igual que la Apolipoproteína A-IV, esta proteína se separa en los geles bidimensionales en varias isoformas con diferente punto isoeléctrico. Tras procesar las muestras de plasma con ProteoPrep20 (elimina esta proteína) el estudio sobre los geles 2-D nos mostró un incremento significativo de la isoforma más abundante tras la ingesta de la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> al ser comparada con una dieta sin suplementar y una disminución, también significativa, de la totalidad de sus isoformas (desde la más

ácida hasta la más básica) tras la ingesta de una dieta PUFA<sub>n-3</sub> al ser comparada con una dieta MUFA<sub>n-9</sub> (figura R\_39). Tras el pre-tratamiento de las muestras con el Kit Proteo Miner<sup>TM</sup> y la elaboración de los geles bidimensionales, el análisis de imagen no mostró ningún cambio estadísticamente significativo sobre ninguna de las isoformas de la proteína tras la ingesta de las diferentes dietas experimentales (figura R\_39).



**Figura R\_39.** Imagen representativa de parte de los geles bidimensionales donde encontramos la Apolipoproteína A-I. Se observan proporciones de geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras de plasma con ambos métodos de procesamiento (ProteoPrep20 y ProteoMiner<sup>TM</sup>) tomando en todo momento como control la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. No encontramos cambios de relevancia cuando comparamos los niveles de la proteína entre las diferentes dietas con las dos técnicas experimentales.

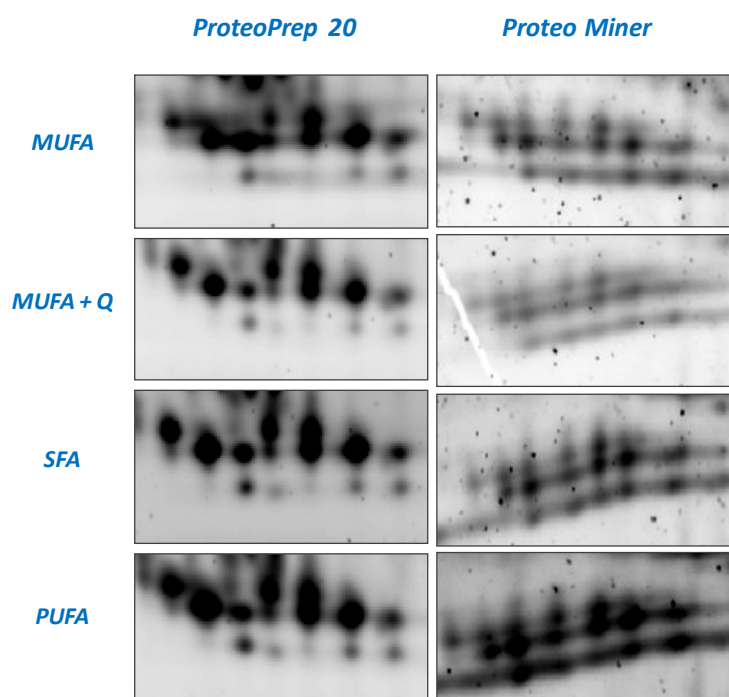
Para validar los resultados obtenidos sobre los geles 2-D, cuantificamos los niveles de la proteína mediante inmunotinción sobre muestras de plasma representativas de las cuatro dietas experimentales. Para ello, 5 µg de proteína fueron separados en los geles monodimensionales al 10% de poliacrilamida. Como se observa en la figura R\_40, tras la separación de las muestras y la cuantificación de las bandas resultantes (25 KDa), no obtuvimos cambios significativos entre las diferentes condiciones experimentales.



**Figura R\_40.** Cuantificación de Apolipoproteína A-I sobre *pools* representativos de las cuatro dietas experimentales. A la derecha de la imagen se observa el gel monodimensional (10%) teñido con Rojo Ponceau (arriba) e incubado con el anticuerpo (abajo). A la izquierda de la imagen se observa el gráfico obtenido tras la cuantificación de la proteína de 25 KDa con el software Quantity One.

Por otro lado, hemos estudiado más a fondo los niveles de **Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuin-A)**. Al igual que en los casos anteriores, esta proteína se distribuye en los geles bidimensionales en varias isoformas que se diferencian en masa y carga, de manera que encontramos proteínas muy ácidas, proteínas menos ácidas y proteínas más básicas. Como se observa en la figura R\_41, tras el estudio de los geles 2-D elaborados con muestras de plasma procesadas con PorteoPrep20, identificamos siete isoformas de la misma proteína que mostraban cambios tras la ingesta de las diferentes dietas. Así, cuatro isoformas (dos muy ácidas y otras dos menos ácidas) incrementaron de manera significativa (entre 2 y 7 veces dependiendo de la isoforma) con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> y SFA y no mostraron cambios significativos tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> al compararse las tres con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Las otras tres isoformas más básicas disminuyeron de forma significativa hasta la mitad tras la suplementación de la dieta con CoQ<sub>10</sub> y una de ellas incrementó significativamente con SFA. No encontramos cambios significativos de las otras isoformas en la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub> pero la tendencia que seguían era el incremento con respecto a una dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Si tomamos como dieta control la dieta SFA observamos que dos isoformas (las más básicas) disminuyen significativamente en la dieta PUFA<sub>n-3</sub> y que una de ellas (la más básica de las dos), disminuye de forma significativa en la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>. Cuando estudiamos los geles bidimensionales obtenidos tras Proteo Miner<sup>TM</sup> también detectamos cambios a nivel de esta proteína. En este caso identificamos cuatro

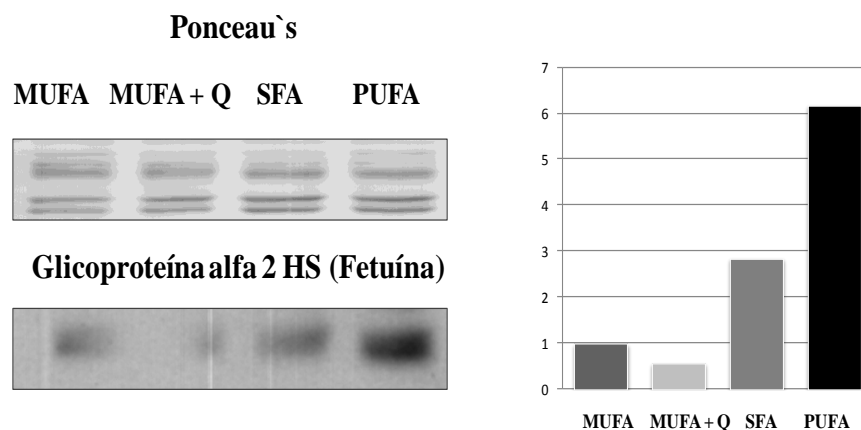
isoformas para la misma proteína, entre las cuales, dos de ellas incrementaban significativamente con la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub> y no variaban tras la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> al ser comparadas las tres con la dieta sin suplementar. Cuando estudiamos cómo se afectaban los niveles de la proteína utilizando como dieta control la dieta SFA, observamos que otra isoforma diferente a las anteriores (la más básica de las identificadas) incrementa su expresión significativamente tras la dieta PUFA<sub>n-3</sub>, no mostrando cambios significativos en la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> (figura R\_41).



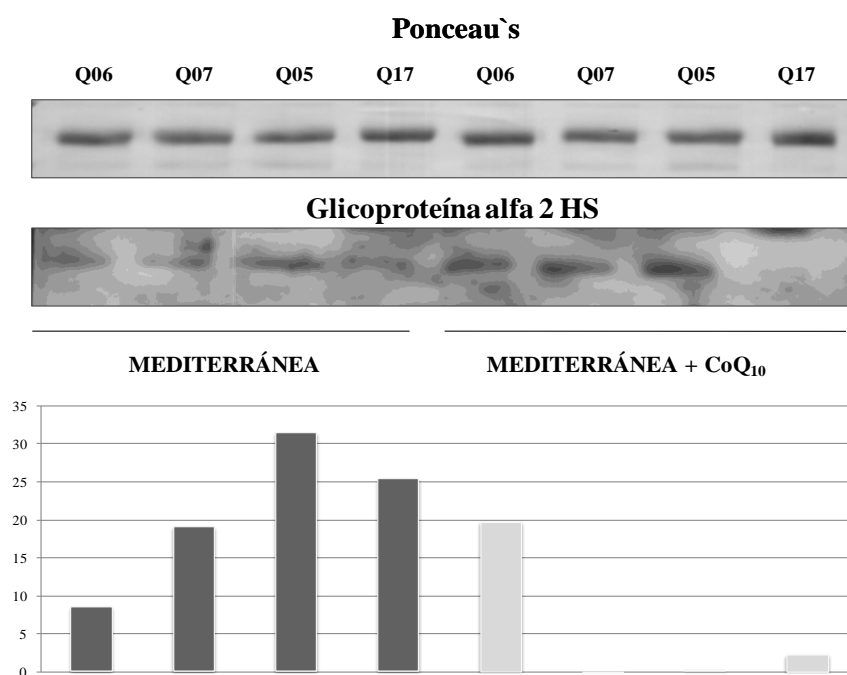
**Figura R\_41.** Imagen representativa de parte de los geles bidimensionales donde encontramos la Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína). Se observan proporciones de geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras de plasma con ambos métodos de procesamiento (ProteoPrep20 y ProteoMiner<sup>TM</sup>) tomando en todo momento como control la dieta MUFA<sub>n-9</sub>.

Para validar los resultados obtenidos en los estudios proteómicos, cuantificamos la proteína sobre las muestras de plasma utilizando para ello un anticuerpo específico. En primer lugar, cuantificamos los niveles de la proteína sobre muestras representativas de las cuatro dietas (muestras pretratadas con Proteo Miner<sup>TM</sup>). Para ello separamos 7 µg de proteína en geles al 7.5% de poliacrilamida que posteriormente fueron incubados con el anticuerpo. Como se observa en la figura R\_42, tras la cuantificación de las bandas (59 KDa) tomando como control la dieta MUFA<sub>n-9</sub>) observamos que la proteína sufría una disminución tras la ingesta de una dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> y por el

contrario, un incremento tras la ingesta de la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub>, siendo el cambio más acusado con esta última. Estos resultados validaban los cambios observados sobre los geles bidimensionales.



**Figura R\_42.** Cuantificación de 2 HS Glicoproteína (Fetuina) sobre *pools* representativos de las cuatro dietas experimentales pretetadas con Proteo Miner<sup>TM</sup>. A la derecha de la imagen se observa el gel monodimensional (7.5%) teñido con Rojo Ponceau (arriba) e incubado con el anticuerpo (abajo). A la izquierda de la imagen se observa el gráfico obtenido tras la cuantificación de la proteína (59 KDa) con el software Quantity One (Bio-Rad).



**Figura R\_43.** Cuantificación de Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuina) sobre sujetos individuales elegidos al azar que tomaron en dos momentos diferentes una dieta rica en MUFA<sub>n-9</sub> y la misma dieta pero suplementada con CoQ<sub>10</sub>. De arriba abajo se observa: una imagen del gel monodimensional teñido con Rojo Ponceau, el resultado de la inmunotinción con el anticuerpo, y el gráfico obtenido tras la cuantificación de las bandas (59 KDa) con el software Quantity One (Bio-Rad).

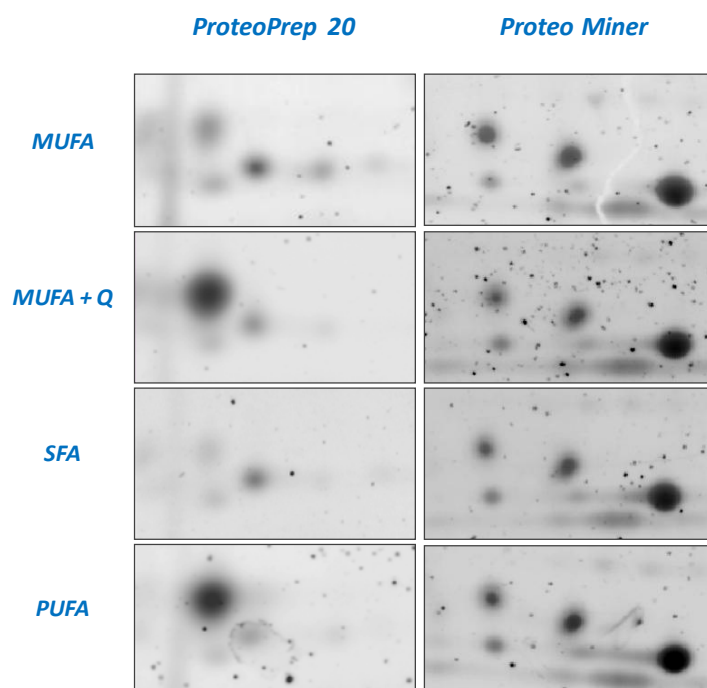
Para comprobar que el suplemento de una dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub> hacía disminuir los niveles de esta proteína en plasma, realizamos un estudio sobre sujetos escogidos al azar que habían tomado en dos momentos diferentes una dieta MUFA<sub>n-9</sub> y otra MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con el antioxidante. Como se observa en la figura R\_43, tras la cuantificación de las bandas observamos que en uno de los sujetos incrementaba la proteína con la dieta suplementada, pero en otros 3 disminuía con la misma dieta.

Con el estudio proteómico llevado a cabo también detectamos cambios en la **Apolipoproteína E**. Tras el análisis de los geles 2-D obtenidos tras ProteoPrep20, observamos que sólo una de sus isoformas, que además se encontraba en muy poca cantidad con respecto a las demás, varió entre las dietas. Esta isoforma disminuyó significativamente con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> y PUFA<sub>n-3</sub> tras ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. No encontramos cambios significativos de esta isoforma tras la ingesta de la dieta SFA al ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Cuando tomamos como dieta control la dieta SFA observamos que esta isoforma disminuía significativamente tras la dieta PUFA<sub>n-3</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> y por el contrario aumentaba tras la dieta MUFA<sub>n-9</sub> (figura R\_44). Por otro lado, el estudio sobre los geles 2-D obtenidos a partir de muestras pre-tratadas con Proteo Miner<sup>TM</sup> nos mostró cambios en tres isoformas que poseían diferente punto isoelectrónico y que eran poco abundantes con respecto a las demás isoformas pertenecientes a la proteína. De estas tres isoformas, la más ácida incrementaba significativamente tras la ingesta de la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub>, pero no mostraba cambios significativos tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con el antioxidante (aunque tendía a incrementar) al ser comparadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. De las otras dos isoformas identificadas, una de ellas disminuyó significativamente con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> y la otra con la dieta SFA. Los demás cambios no fueron significativos (figura R\_44).

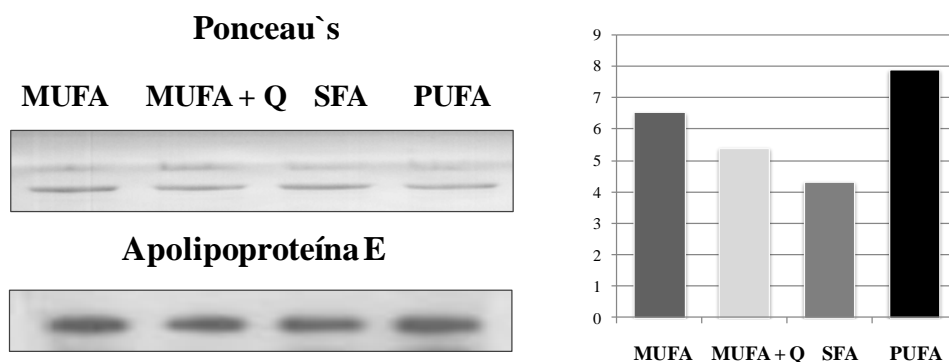
Esos resultados contradictorios pueden deberse a que los cambios observados en los geles bidimensionales sobre la proteína afectaban a las isoformas menos abundantes y la cuantificación tras el marcaje se refiere a la totalidad de la proteína presente en el plasma, por lo que no debemos de esperar los mismos resultados.

Debido a la discrepancia en los resultados obtenidos con las dos técnicas utilizadas, cuantificamos los niveles de la proteína mediante Western Blot. En este caso

4  $\mu\text{g}$  de proteína fueron separados en geles 7.5% de poliacrilamida, que posteriormente fueron incubados con un anticuerpo específico. Como se observa en la figura R\_45, la proteína (37 KDa) incrementó en todas las dietas al ser comparadas de forma independiente con la dieta MUFA  $n-9$ , lo cual coincidía con los resultados obtenidos en el estudio de los geles bidimensionales elaborados a partir de las muestras procesadas con el Kit Proteo Miner <sup>TM</sup>. Los niveles más elevados de la proteína correspondieron a los encontrados tras la ingesta de una dieta rica en PUFA  $n-3$  y los más bajos tras la ingesta de la dieta MUFA  $n-9$ .



**Figura R\_44.** Imagen representativa de parte de los geles bidimensionales donde encontramos Apolipoproteína E. Se observan porciones de geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras de plasma con ambos métodos de procesamiento (ProteoPrep20 y ProteoMiner<sup>TM</sup>).



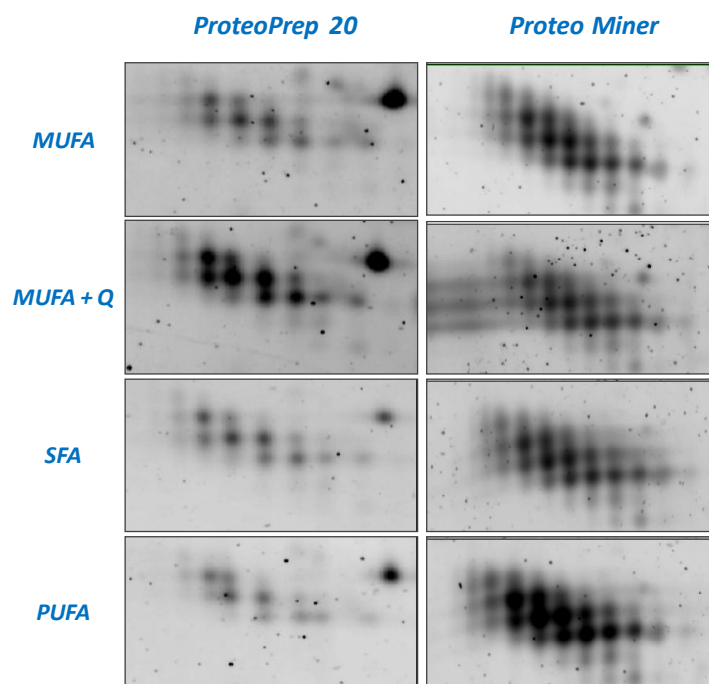
**Figura R\_45.** Cuantificación de Apolipoproteína E sobre *pools* representativos de las cuatro dietas experimentales. A la derecha de la imagen se observan el gel monodimensional (7.5%) teñido con Rojo Ponceau (arriba) y el resultado de la inmunotinción con el anticuerpo (abajo). A la izquierda de la imagen



se observa el gráfico obtenido tras la cuantificación de la proteína (37KDa) con el software Quantity One (Bio-Rad).

Por último, entre las proteínas que vieron alterados sus niveles tras la ingesta de dietas con diferente contenido graso y suplementos con CoQ<sub>10</sub> encontramos la **Apolipoproteína J o Clusterina**. Esta proteína, se separa en los geles bidimensionales en multitud de isoformas con diferentes puntos isoeléctricos y masas moleculares. Tras el estudio de los geles de las muestras tratadas con ProteoPrep20, se identificaron ocho isoformas de la proteína que presentaban cambios entre las dietas. Entre estas, seis isoformas incrementaron significativamente con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, una de ellas incrementó significativamente con la dieta SFA y cuatro (en algún caso las mismas que en el primer caso) incrementaron con la dieta PUFA<sub>n-3</sub>. Las demás isoformas también incrementaron pero de manera no significativa. Si estudiamos la expresión de esta proteína entre las dietas SFA y PUFA<sub>n-3</sub>, encontramos que no hubo cambios significativos que afectaran a alguna de sus isoformas (figura R\_46).

Contrariamente a estos resultados, los datos obtenidos tras estudiar los geles procesados con Proteo Miner<sup>TM</sup> mostraron la disminución de cuatro isoformas. Entre ellas, dos lo hicieron de manera significativa tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, una lo hizo con la dieta SFA y otra distinta con la dieta PUFA<sub>n-3</sub>. Al igual que en el caso anterior, no encontramos cambios significativos entre la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub> (figura R\_46).

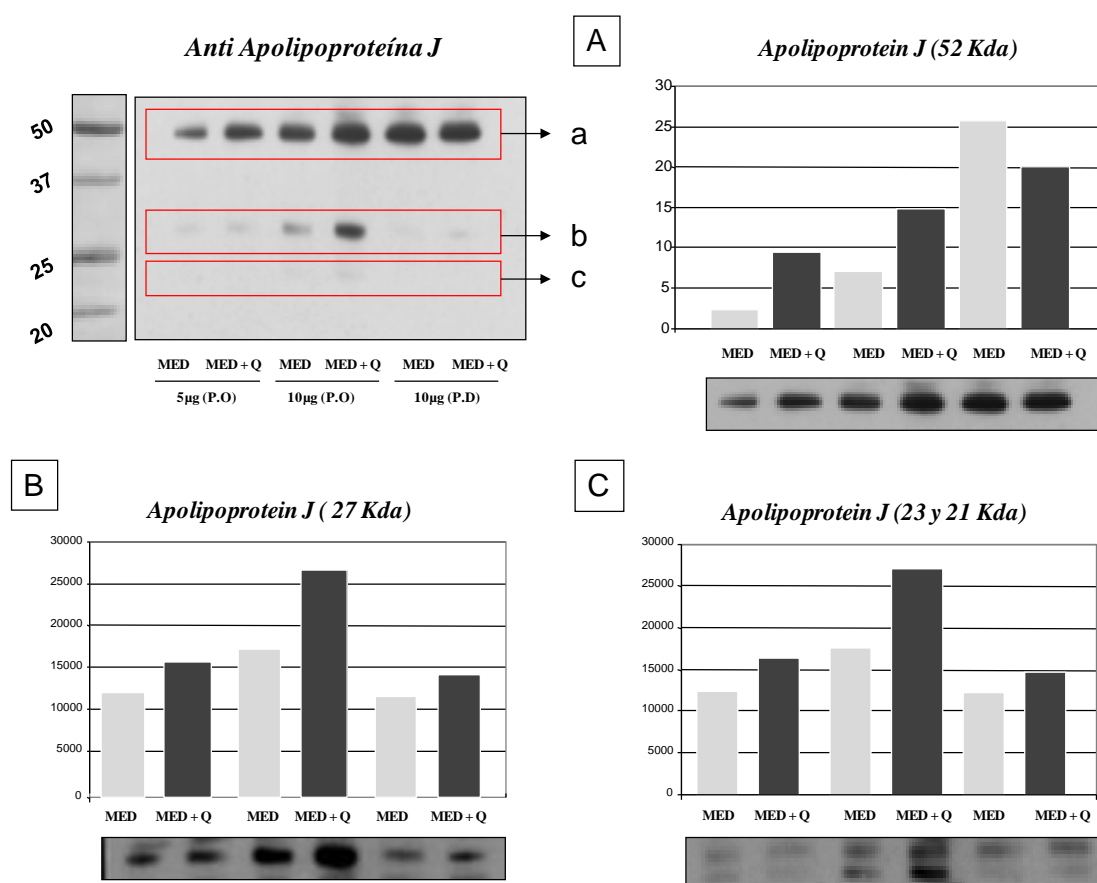


**Figura R\_46.** Imagen representativa de parte de los geles bidimensionales donde encontramos la Apolipoproteína J (Clusterina). Se observan proporciones de geles obtenidos tras el pre-tratamiento de las muestras de plasma con ambos métodos de procesamiento (ProteoPrep20 y ProteoMiner™). Con el primer método de estudio (ProteoPrep20) se observa como incrementan la mayoría de las isoformas de la proteína tras el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub>.

Tras los resultados obtenidos para esta proteína en los análisis proteómicos, concluimos que el cambio más representativo era el incremento tras la ingesta de la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Para comprobar esto, decidimos cuantificar los niveles de la proteína en muestras de plasma mediante inmunodetección. En un primer lugar, queríamos comprobar que el incremento que estábamos detectando sobre la población que tomó la dieta suplementada era real. Para ello, cuantificamos la proteína sobre muestras representativas (deplecionadas y sin deplecionar) de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>. La ApoJ no es eliminada por el Kit pero sin embargo forma complejos con Apolipoproteína A-I [359], lo cual puede estar eliminando de forma no deseada de la proteína, de ahí que realicemos esta prueba.

Tras la separación de las muestras en geles y la inmunotinción, obtuvimos varias bandas que correspondían a diferentes isoformas de la proteína [360]. La Apolipoproteína J es una glicoproteína sulfatada heterodimérica que tiene entre 70 y 80 KDa, la cual está sintetizada constitutivamente y secretada por el hígado y otros tejidos a partir de una proteína precursora de 50 KDa [361]. Esta lipoproteína de alta densidad

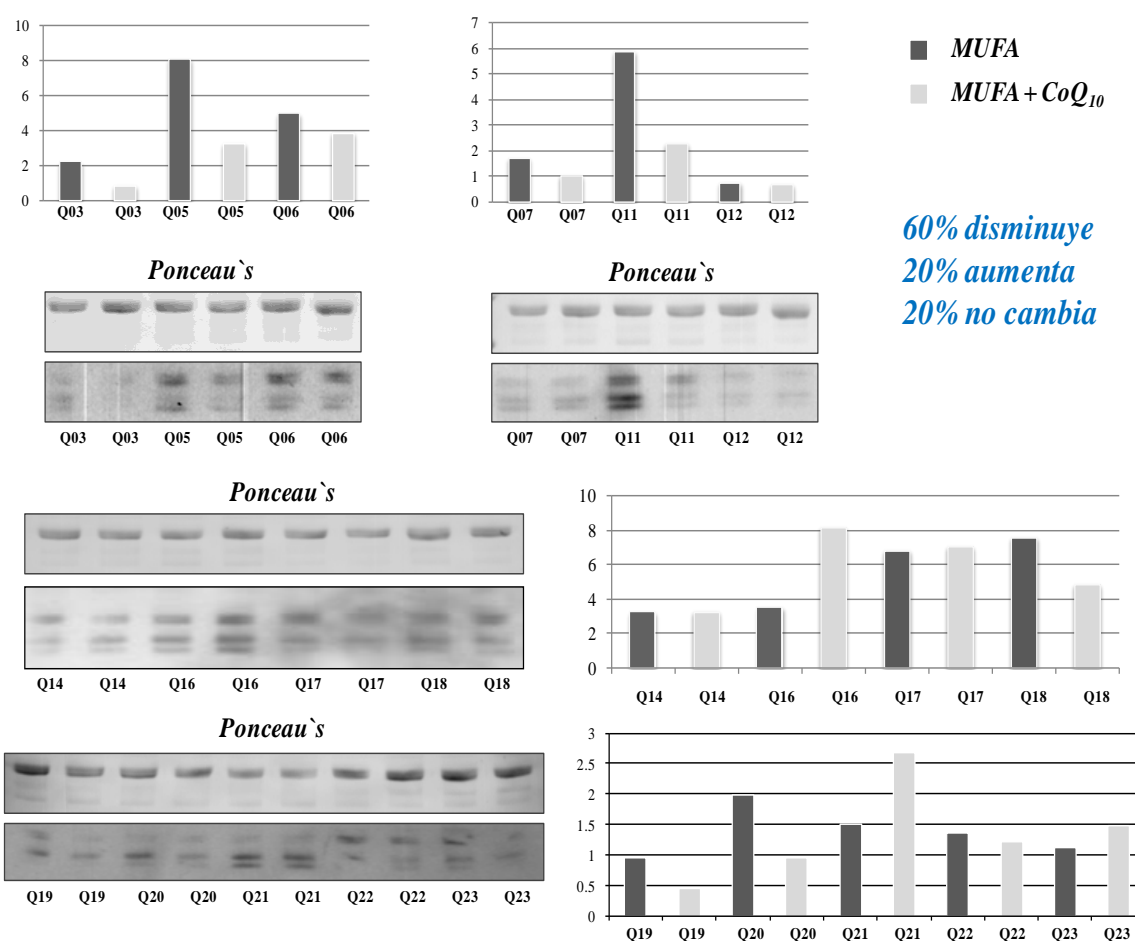
está formada por dos subunidades unidas entre sí por puentes disulfuro denominadas ApoJ $\alpha$  (34 a 36 KDa) y ApoJ $\beta$  (36-39 KDa), ambas glicoproteínas. Cuando están desglicosiladas la masa molecular de ApoJ $\alpha$  es de 24 KDa y la de ApoJ $\beta$  de 28 KDa [360], de ahí la heterogeneidad entre las diferentes isoformas de la proteína que encontramos en nuestros geles. Según esto, podemos decir que las isoformas que observamos en nuestros geles, son subunidades resultantes de la rotura proteolítica y posterior desglicosilación de la proteína precursora de 50 KDa sintetizada por el hígado. Aún sólo habiendo visto cambios en las isoformas más pequeñas sobre los geles bidimensionales, todas las bandas fueron cuantificadas. Como se puede observar en las figuras R\_47, A-D, todas las isoformas mostraron un incremento tras la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> al ser comparadas con la dieta sin suplementar en las muestras originales.



**Figura R\_47.** Gel al 10% de poliacrilamida donde se observan las diferentes bandas de la Apolipoproteína J tras su separación. Las cuatro primeras calles pertenecen a las muestras sin deplecionar (SD) (5 y 10  $\mu$ g, respectivamente) y las dos últimas a muestras deplecionadas (D) con ProteoPrep20. A continuación se presentan los gráficos obtenidos tras la cuantificación de cada una de las bandas detectadas para esta proteína, de forma que A) corresponde a los niveles de la banda de 52 KDa, B) a la de 27 KDa y C) a la de 23-21 KDa. Como se puede observar sobre las muestras sin deplecionar,

en todos los casos se incrementaron los niveles de la proteína tras la ingesta de la dieta MUFA <sub>n-9</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Se observa que tras la depleción la banda de 52 KDa disminuye y desaparecen las isoformas más pequeñas, lo cual no ocurre en la muestra de plasma sin deplecionar.

Tras estos resultados estudiamos cómo afectaba a los niveles de la proteína el suplemento de una dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub> sobre sujetos individuales. Para ello, 8 µg de proteína fueron separados en geles al 10% de poliacrilamida. Como se observa en la figura R\_48, detectamos que la población no responde de la misma manera ya que, en el 60% de los sujetos disminuyeron los niveles de la proteína, en el 20% incrementaron y en otro 20% no se presentaron cambios.

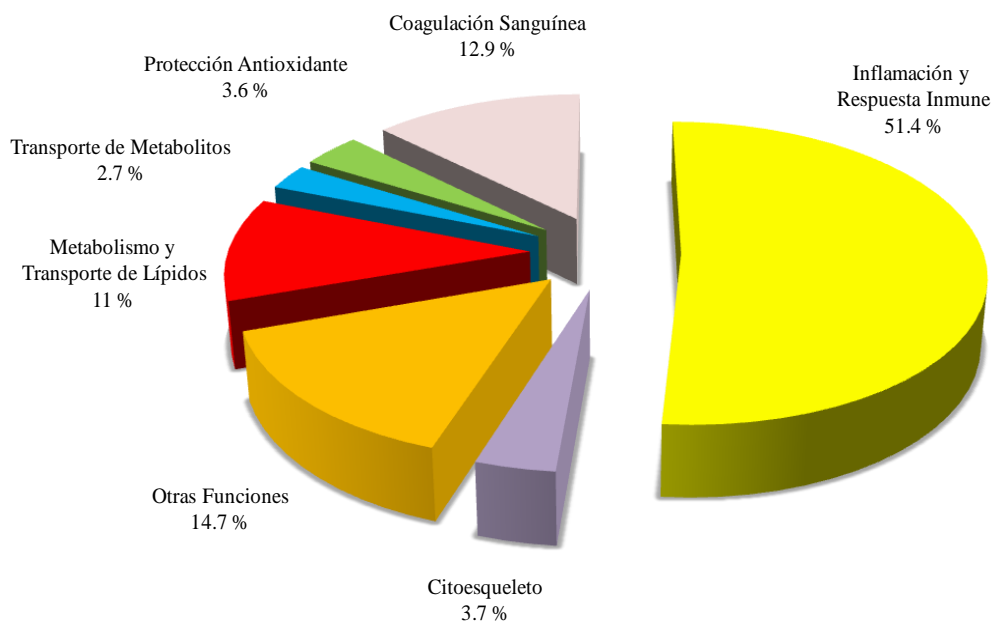


**Figura R\_48.** Cuantificación de Apolipoproteína J en cada una de los sujetos sometidos a estudio. Se muestra la cuantificación de las bandas de 23 a 21 KDa, la cuales coinciden con el tamaño de las isoformas de la proteína que mostraron cambios en los geles bidimensionales (mirar figuras de geles 2D).

## 8. CLASIFICACIÓN FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios realizados utilizando los dos métodos de procesamiento de las muestras (ProteoPrep20 y Proteo Miner<sup>TM</sup>), conseguimos identificar con éxito un total de 109 proteínas que mostraran cambios significativos. En el conjunto de las 109 proteínas identificadas, distinguimos 23 proteínas diferentes que se clasificaron según su función en 7 categorías (figura R\_49):

1. Transporte de Metabolitos: Hemopexina y Proteína de Unión a la Vitamina D
2. Protección Antioxidante y Transporte: Paraoxonasa 1 y Ceruloplasmina (Ferroxidasa) (además de Hemopexina).
3. Metabolismo Lipídico y Transporte: Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-IV, Apolipoproteína E y Apolipoproteína J (Clusterina).
4. Coagulación Sanguínea: Fibrinógeno Gamma e Inhibidor de Serín Proteasa Clase C (Antitrombina).
5. Citoesqueleto: Beta-Actina y Gelsolina.
6. Inflamación y Respuesta Inmune: Inhibidor Inter alfa H4P, Alfa 1 Antitripsina, , Alfa-2-HS Glicoproteína (Fatuina-A), Alfa-1-Antiquimiotripsina, Proteína C Reactiva, Complemento C4A, Complemento C1, Antígeno MHC Clase 1, Alfa 2 Glicoproteína Rica en Leucina, Complejo Glicoproteína-HC (Alfa-1 Microglobulina) y Alfa 1 Beta Glicoproteína, (así como Hemopexina).



**Figura R\_49.** Diagrama representativo donde se agrupan todas las proteínas identificadas y su proporción (%) en el conjunto de análisis realizados con ambos métodos de pre-tratamiento de las muestras de plasma (ProteoPrep20 y Proteo Miner™).

Las proteínas y sus funciones aparecen resumidas en las tablas R\_18-23:

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Hemopexina (Beta-1B-glycoprotein)	Glicoproteína que se une al grupo hemo y lo transporta al hígado para su degradación y recuperación de hierro, después de lo cual la hemopexina libre vuelve a la circulación.
Proteína de unión a la Vitamina (DBP)	Glicoproteína sérica abundante, la cual transporta esteroides de vitamina D y una actina monomérica.

**Tabla R\_18.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Transporte de Metabolitos``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Paraoxonasa 1	Ruta de las pentosas fosfato. Tiene función antioxidante.
Ceruloplasmina (Ferroxidasa)	Principal proteína transportadora de cobre en circulación. Además de participar en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidantes frente a varias aminos. Reactante de fase aguda

**Tabla R\_19.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Protección Antioxidante y Transporte``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Apolipoproteína A-I	Apo A-I participa en el transporte reverso del colesterol de los tejidos al hígado. Lipoproteína del complejo HDL. Cofactor de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa).
Apolipoproteína A-IV	Componente principal del complejo HDL y los quilomicrones. Podría participar en el catabolismo de quilomicrones y VLDL. Activador de la LCAT (lecitin colesterol aciltransferasa).
Apolipoproteína E	Media la unión, internalización y catabolismo de lipoproteínas. Puede servir de ligando para el receptor de LDL (APOB / E) y para el receptor específico de ApoE en los tejidos hepáticos.
Apolipoproteína J (Clusterina)	Proteína multifuncional. Se le ha relacionado con la apoptosis, inhibición de lisis celular, transporte de lípidos, etc.

**Tabla R\_20.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Metabolismo lipídico y Transporte``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Fibrinógeno Gamma ( $\alpha, \beta$ y $\gamma$ )	El fibrinógeno tiene una doble función en la coagulación: al romperse genera monómeros que polimerizan en fibrina y actúa como cofactor en la agregación plaquetaria.
Inhibidor Serín Proteasa C (Antitrombina III)	Proteína inhibidora de trombina y de serín proteasas. Regula la cascada de coagulación sanguínea. Se induce en respuesta a los procesos inflamatorios.

**Tabla R\_21.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Coagulación Sanguínea``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Beta-Actina	Las actinas son proteínas altamente conservadas implicadas en motilidad celular. Transporte de ATP.
Gelsolina	Proteína regulada por calcio y moduladora de actina que se une a estos filamentos de bloqueando los extremos.

**Tabla R\_22.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: ``Citoesqueleto``.

PROTEÍNA	FUNCIÓN
Inhibidor Inter Alfa H4P	Pertenece a una familia de inhibidores de proteasas plasmáticas de origen hepático, denominadas de forma colectiva como familia de inhibidores inter-alfa. Los niveles de este inhibidor incrementan de manera significativa bajo condiciones inflamatorias
Alfa 1 Antitripsina	Es un inhibidor de proteasa sérico (serpina). Protege a los tejidos de las proteasas presentes principalmente en las células inflamatorias, en especial la elastasa. Es un reactante de fase aguda.
Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuína)	Proteína de síntesis hepática que inhibe la osteogénesis y puede promover la calcificación arterial. Es un reactante de fase aguda.
Macroglobulina alfa 1	Proteína de fase aguda cuya función principal es la de neutralizar las enzimas proteolíticas.
Alfa 1 Antiquimiotripsina	Inhibidora de quimiotripsina. Miembro de la familia de las serpinas. Proteína de fase aguda.
Proteína C Reactiva	Reactivo de fase aguda. También desempeña un papel importante en la inmunidad innata como sistema de defensa temprano contra infecciones.
Complemento C4A	Activación del sistema del complemento.
Complemento C1	Activación del sistema del complemento.
Antígeno MHC Clase I	Fundamentales en la defensa inmunológica del organismo frente a los patógenos. La principal función de los productos génicos de la Clase-I es la presentación de péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos.
Alfa 2 Glicoproteína rica en Leucina	Proteína de fase aguda. Biomarcador inflamatorio.
Complejo Glicoproteína-HC	Inhibidor de la tripsina, plasmina y elastasa lisosomal granulocítica. Podría estar relacionada con a respuesta inmune.
Alfa 1 Beta Glicoproteína	Función desconocida en el plasma.

**Tabla R\_23.** Lista de proteínas agrupadas en la categoría: “Inflamación y Respuesta Inmune”.

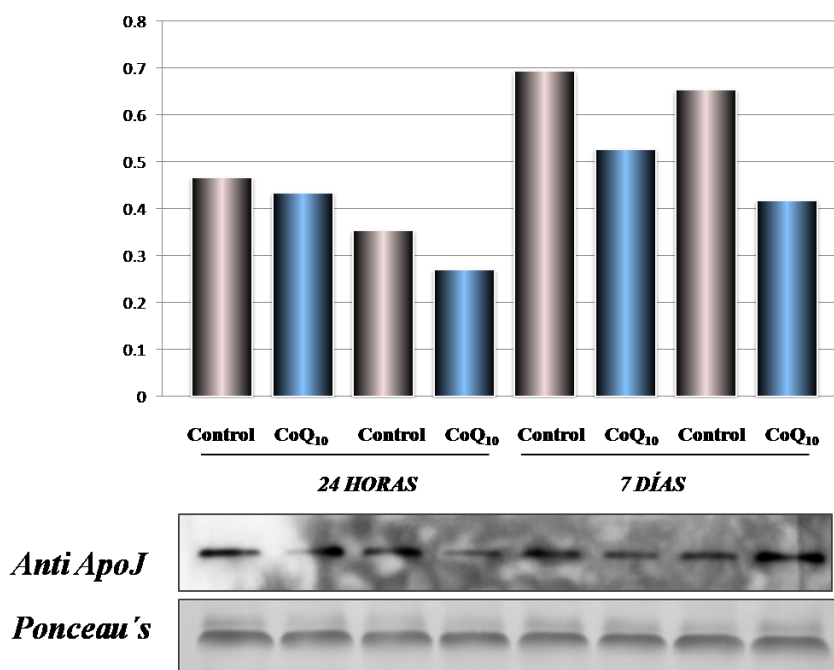


## 9. SECRECIÓN DE APOLIPOPROTEÍNA J AL MEDIO TRAS EL TRATAMIENTO CON CoQ<sub>10</sub>

Con el fin de comprobar si la disminución de los niveles de Apo J en plasma de los sujetos (60% de los mismos) que tomaron una dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> tiene lugar sobre células tratadas en cultivo con el antioxidante y por consiguiente, determinar si el CoQ<sub>10</sub> es el responsable directo de la bajada de Apolipoproteína J en plasma, o si esto es resultado de un efecto sistémico sobre el organismo, se realizaron tratamientos sobre células HepG<sub>2</sub> en cultivo. Todos los tratamientos se llevaron a cabo como se indica en el apartado 15.2 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, se trataron células durante 1 o 7 días con CoQ<sub>10</sub> 1.5µM, con el fin de estudiar cómo afectaba esta concentración del antioxidante. La cantidad de CoQ<sub>10</sub> utilizada en estos experimentos fue elegida a partir de las concentraciones reales de CoQ<sub>10</sub> (cuantificadas mediante HPLC) presentes en el plasma de los sujetos que tomaron la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> durante cuatro semanas. Tras los tratamientos realizados se recogió un volumen de 1ml de medio en cada uno de los casos. Con el fin de concentrar el contenido del medio en un volumen menor para estudiar los productos de secreción de las células, se aplicó el Kit comercial Proteo Miner<sup>TM</sup> Protein Enrichment (Bio-Rad) como se indica en el apartado 7.3 de Materiales y Métodos. A continuación, se cuantificó la cantidad de proteína que contenía la muestra mediante el Método de Bradford [358] y se cuantificaron los niveles de Apo J mediante Western Blot como se explica en el apartado 13 de Materiales y Métodos, utilizando para el ensayo 100µg de proteína. En la figura R\_50 se muestran los resultados obtenidos tras este ensayo, donde podemos ver como el tratamiento del cultivo con CoQ<sub>10</sub> 1.5 µM disminuye los niveles de la proteína secretada (polipéptido de 50 KDa de tamaño) con respecto a las células no tratadas. Tanto a las 24 horas como a los siete días, la respuesta de las células fue la misma. Esto nos lleva a concluir que las células se comportan igual que la mayoría de los sujetos (el 60%) a los que se les administró la dieta mediterránea suplementada con el antioxidante, disminuyendo la secreción de la proteína. No olvidemos que la concentración del antioxidante cuantificado en las muestras de plasma de estos individuos tras el tratamiento de la dieta suplementada fue la misma que la utilizada sobre las células en este ensayo.

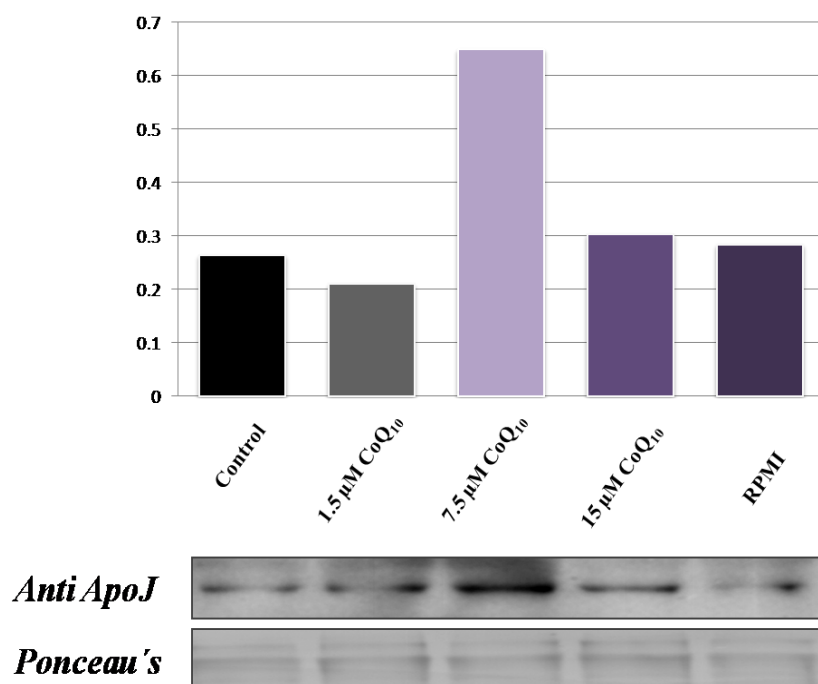
Tras estos resultados, hicimos un estudio de dosis-respuesta, para lo cual se trataron las células durante 48 horas con diferentes concentraciones de CoQ<sub>10</sub> (1.5, 7.5 y 15  $\mu$ M). Según el anterior ensayo, las células tratadas con 1.5  $\mu$ M de CoQ<sub>10</sub> debían de responder igual, disminuyendo la secreción con respecto a los controles. Como observamos en la figura R\_51, tras el tratamiento del cultivo con 1.5  $\mu$ M de CoQ<sub>10</sub>, la concentración de la proteína en el medio fue menor que la encontrada en las células sin tratar. Sin embargo, observamos un incremento a más del doble de la proteína en los cultivos tratados con 7.5  $\mu$ M de CoQ<sub>10</sub> y de nuevo disminuyó la secreción de Apo J en el caso de las células tratadas con CoQ<sub>10</sub> 15  $\mu$ M. Estos resultados nos indican que hay un efecto dosis-respuesta de las células al tratamiento, encontrando que éstas responden de manera diferente a diferentes concentraciones de CoQ<sub>10</sub> (1.5 y 7.5  $\mu$ M).



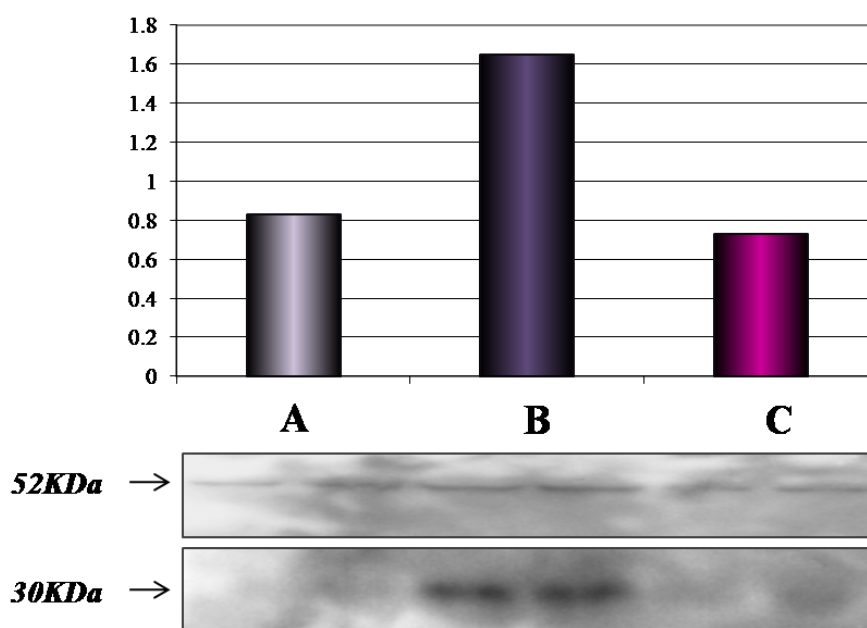
**Figura R\_50.** Cuantificación de Apolipoproteína J secretada por células tratadas con CoQ<sub>10</sub> 1.5  $\mu$ M durante 1 ó 7 días. Se observa una disminución de la proteína (banda de 50 KDa) en las células tratadas con respecto a las células sin tratar, encontrando mayores niveles a los 7 días de tratamiento.

En último lugar se llevó a cabo un experimento para estudiar si el incremento de la proteína encontrada tras el tratamiento de las células con 7.5  $\mu$ M de CoQ<sub>10</sub> se revertía en ausencia del antioxidante. Para ello, las células fueron tratadas durante un período de siete días con CoQ<sub>10</sub> 7.5  $\mu$ M, retirando el tratamiento durante las últimas 48 horas a algunos de los cultivos. De la misma manera que en los casos anteriores, se recogió 1ml

de medio, tanto de las células tratadas durante siete días sin retirada del antioxidante como de las células tratadas durante siete días seguidos de la retirada del antioxidante durante las últimas 48 horas, determinándose entonces los niveles de Apo J secretada al medio. Como se observa en la figura R\_52, se detectaron dos bandas de diferente tamaño (52 y 30 KDa), las cuales incrementaron tras el tratamiento de las células con CoQ 7.5  $\mu$ m durante 7 días y disminuyeron tras la retirada del tratamiento las últimas 48 horas. La banda de 50 KDa coincide con el tamaño de la proteína precursora [360] observada en los ensayos realizados anteriormente sobre células HepG2 y humanos, mientras que la banda de 30 KDa es el tamaño que alcanza la proteína cuando se separa en geles bidimensionales (SWISS-2D PAGE) y que pueden ser producto de modificaciones posttraduccionales. Cabe destacar que, tras la retirada del tratamiento con CoQ<sub>10</sub> las isoformas de 30 KDa desaparecen completamente, lo cual es objeto de futuras investigaciones.



**Gráfico R\_51.** Estudios de dosis-respuesta. Se cuantificó la secreción de Apolipoproteína J al medio tras el tratamiento con diferentes concentraciones de CoQ<sub>10</sub> (1.5, 7.5 y 15  $\mu$ M). Se observa que cuando las células son tratadas con CoQ<sub>10</sub> 7.5  $\mu$ M la secreción de Apo J incrementa por encima de las demás concentraciones utilizadas.



**Figura R\_52.** Efecto de la retirada del medio enriquecido con  $7.5 \mu\text{M}$  de  $\text{CoQ}_{10}$  tras un período de cinco días de pretratamiento. Arriba se observan los tratamientos realizados a la población de células, donde A) es el control de las células sin suplementar con  $\text{CoQ}_{10}$ , B) población de células tratadas durante siete días con el antioxidante y C) la población de células tratadas cinco días con el antioxidante, seguido de su retirada las últimas 48 horas del experimento. Abajo se muestra la cuantificación de la banda de 34 KDa obtenida tras la inmunotinción. Se observa un claro incremento de la secreción de la proteína al medio tras el tratamiento (B) y el cese de secreción tras la retirada (C).

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A continuación se discuten los cambios en todas proteínas, puestos de manifiesto en los estudios desarrollados con humanos, o con células de origen humano.

### 1. *Transporte de Metabolitos: Hemopexina y Proteína de Unión a la Vitamina*

#### *Hemopexina*

Encontramos la disminución en una de las isoformas de la hemopexina tras el consumo de la dieta PUFA  $n-3$  cuando era comparada con una dieta SFA, no encontrando cambios significativos de la proteína entre las demás dietas. Como se explicó anteriormente en la discusión de las proteínas plasmáticas de rata, la hemopexina es una proteína que se une a los grupos hemo en sangre y los transporta hasta el hígado donde son degradados. Esta unión evita la oxidación de los grupos hemo libres y en consecuencia, la activación de las moléculas de adhesión y otros factores inflamatorios que se ocasionan tanto a nivel de las células endoteliales como sobre lipoproteínas como las LDL, muy susceptibles de ser oxidadas [296]. El hecho de que encontremos un aumento en una de las isoformas de la proteína tras la ingesta de la dieta SFA al compararse esta con la dieta PUFA  $n-3$  podría suponer un mecanismo de protección contra un estado pro-inflamatorio en los sujetos que consumieron este tipo de dieta, más que un mecanismo de protección frente a un estado prooxidante, típico de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Aún así, estos cambios sólo afectaron a una de las isoformas de la proteína, al contrario de lo que ocurría en ratas, donde se veían modificadas casi la totalidad de ellas tras la ingesta de las diferentes dietas (mirar apartado correspondiente en la discusión de ratas).

#### *Proteína de Unión a la Vitamina D*

La proteína de Unión a la Vitamina D (VDBP) se separa en varias isoformas que muestran diferentes niveles tras la ingesta de las diferentes dietas experimentales. Encontramos que tras el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> se modificaban dos de sus

isoformas, de manera que incrementaba la isoforma más ácida y disminuía la más básica. La dieta saturada no modificaba sus niveles al ser comparada con la dieta monoinsaturada y con la dieta poliinsaturada incrementó una de las isoformas de la proteína. Como se explicó anteriormente (discusión de proteínas plasmáticas de rata) esta proteína está asociada con el control de calcio y el metabolismo del hueso [301]. Una de las funciones más reconocidas es el transporte de vitamina D, aunque sólo una pequeña parte de la proteína total del plasma se une a ella [362]. También son importantes las uniones de la proteína a la actina monomérica propiciando su eliminación y evitando la polimerización de esta en el plasma, disminuyendo con ello la viscosidad sanguínea [300]. Por otro lado, se ha relacionado a la VDBP con el sistema inmune, ya que puede unirse al factor del Complemento C5, potenciando la actividad quimiotáctica en monocitos y neutrófilos fundamentalmente [363].

Los cambios obtenidos tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> y la dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados nos indican que estos están regulando de algún modo la expresión de la proteína, influyendo sobre el estado inflamatorio (propiedad inherente de estos últimos), la actividad hemostática o sobre el metabolismo del hueso. Si recordamos, los resultados obtenidos en ratas son similares a los obtenidos en humanos, ya que la proteína de unión a la vitamina D incrementa, en ratas jóvenes y viejas, tras la ingesta de la dieta PUFA<sub>n-6</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Esto nos indica que el antioxidante está implicado en la regulación de esta proteína con independencia de la especie, en este caso.

## ***2. Protección Antioxidante y Transporte: Paraoxonasa 1 y Ceruloplasmina (Ferroxidasa) (además de Hemopexina)***

### ***Paraoxonasa 1 (PON1)***

En nuestro estudio encontramos que los niveles de alguna de las isoformas de esta proteína eran inferiores en aquellos sujetos que tomaban la dieta rica en grasas saturadas al compararse con las otras tres dietas experimentales (MUFA<sub>n-9</sub>, MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> y PUFA<sub>n-3</sub>). A su vez se vió incrementada con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al compararse esta con la dieta SFA. La paraoxonasa 1 (PON1) está presente en las HDL

confiriéndoles parte de sus propiedades antioxidantes, por lo que una disminución conllevaría a un incremento de la susceptibilidad de la molécula a la oxidación [364]. Por otro lado, se ha relacionado a esta proteína con la prevención de la aterotrombosis [365]; de hecho, niveles bajos de esta proteína se utilizan como un marcador pre-aterosclerótico [366]. En un estudio realizado sobre una población de sujetos que habían sufrido infarto de miocardio y que poseían diversos factores de riesgo cardiovascular, se encontraron niveles reducidos de esta proteína en suero [367]. Por otro lado, se ha relacionado la actividad reducida de la paraoxonasa con estados de resistencia a la insulina e incremento de la peroxidación lipídica en pacientes con hipertiroidismo [368]. En este sentido, la reducción de la actividad PON1 podría resultar en un incremento del estrés oxidativo y/o un incremento de la resistencia a la insulina con los consecuentes cambios sobre las HDL (incremento de la susceptibilidad a la oxidación).

La disminución de la proteína tras la ingesta de dietas ricas en ácidos grasos saturados podría indicarnos una falta de actividad antioxidante sobre las lipoproteínas y su consecuente implicación sobre la formación de la placa de ateroma a edades avanzadas. En este sentido, encontrar niveles más elevados de esta proteína en sangre tras la ingesta de las dietas MUFA<sub>n-9</sub>, MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> y PUFA<sub>n-3</sub>, es un indicio más de los beneficios que estos tipos de dietas nos aportan desde un punto de vista preventivo a sufrir enfermedades cardiovasculares.

### *Ceruloplasmina*

Encontramos la disminución de una de las isoformas de la proteína tras la ingesta de la dieta SFA al ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. La ceruloplasmina (Cp) (ferroxidasa) es la principal proteína transportadora de cobre en circulación que participa en reacciones de oxidación como las de Fe<sup>2+</sup> (sustrato biológico para esta enzima) [369, 370]. Su función fisiológica no se encuentra fehacientemente establecida, aunque se considera un reactante de fase aguda que puede ejercer multitud de funciones dependiendo de los cambios fisiológicos y patológicos que presente el organismo frente a una situación determinada [369]. Además de participar en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y frente a varias aminas [371]. A pesar de que la proteína posee actividad antioxidante, elevados niveles

se han asociado con enfermedad cardiovascular, influenciando la oxidación lipídica, anulando la actividad del óxido nítrico y promoviendo la apoptosis de células endoteliales [372]. Por otro lado, estudios bioquímicos han mostrado que la ceruloplasmina es un potente catalizador de la oxidación *in vitro* de LDL [373] potenciando así la lesión aterosclerótica.

### **3. Metabolismo Lipídico y Transporte: Apolipoproteína A-I, Apolipoproteína A-IV, Apolipoproteína E y Apolipoproteína J (Clusterina)**

#### ***Apolipoproteína A-I***

Los estudios realizados en el análisis proteómico desvelaron que la Apolipoproteína A-I incrementó con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> y disminuyó con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al compararse ambas con una dieta MUFA<sub>n-9</sub>, no encontrando cambios significativos en la dieta SFA; sin embargo, la inmunotinción no nos mostró cambios significativos entre las diferentes dietas. Como se ha comentado en anteriores ocasiones en esta tesis, la inmunotinción no refleja cambios sobre las isoformas de la proteína sino sobre la totalidad de esta. Los cambios observados en los estudios proteómicos referentes a esta proteína afectaban sólo a algunas de sus isoformas, por lo que esto puede darnos repuesta a las discrepancias encontradas tras la inmunotinción.

#### ***Apolipoproteína A-IV***

Como hemos visto, esta proteína se separa en varias isoformas que muestran diferente expresión tras la ingesta de las dietas experimentales. Observamos que el suplemento de la dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub> afecta a la proteína de manera diferente que el resto de las dietas. Así, la isoforma más básica disminuye acusadamente y la más abundante y menos básica incrementa, ambas con el suplemento de CoQ<sub>10</sub>. Este mismo patrón de expresión es el que encontramos en los sujetos tras la ingesta de la dieta PUFA<sub>n-3</sub> pero sin afectarse la isoforma básica. Por otro lado, la dieta SFA incrementó algo la isoforma más abundante y no presentó cambios la más básica. A nuestro



entender, el dato más interesante que hemos obtenido en este caso es el procesamiento diferencial que sufre la proteína tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. La Apolipoproteína A-IV juega un papel muy importante en el transporte reverso del colesterol y promueve la formación de las partículas HDL [316] mediante la activación de la enzima Lecitín Acil Colesterol Transferasa (LCAT) [318]. Este papel protector está ligado a la prevención de la formación de la placa aterosclerótica, debido quizás a la capacidad que tiene la proteína para inhibir la oxidación de las lipoproteínas [321]. Se conocen varias isoformas de la proteína, entre las que se encuentran apoA-IV-1a (T347S) y apoA-IV-2 (Q360H), resultantes de la sustitución de varios aminoácidos en su estructura. Un estudio muy reciente ha analizado el impacto que tiene la sustitución de estos aminoácidos sobre la capacidad de unión de la proteína y el mantenimiento de la homeostasis endotelial, concluyendo que la variante más común encontrada (T347S) posee mayores propiedades de unión a los lípidos y mayor eficiencia del metabolismo del colesterol, lo cual no se observa en la variante apoA-IV Q360 [374]. Estos resultados resultan interesantes si tenemos en cuenta las modificaciones en la proteína observadas tras la ingesta de las diferentes dietas, y en concreto, tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Puede ser que el antioxidante esté actuando sobre la expresión de las diferentes isoformas modificando los niveles de unas con respecto a otras, lo cual conllevaría cambios de la eficiencia de unión a los lípidos. Pensamos que esto debe ser objeto de futuras investigaciones.

### ***Apolipoproteína E***

Los resultados obtenidos sobre los niveles de esta proteína tras la ingesta de las diferentes dietas fueron contradictorios. En los geles bidimensionales observamos que disminuía una isoforma minoritaria tras el consumo de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Tras la inmunotinción, también encontramos niveles más bajos de la proteína con este tipo de dieta, por lo que concluimos que el CoQ<sub>10</sub> influye sobre el metabolismo de esta proteína. Los resultados obtenidos tras comparar las diferentes dietas no fueron claros, ya que cada uno de los métodos utilizados mostraba una tendencia. La inmunotinción nos mostró una disminución de la proteína con la dieta SFA y un incremento con la dieta PUFA<sub>n-3</sub>, lo cual no se correspondía con lo obtenido en los

geles bidimensionales. La ApoE es un polipéptido que contiene 317 aminoácidos y el gen que la codifica se localiza en el cromosoma 19. Se conocen 3 isoformas de esta proteína denominados E2, E3, y E4, de acuerdo con su posición relativa después de un enfoque isoelectroforético. Cada una de ellas, está codificada por los correspondientes alelos e2, e3 y e4. La ApoE más frecuente es la E3 que está presente en el 40-90% de la población. Como se comentó anteriormente, la apolipoproteína E, esta es una proteína polimórfica y multifuncional [375] que desempeña un papel clave en el metabolismo del colesterol y los triglicéridos, interviniendo en el catabolismo de los quilomicrones y de las partículas VLDL [322]. Al margen de su importantísimo papel en el mantenimiento de los niveles de colesterol en plasma [376], se ha visto que esta proteína también participa en la regresión del proceso aterosclerótico independientemente de su regulación sobre los niveles de colesterol [377].

Al margen de la función de la proteína a nivel endotelial, también son muy interesantes los estudios que relacionan esta proteína con enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer. Muchos autores consideran a la Apo E como un cofactor de la amiloideogénesis (formación de las fibras amiloides), proceso fundamental en el desarrollo de la enfermedad [378]. Por otro lado, su función en el cerebro se centra en el transporte y metabolismo lipídico y en los procesos de regeneración y crecimiento de las neuritas que son específicos para cada isoforma [379]; así como en el mantenimiento de los niveles de  $\alpha$ -tocoferol y de la actividad de SOD en el hipocampo [380]. El hecho de que en nuestro estudio disminuya una de las isoformas tras la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> resulta interesante, ya que esto puede estar influenciando no sólo al transporte y el metabolismo lipídico, sino al incremento de las defensas antioxidantes a diferentes niveles del organismo.

### ***Apolipoproteína J / Clusterina***

Encontramos un incremento de todas las isoformas de la proteína tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, SFA y PUFA<sub>n-3</sub> al compararse cada una de ellas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, en los análisis proteómicos obtenidos tras el procesamiento de las muestras con el Kit ProteoPrep 20 y tras la inmunotinción realizada sobre las mismas muestras. Por otro lado, cuando procesamos las muestras de plasma con el Kit

ProteoMiner, los resultados obtenidos fueron opuestos a los anteriores, observando la disminución de algunas isoformas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, SFA y PUFA<sub>n-9</sub>. Sin duda, en este caso el método más útil sería la inmunodetección con anticuerpos. Para ello, cuantificamos los niveles de la proteína mediante Western Blot en cada uno de los sujetos de la población (n=17) que habían tomado la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y la misma dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>, con el fin de elucidar si el suplemento con el antioxidante tenía algún efecto sobre los niveles de la proteína. Tras la inmunotinción observamos que la proteína disminuía en el 60% de la población objeto de estudio, que incrementaba en otro 20%, y que no se veía modificada en el 20% restante. La Apolipoproteína J o Clusterina es una glicoproteína heterodimérica unida por puentes disulfuro expresada en todos los tejidos y que se encuentra en todos los fluidos humanos [361]. Está presente en una subpoblación de las partículas HDL junto con la Paraoxonasa y la Apolipoproteína A-I [381]. Está implicada en varias funciones relacionadas con la carcinogénesis y progresión de tumores, así como con la adhesión celular, remodelación de tejidos, transporte de lípidos [382], reciclado de membrana, sistema inmune y regulación del ciclo celular, reparación de ADN [383] y apoptosis [384]. Además, la clusterina juega un papel importante como chaperona extracelular que estabiliza proteínas desacopladas por estrés [385]. Esta proteína está constituida por dos isoformas generadas por la célula con funciones diferentes: una forma nuclear (nCLU) con función pro-apoptótica y una forma secretada (sCLU) que es anti-apoptótica. Además de todo esto, la clusterina puede actuar como inhibidor del complemento [386]. La ApoJ también se ha detectado en las lesiones ateroscleróticas y su expresión aumenta con la progresión de la aterosclerosis [387]. Además, se ha comprobado que la expresión de Apo J se induce en las células del músculo liso vascular tras el daño vascular y que dicha expresión estimula la proliferación y la migración de las mismas [388, 389].

Tras suplementar el medio de cultivo de las células HepG2 con CoQ<sub>10</sub> 1.5µM obtuvimos el mismo resultado que encontramos en la mayoría de la población de sujetos estudiada, es decir, una disminución con respecto a sus controles (células sin suplementar). Por otro lado, también observamos que diferentes concentraciones de CoQ<sub>10</sub> (7.5 µM) hacen responder a las células de manera opuesta a la observada tras el suplemento con 1.5 µM. A pesar de estas observaciones, la disminución de la proteína se ha encontrado a las concentraciones "fisiológicas" alcanzadas en los sujetos estudiados. A pesar de los posibles efectos pro-oxidantes que pudieran tener

concentraciones más elevadas de la proteína, esta situación nunca llegarían a alcanzarse *in vivo*. Por otra parte, la cantidad máxima vuelve a reducir los niveles de clusterina cuando se retiran del medio celular concentraciones elevadas de CoQ<sub>10</sub> (figura R\_52).

Con ello concluimos que el CoQ<sub>10</sub> está regulando la síntesis de la proteína a nivel de hepatocito, por lo que el efecto que observamos sobre la población de sujetos se la podemos atribuir al antioxidante. Esto nos lleva a pensar que el CoQ<sub>10</sub> no sólo propicia un estado antioxidante a nivel endotelial, evitando la posible oxidación de biomoléculas, sino que además regula directamente el metabolismo lipídico de algunas lipoproteínas como la apolipoproteína J, la cual está implicada en multitud de procesos relacionados con la inflamación, apoptosis y metabolismo lipídico. El que encontremos una disminución de la proteína tras el suplemento de CoQ<sub>10</sub> en la dieta nos lleva a pensar que hay menor daño a nivel vascular.

#### ***4. Coagulación Sanguínea: Fibrinógeno Gamma e Inhibidor de Serín Proteasa Clase C (Antitrombina)***

##### ***Fibrinógeno***

En el presente estudio, algunas isoformas de la cadena gamma del fibrinógeno disminuyeron con la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Por el contrario, tras la ingesta de las dietas SFA y PUFA<sub>n-3</sub>, estas isoformas incrementaron al ser comparadas con una dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Como se indicó anteriormente al discutir los cambios sobre los niveles de esta proteína en el plasma de ratas, el fibrinógeno es una proteína que está fuerte, consistente e independientemente relacionada con el riesgo cardiovascular [326]. Se encuentra directamente implicada en la cascada de coagulación, fundamentalmente en la formación de la fibrina [390], la cual participa en la formación del trombo y por lo tanto, condiciona la viscosidad plasmática. La fibrina interviene también en los mecanismos que provocan la agregación plaquetaria [391]. Son muchos los estudios que han relacionado los niveles elevados de fibrinógeno como factor de riesgo cardiovascular [392, 393]. Resulta muy interesante el hecho de que en nuestro estudio, encontremos la disminución de algunas de las isoformas de esta proteína, concretamente las relacionadas con la cadena gamma, tras la ingesta de la dieta mediterránea

suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Un estudio reciente propone la cadena gamma del fibrinógeno como un marcador excelente de riesgo cardiovascular [394]. Por otro lado, la IL6 es el mayor regulador de la síntesis de fibrinógeno, la cual a través de mediadores como los glucocorticoides, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  modulan la síntesis de fibrinógeno durante estados de fase aguda [395]. Se sabe que las variantes genéticas de IL-6 influyen sobre la síntesis de fibrinógeno y la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares [396], por lo que el coenzima Q puede estar teniendo su efecto sobre los niveles de fibrinógeno a través de la modulación de los procesos inflamatorios. Este resultado, junto con otras evidencias científicas [38, 324] refuerzan el hecho de que el tratamiento exógeno con CoQ<sub>10</sub> puede ser beneficioso para las patologías cardiovasculares. Por otro lado, encontramos que la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub> incrementan los niveles de estas isoformas cuando son comparadas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, lo cual nos indica que el efecto encontrado radicaría más en el poder de la grasa monoinsaturada y en la actuación del CoQ<sub>10</sub> sobre el sistema hemostático.

### ***Inhibidor de Serín Proteasas Clase C (Antitrombina III)***

Esta proteína incrementa con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub> y con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al compararse con a dieta MUFA<sub>n-9</sub>. La dieta SFA disminuye sus niveles al compararse con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. La antitrombina III (AT-III) es una glucoproteína producida en el hígado, en las células endoteliales y posiblemente en los megacariocitos. Es una proteasa que actúa para inactivar las serinas proteasas en la cascada de la coagulación. Se une y neutraliza a la trombina y a los factores XIIa XIa, IXa y IIa, así como a la plasmina y a la calicreína. Como la trombina desempeña una función importante en la coagulación, su inhibición proporciona una regulación significativa de la formación del coágulo. Esta actividad de la antitrombina se acelera enormemente en presencia de heparinoides endógenos, secretados por la célula endotelial, a los que se liga la antitrombina. El complejo trombina-antitrombina, una vez formado, se libera de su ligazón con los heparinoides y es eliminado por el sistema reticuloendotelial [397, 398].

El efecto de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 en relación a los procesos de coagulación fue estudiado en un grupo de sujetos con hipertrigliceridemia que había

sufrido infarto de miocardio. Tras la ingesta de aceite de pescado rico en omega 3, los niveles de antitrombina III incrementaron [399]. Por otro lado, también son muchos los estudios que asignan un papel beneficioso del aceite de oliva a los fenómenos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, entre ellos destacan los realizados por Pérez Jiménez et al (1999) [400], que obtuvieron una disminución del Factor vW, fundamental para la formación del trombo plaquetario y de los niveles de TFPI, sustancia fundamental en la modulación del efecto del Factor Tisular (TF), el componente pretrombótico principal de la placa rota, tras sustituir la ingesta de una dieta rica en grasas saturadas por otra rica en ácidos grasos monoinsaturados. Teniendo en cuenta esto, pensamos que la disminución de los niveles de la proteína con la dieta SFA observada en nuestro estudio podría ser un indicativo de la acción de la grasa saturada sobre los estados pretrombóticos. Por otro lado, también encontramos un incremento de la proteína tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>. Este resultado, junto con el encontrado sobre los niveles de fibrinógeno en los mismos sujetos, apunta a que el antioxidante está propiciando un estado anticoagulante, y antitrombótico, modulando la actuación de factores de coagulación que operan en las últimas fases del proceso de coagulación. Un estudio reciente apunta que el resveratrol, (componente fenólico con elevado poder antioxidante), mejora la función ventricular en personas con diabetes tipo II. El resveratrol imita la acción de SIRT 1, la cual tras su activación incrementa la sensibilidad a la insulina y con ello reduce la disfunción endotelial evitando los procesos trombóticos [401].

##### **5. Citoesqueleto: *Beta-Actina* y *Gelsolina*.**

###### ***Beta Actina***

Encontramos una disminución de los niveles de  $\beta$ -Actina en los sujetos que tomaron la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> al compararse con la dieta sin suplementar. Los niveles de la proteína no se vieron alterados con las demás dietas experimentales al compararse con la dieta control. La  $\beta$ -Actina es una de las seis isoformas diferentes de Actina identificadas hasta el momento [402]. Las Actinas son proteínas altamente conservadas que están implicadas en varios tipos de motilidad

celular y son expresadas de un modo ubicuo en todas las células eucariotas [403]. Los filamentos largos de Actina pueden aumentar la viscosidad del plasma y también pueden disparar la coagulación intravascular diseminada [404]. El plasma contiene dos proteínas de gran afinidad por la Actina (VBDP y Gelsolina) que constituyen un sistema “secuestrador” de Actina y desempeñan un papel protector retirando la Actina de la circulación [405, 406]. La VBDP se une a los monómeros de Actina [300] que son liberados de los filamentos por la Gelsolina, capaz de interactuar con ellos y acortarlos [407]. Ambas proteínas, cuando están unidas a Actina, son retiradas de la circulación por el sistema reticuloendotelial mucho más rápidamente que cuando circulan libres en el plasma, lo cual produce una rápida disminución en su concentración plasmática [408]. La VBDP parece ser más eficaz en la retirada de la Actina de la circulación que la Gelsolina [405], mientras que la concentración de esta última parece ser un factor limitante en el sistema [409]. Parte de la disminución de los niveles de la proteína en sujetos que tomaron la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> puede ser el resultado de la retirada de esta por parte de la proteína de unión a la vitamina D, la cual también se ve alterada tras el suplemento de la dieta con el antioxidante. Con ello, se mejoraría la viscosidad plasmática, incrementando el flujo sanguíneo y disminuyendo así el tiempo de exposición de moléculas aterogénicas a la pared endotelial, evitando con ello el daño intravascular.

### ***Gelsolina***

Encontramos una disminución de alguna de las isoformas de la proteína en los sujetos que tomaron la dieta SFA al ser comparada con los que tomaron la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. La proteína no mostró cambios significativos tras la ingesta de las demás dietas experimentales. La gelsolina es una proteína que tiene la habilidad de unir filamentos de actina en presencia de calcio y regular la polimerización, bloqueando sus extremos y acortándolos [407]. La Gelsolina se puede unir también a la Actina en forma monomérica y los complejos Actina-Gelsolina actúan como un núcleo para la polimerización de Actina y también puede actuar como proteína “tapón” [407, 410]. Como ya se ha comentado, la Gelsolina forma parte del sistema “secuestrador”, que se encarga de retirar la Actina libre en el plasma, amortiguando el efecto potencialmente

daño de esta molécula [411]. Los mecanismos que regulan la acción de la gelsolina *in vivo* son el calcio, el cual la activa y el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), que se encuentra en las membranas celulares y secuestra a la gelsolina en estado inactivo. La regulación de actina a través del Ca<sup>2+</sup> es muy importante durante la activación plaquetaria [412]. La gelsolina citoplasmática está enormemente expresada en plaquetas, macrófagos y neutrófilos [413], así como en células musculares lisas y osteoblastos [414], siendo las células musculares la mayor fuente de gelsolina plasmática secretada [415].

Los niveles plasmáticos bajos de Gelsolina se han asociado en humanos a varias condiciones, como trauma severo y necrosis hepática [408, 416]. Por otro lado, la gelsolina está ligada a diversas patologías como la inflamación, cáncer y amiloidosis [415]. En relación al cáncer, numerosos estudios han mostrado una acción importante de esta proteína en la supresión de algunos tumores [417, 418].

Con respecto a la inflamación (considerándose esta la primera respuesta del sistema inmune a la infección), se observó en un estudio realizado sobre ratones nulos para gelsolina, que la respuesta inflamatoria temprana era muy lenta, lo que sugiere que la gelsolina podría ser una diana potencial en terapias anti-inflamatorias [419]. Por otro lado, recientes estudios realizados tanto en ratón como en humanos, han confirmado que la expresión de la gelsolina está reducida en fibroblastos sinoviales reumatoides, lo cual está unido a graves alteraciones de la organización del citoesqueleto [420]. En nuestro estudio disminuyeron dos de las isoformas de la proteína tras la ingesta de la dieta SFA al ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Esto estaría propiciando un incremento de la concentración de los monómeros de actina en el plasma y su polimerización, dando lugar a filamentos más largos y a un aumento de la viscosidad plasmática. Por otro lado, esta disminución puede actuar a otros niveles, influenciando el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas como el caso de la Artritis Reumatoide, en la que la gelsolina juega un papel crucial. Una conclusión importante de los estudios citados es que podrían darse condiciones donde es necesaria una modulación de la expresión de la gelsolina para que sus niveles sean beneficiosos. En este sentido, estimular la expresión de la gelsolina podría mejorar los síntomas asociados a la inflamación crónica y a su vez a los procesos asociados a la inflamación aguda, si consideramos esta como una defensa del organismo ante la infección. Todos estos datos sugieren la importancia que tiene la



gelsolina en circulación protegiendo durante eventos circulatorios sistémicos, apuntando nuestros resultados a que el tipo de grasa de la dieta condiciona el incremento o la disminución de esta proteína.

**6. *Inflamación y Respuesta Inmune: Inhibidor Inter alfa H4P, Alfa 1 Antitripsina, Alfa-2-HS Glicoproteína (Fetuina-A), Alfa-1-Antiquimiotripsina, Proteína C Reactiva, Complemento C4A, Complemento C1, Antígeno MHC Clase 1, Alfa 2 Glicoproteína Rica en Leucina y Complejo Glicoproteína-HC (Alfa-1 Microglobulina) (así como Hemopexina).***

#### ***Alfa 2 HS Glicoproteína (Fetuina A)***

Algunas de las isoformas de la proteína incrementa con la dieta SFA y PUFA<sub>n-3</sub> siendo menor en esta última, y otras disminuyen con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> suplementada con CoQ<sub>10</sub>, al ser comparadas cada una de ellas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. La Alfa-2-HS Glicoproteína (Glicoproteína-2-Heremans Schmid), también conocida como Fetuina-A, es una glicoproteína de 51 KDa sintetizada por los hepatocitos y secretada al plasma, donde circula como un dímero (cadenas A y B) unido covalentemente a través de puentes disulfuro [421]. Esta proteína desempeña importantes funciones biológicas, entre ellas las implicadas en la mineralización del hueso [422] y en la respuesta inmune [423]. La Fetuina A presenta sitios de fosforilación en el medio extracelular, siendo ésta necesaria para su activación, ya que versiones no fosforiladas tienen un efecto mínimo o nulo [424]. En este sentido, son muy importantes las modificaciones postraduccionales (roturas proteolíticas y fosforilaciones) de la proteína, ya que estas pueden modular sus efectos biológicos [425].

Como se ha comentado anteriormente, esta proteína modula *in vitro* la reabsorción ósea, controlando el crecimiento de los osteoblastos y actuando como un inhibidor de la calcificación [426]. Estudios realizados sobre ratones deficientes en fetuina-A han mostrado calcificación sistémica en sus tejidos [427]. Estudios realizados por Yang. F. y colaboradores demostraron que la Alfa-2-HS Glicoproteína mejora la formación del hueso elevando la actividad de la fosfatasa alcalina en el cartílago [428].

Por otro lado, esta proteína también participa en la actividad de los macrófagos,

---

---

estimulando su función fagocítica [429] y opsonizando moléculas capaces de desactivarlos [430]. Se ha observado que existe una relación inversa entre la  $\alpha$ -2-HS Glicoproteína y la Proteína C-Reactiva [421]. Estudios más recientes, la han implicado en el desarrollo de placas de ateroma calcificadas en pacientes diabéticos [431]. Incluso se ha relacionado la disminución de sus niveles plasmáticos con la calcificación vascular, la aterosclerosis y la mortalidad por eventos cardiovasculares en pacientes en diálisis peritoneal continua [432].

Por otro lado, se ha presentado como una proteína inhibidora fisiológica del receptor humano tirosina kinasa de la insulina (IR-TK) (esencial en la señalización e internalización de glucosa a los tejidos) [433], por lo que podría estar relacionada con estados de resistencia a insulina y con un incremento de padecer diabetes tipo II. En relación a esto, estudios realizados sobre una población con Síndrome Metabólico (MetS) concluyeron que, los niveles séricos totales y fosforilados de Alfa-2-HS Glicoproteína disminuían tras la administración de niacina (compuesto que induce la resistencia a la insulina), por lo que estos hallazgos sugieren que la fetuína podría atenuar la resistencia a la insulina inducida por la niacina, disminuyendo su concentración en sangre [434]. Paralelamente, un estudio realizado sobre personas de edad avanzada concluyó que los niveles más elevados de fetuína se asociaban con la incidencia de diabetes, independientemente de otros factores de resistencia a la insulina [435].

Todo esto nos lleva a pensar que, la disminución de algunas de las isoformas de la proteína tras el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub>, puede estar relacionada con distintas situaciones. Una de ellas supondría la acumulación de la proteína en el hueso con el consecuente efecto beneficioso que esto conlleva, modulando la reabsorción ósea y evitando la osteoporosis durante el envejecimiento. Esto podría estar vinculado a la variación que presentan los mismos sujetos en los niveles de VDBP, la cual está directamente relacionada con el control de calcio y metabolismo del hueso. Por otro lado, esta proteína es un reactante de fase aguda cuya concentración en el plasma varía mucho durante procesos inflamatorios. En este sentido, como ya se ha indicado, el CoQ<sub>10</sub> puede regular estos procesos. Un resultado muy interesante es la disminución de la proteína en plasma tras el suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> y la relación que tiene el incremento de ésta con estados de resistencia a insulina. A nuestro entender es un

resultado muy interesante que requiere de futuras investigaciones.

### *Alfa 1 Antitripsina*

Encontramos una redistribución sobre los geles bidimensionales de las isoformas de la proteína tras la ingesta de la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> al compararse con una dieta sin suplementar (incrementaron muchas isoformas que apenas se distinguían en la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y disminuyeron otras). Por otro lado, observamos una disminución general de la mayoría de las isoformas tras la ingesta de la dieta SFA y la dieta PUFA<sub>n-3</sub>, al compararse ambas con una dieta MUFA<sub>n-9</sub>, siendo menos acusada en la dieta PUFA<sub>n-3</sub>. La Alfa 1 Antitripsina (AAT ó A1AT) es una glicoproteína de fase aguda de 52 kDa, sintetizada por los hepatocitos y secretada al plasma [436]. También la sintetizan y secretan macrófagos [437], células intestinales [438] y células epiteliales bronquiales [439]. Inicialmente se la denominó así por su habilidad de inhibir a la tripsina pancreática [440]. Posteriormente se encontró que era un efectivo inhibidor de una variedad de otras proteasas incluyendo la elastasa de los neutrófilos, catepsina G [441] y proteasa 3 [442].

Estados deficientes de esta proteína se han relacionado con enfisema y obstrucción pulmonar [443], enfermedad hepática crónica o aguda [444] y enfermedad cardiovascular [445]. Con relación al enfisema pulmonar, como hemos mencionado anteriormente, la A1At es la principal defensa contra la elastasa, evitando a nivel pulmonar la degradación de la pared alveolar. Por ello, es muy importante el equilibrio entre Alfa 1 Antitripsina y elastasa. La deficiencia de Alfa-1 Antitripsina es un trastorno genético hereditario que puede ocasionar en la tercera y cuarta década de vida una enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fundamentalmente enfisema. El déficit de alfa-1 se caracteriza por unos niveles en la sangre muy bajos o inexistentes de AAT, por lo tanto, el incremento de los niveles de la proteína en sujetos que tomaron la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> es un hallazgo interesante a nuestro parecer, ya que está ocasionando de alguna manera el incremento de la proteína a nivel plasmático, pudiendo utilizarse como tratamiento para prevenir el déficit ocasionado en edades avanzadas. De hecho, se han utilizado con éxito terapias en las que se han administrado

niveles intravenosos de un derivado de A1AT en sujetos con deficiencia de la proteína siendo éstas muy eficaces [446].

Además de proteger contra la destrucción del tejido alveolar, la A1AT también protege de la inflamación ocasionada por las infecciones y los irritantes inhalados como el humo de cigarrillo, el cual incrementa el estrés oxidativo mediante la acumulación de oxidantes como los radicales libres y el óxido nítrico, incrementando así el daño pulmonar ocasionado. Por lo tanto, el incremento que encontramos en los sujetos alimentados con la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub> podría beneficiar a los fumadores [447], a través de su acción y del poder antioxidante que posee el CoQ<sub>10</sub>.

Con respecto al papel que desempeña la Alfa 1 Antitripsina a nivel endotelial, se ha encontrado que esta proteína limita el daño causado por los granulocitos y neutrófilos tras la síntesis de elastasa (enzima que degrada la elastina del tejido conectivo) desempeñando un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. La progresión de la enfermedad está asociada con bajos niveles de la proteína y mutaciones de A1AT [445].

Además de lo todo lo expuesto hasta ahora, también se han asociado los niveles de Alfa 1 Antitripsina con los procesos inflamatorios. Se ha visto que la IL-6 regula la expresión de la proteína a través de factores nucleares de transcripción ligados a IL-6 y IL-6 $\beta$  [448], y que los diferentes genotipos obtenidos dan lugar a una mayor o menor expresión durante la inflamación, donde se incrementan mucho los niveles debido a la acción de esta citoquina [339].

Estudios recientes han mostrado la relación existente entre la deficiencia de A1AT y el incremento de padecer diabetes tipo II [449]. Por otro lado, se ha visto que la A1TA es un inhibidor fisiológico de la Proteína C (APC) y su actividad anticoagulante, ya que esta proteína se une a factores de coagulación como Va y VIIIa, evitando así la propagación de la cascada. En este sentido, un estudio realizado sobre una población de niños con isquemia cerebral mostró un incremento de esta proteína en sangre tras sufrir trombosis [450].

Por último, comentar que la síntesis elevada de A1AT entorpece la secreción de la proteína en hepatocitos y da lugar a la acumulación en las cisternas del retículo endoplasmático rugoso [451]. Un síntoma de acumulación es la reducción de los niveles

en plasma, por lo tanto el incremento de los niveles plasmáticos de esta proteína en los sujetos que tomaron la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> puede estar indicándonos el incremento de la eficiencia de secreción hepática, con su consecuente actividad a nivel pulmonar y su no acumulación en el hígado.

Los resultados obtenidos tras nuestros estudios nos indican que existe una relación directa de la grasa de la dieta y el suplemento con CoQ<sub>10</sub> sobre la síntesis y secreción de esta proteína, aumentando o no la protección frente a los tejidos; aunque se requieren futuras investigaciones para profundizar más aún sobre los mecanismos ligados a estos procesos. La disminución de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), medidas en el plasma de los mismos sujetos estudiados en esta tesis, indicarían una protección adicional aportada por las dietas, sobre todo por la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>, al disminuir la necesidad de acción de estas enzimas. El incremento de A1AT junto con la disminución de SOD responde al carácter protector del antioxidante en el organismo (en vías de publicación).

### ***Alfa-1-Antiquimiotripsina***

Se modificaron los niveles de algunas de sus isoformas (una incrementó y otra disminuyó) con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al compararse con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Cuando comparamos la dieta SFA con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> también observamos variación de sus niveles entre ambas (una incrementa y otra disminuye en PUFA<sub>n-3</sub>). Los niveles de esta proteína no sufrieron modificaciones tras la ingesta de las otras dietas experimentales. Al igual que la A1AT, la Alfa-1-Antiquimiotripsina es una proteína de fase aguda inhibidora de las serinproteasas (SERPINA) sintetizada por los hepatocitos y las células epiteliales bronquiales [452]. El papel exacto es incierto, aunque se piensa que puede actuar como un agente antiinflamatorio inhibiendo la quimiotripsina pancreática, la catepsina G del neutrófilo, las quinasas mastocitarias y la producción de superóxido por parte del neutrófilo [453, 454]. Al igual que todos los miembros de la superfamilia de las serpinas, esta proteína está constituida por un dominio en lámina β A y un bucle reactivo móvil que actúa como un pseudosustrato para el reconocimiento de las proteinasas [455]. La transición conformacional de su estructura da lugar a estados deficientes de la proteína, lo que conlleva a patologías pulmonares como la obstrucción

---

---

crónica del flujo aéreo [456]. Entre las deficiencias descritas, una de ellas se caracteriza por la disminución de los niveles plasmáticos debido a la acumulación de la proteína en los hepatocitos, lo que conllevaría al desarrollo de enfermedades hepáticas [457].

Por otro lado, un estudio reciente realizado sobre sujetos que han sufrido un bypass arterial coronario ha mostrado un desbalance de los niveles de proteasas/inhibidores de proteasas, encontrando niveles plasmáticos elevados de Alfa 1 Antiquimiotripsina en los sujetos tras ser operados [458].

La acción de esta proteína junto con la de Alfa-1-Antitripsina suponen la integridad de los tejidos, por lo que es importante el equilibrio entre estas y las proteasas. En este caso no encontramos variación de los niveles de la proteína tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>, pero sí tras la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al ser comparadas ambas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Existe la posibilidad de que el grado de insaturación de la grasa tenga relación con los cambios obtenidos.

### ***Alfa 2 Glicoproteína rica en Leucina (LRG)***

Tras el estudio realizado encontramos que los niveles de esta proteína se incrementaban tras la ingesta de la dieta SFA con respecto todas a las demás.

La Alfa 2 Glicoproteína rica en Leucina (LRG) es una proteína de fase aguda que se secreta en respuesta a IL-6, siendo esta mayor a medida que incrementan los mediadores de fase aguda [459]. Esta proteína es un biomarcador sérico de enfermedades autoinmunes. De hecho, se han encontrado niveles elevados en enfermos con artritis reumatoide y enfermedad de Crohn's. Curiosamente, estos niveles no se correspondieron con la elevación de otras proteínas reactantes de fase aguda como la Proteína C Reactiva [460]. Por otro lado, los niveles de esta proteína también se correlacionan con la presencia de apendicitis. LRG es un marcador específico de inflamación local y se encuentra muy elevado en la orina de sujetos que desarrollan la enfermedad [461].

Esta proteína también está relacionada con la integridad del pulmón. En este sentido, un estudio reciente realizado sobre un grupo de sujetos con hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI) mostró un incremento significativo de sus niveles en estos

sujetos con respecto a los controles, y concluyó que, esta proteína puede utilizarse como un biomarcador de diagnóstico específico para HAPI [462].

Con respecto a la función endotelial, se ha visto que LRG forma parte de los receptores de plaquetas, favoreciendo la agregación de éstas al endotelio y la consecuente disfunción de la pared [463].

También se ha visto que su expresión es importante en la supervivencia celular durante procesos de estrés. Estudios realizados sobre una línea promielocítica humana (HL60) concluyeron que las células con niveles reducidos de LRG son más sensibles a la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno. Esto nos indica que la LRG juega un papel importante en la supervivencia celular en respuesta al estrés y a agentes dañinos del ADN. Esto puede realizarse a través de su unión a citocromo *c*, ya que LRA2GP1 es el primer ligando extracelular de citocromo *c* (biomarcador sérico de apoptosis aberrantes) [464] que cuando se unen actúan como un factor de supervivencia de linfocitos y de otras células susceptibles del efecto tóxico del citocromo *c* extracelular [465] anulando su acción.

Un estudio ha sugerido que LRG es un nuevo marcador en la diferenciación temprana de granulocitos neutrófilos [466]. También se ha encontrado esta proteína sobre expresada en algunos tipos de cáncer como el de páncreas [467].

En su conjunto, todo esto nos indica que el incremento plasmático de la proteína en los sujetos que tomaron la dieta SFA puede estar relacionado con un proceso inflamatorio local, típico de los ácidos grasos saturados; y que puede condicionar la supervivencia de células endoteliales

### ***Proteína C Reactiva***

Los niveles de esta proteína se incrementaron tras la ingesta de la dieta mediterránea suplementada con CoQ<sub>10</sub>, la dieta SFA y la dieta PUFA<sub>n-3</sub>, al ser comparadas cada una de ellas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Los niveles observados en la dieta PUFA<sub>n-3</sub> fueron superiores cuando esta se comparó con la dieta SFA.

La Proteína C Reactiva (CPR) es una proteína reactante de fase aguda sintetizada por el hígado en respuesta al estímulo inducido por la IL-6. Posee un efecto proinflamatorio y proaterógeno sobre las células endoteliales, al aumentar la expresión de moléculas de adherencia y quimiotácticas. Además, favorece la liberación por los monocitos de citocinas proinflamatorias como la IL-1b y el **TNF- $\beta$** . Parece que las acciones proinflamatorias están mediadas, al menos en parte, por la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), aunque también puede que influyan en este sentido la lesión endotelial, la producción de radicales libres de oxígeno y la migración y activación de las células musculares lisas de la pared vascular [468].

Varias líneas argumentales apuntan a que la inflamación contribuye al desarrollo de la aterosclerosis, y en este sentido, la Proteína C Reactiva juega un papel fundamental; sin embargo, estudios recientes apuntan a que las propiedades aterogénicas ligadas al incremento de esta proteína, están reguladas por la presencia de una forma modificada de la proteína (mCPR) que es la que presenta afinidad por las plaquetas aumentando la expresión de moléculas de adherencia y quimiotácticas. Estos cambios conformacionales en las isoformas de la proteína (de nCRP a mCRP) determinan la activación plaquetaria durante los procesos aterogénicos y el desarrollo o no de la enfermedad [469, 470].

Por otro lado, algunos estudios llevados a cabo hasta el momento, concluyen que la suplementación de la dieta con vitamina E reduce el estado inflamatorio y la concentración de CPR en babuinos adultos sanos. Así mismo, la suplementación de estas mismas dietas con CoQ<sub>10</sub> mejora aún más los efectos antiinflamatorios observados previamente [340].

Paralelamente, en un sistema *in vitro* (células en cultivo tratadas con CoQ<sub>10</sub> exógeno) se ha observado que el CoQ<sub>10</sub> induce la expresión de muchos genes, entre ellos los regulados por NF $\kappa$ B como la proteína C Reactiva, la cual incrementa hasta tres veces tras el tratamiento con el antioxidante [341]. Esto concuerda con nuestros resultados, ya que observamos un incremento de la proteína tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub>.

Estos resultados son interesantes, ya que a pesar de que la proteína incrementa tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> y la dieta PUFA <sub>n-3</sub> (que muestran



propiedades antiinflamatorias según algunos estudios), este incremento puede estar ligado a la isoforma "anti-aterogénica" descrita anteriormente, con lo que el incremento de la Proteína C Reactiva en nuestro estudio no influiría negativamente en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Por otro lado, estudios realizados sobre una población de sujetos con acromegalia (la cual está ligada a la enfermedad cardiovascular) mostraron un incremento de los niveles de fibrinógeno (la cual se induce también en respuesta a IL-6 como se hace referencia en apartados anteriores) pero no de Proteína C Reactiva [471]. Si recordamos, en nuestro estudio los niveles de fibrinógeno disminuyen significativamente tras la ingesta de la dieta suplementada con CoQ<sub>10</sub> y a su vez incrementan los de CPR, por lo que en nuestro caso la expresión de ambas proteínas puede que no esté directamente relacionada.

Por lo tanto, todas estas consideraciones deben de ser tenidas en cuenta a la hora de interpretar nuestros resultados. El incremento de la proteína observado tras la ingesta de alguna de las dietas puede estar implicada en otros procesos y no ligada directamente al desarrollo de procesos ateroscleróticos.

### ***Complemento C1 y Complemento C4A***

El complemento C1 incrementa dos isoformas tras suplementar la dieta mediterránea con CoQ<sub>10</sub>, no encontrando cambios significativos entre las demás dietas. Por otro lado, el complemento C4A incrementa con todas las dietas (MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub>, SFA y PUFA<sub>n-3</sub>) cuando se comparan cada una de ellas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>, observándose un incremento aun mayor tras la dieta PUFA<sub>n-3</sub> cuando esta se compara con la dieta SFA.

El sistema del complemento se compone de más de 30 proteínas plasmáticas que actúan conjuntamente para generar productos con propiedades inmunoprotectoras y proinflamatorias [472]. Se trata de un sistema de defensa citotóxico e innato que normalmente funciona para eliminar agentes extraños y patógenos. El sistema del complemento puede ser activado por la ruta clásica, la ruta alternativa o la ruta de las lectinas [473]. Sin embargo, existen evidencias que sugieren que el complemento juega

un papel clave en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares [474]. El complemento C4A tiene función de anafilotoxina, favoreciendo la degranulación de células cebadas y la liberación de histaminas, sustancia que favorece la inflamación. A pesar de los resultados obtenidos referentes a la Proteína C Reactiva y el complemento C1 y C4A, es importante determinar el umbral que delimita un estado protector favorecido por el sistema del complemento y un estado inflamatorio perjudicial. Nuestros resultados muestran que las dietas con diferente contenido graso, así como el suplemento con CoQ<sub>10</sub>, modifican el sistema del complemento, pero no aclaran las consecuencias de esta modificación.

#### ***Complejo Glicoproteína-HC ( $\alpha$ -1-Microglobulina) e Inhibidor Inter Alfa H4 (IaIH4)***

Al menos cuatro genes, designados H1, H2, H3 y H4, junto con el gen precursor de  $\alpha$ -1-Microglobulina ( $\alpha$ 1m) / bikunina (AMBP), están involucrados en la síntesis de la mayoría de los miembros de la familia Inhibidores de Inter Alfa (I $\alpha$ I). Ambos genes se transcriben en el hígado y los productos son secretados al plasma. El gen AMBP da lugar a  $\alpha$ 1m y bikunina, las cuales no están relacionadas ni estructuralmente ni funcionalmente.

**Alfa-1-Microglobulina**, también llamado complejo Glicoproteína HC, pertenece a la superfamilia de las lipocaninas [475] y puede funcionar como transportador de moléculas pequeñas, aunque también puede tener un papel importante en la regulación negativa del sistema inmune [476] propiciando un estado antiinflamatorio y protector, mediante su unión a radicales libres e IL-1 $\beta$ , la inhibición de IL-2 y de neutrófilos granulocitos, así como la migración de leucocitos y la inhibición de procesos quimiotácticos [477]. Se puede encontrar en su forma libre así como formando complejos con proteínas plasmáticas como la IgAs y albúmina en humanos, ó Inhibidor 3 $\alpha$ 1 y fibronectina en la rata [478]

. El **Inhibidor de Inter- $\alpha$ -Tripsina o Bikunina** es un inhibidor de serín-proteasas de la superfamilia Kunitz y se cree que, además de participar en procesos como el crecimiento de las células endoteliales [479] participa en la estabilización de la matriz celular [480]. Sin embargo también parece que puede funcionar como agente

anti-inflamatorio [481], ya que estas moléculas tienen afinidad por enzimas como la tripsina, quimiotripsina, catepsina G, elastasa de leucocitos, acrosina y plasmina.

En nuestros estudios observamos que la  $\alpha$  1-Microglobulina incrementó tras la ingesta de la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al compararse con la dieta MUFA<sub>n-9</sub> y con la dieta SFA. Se sabe que los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 son inmunosupresores y por tanto antiinflamatorios, teniendo implicación en procesos inflamatorios agudos y crónicos, así como en aquellas situaciones en las cuales existen alteraciones inmunológicas, como son las patologías de carácter autoinmune [482]. Nuestros resultados apoyan estas consideraciones. El incremento de la proteína en plasma podría tener relación con los efectos antiinflamatorios típicos de los PUFA<sub>n-3</sub>.

Por otro lado, algunas isoformas del Inhibidor Inter  $\alpha$  H4P (I $\alpha$ IH4P) incrementan tras la ingesta de la dieta MUFA<sub>n-9</sub> + CoQ<sub>10</sub> y PUFA<sub>n-3</sub>, al compararse cada una de ellas con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. Este incremento puede ser reflejo de un estado antiinflamatorio propiciado tanto por los ácidos grasos poliinsaturados omega 3, como por el CoQ<sub>10</sub>, al cual también se le han asignado propiedades antiinflamatorias induciendo la expresión de genes relacionados con estos procesos [341, 483].

### ***Antígeno MHC Clase I***

Encontramos una isoforma poco abundante de la proteína que disminuía con la dieta PUFA<sub>n-3</sub> al ser comparada con la dieta MUFA<sub>n-9</sub>. No se modificaron los niveles tras la ingesta de las otras dietas experimentales. En humanos, los genes MHC conforman el denominado sistema HLA (*human leukocyte antigen*), porque estas proteínas se descubrieron como antígenos en los leucocitos. Los genes MHC son fundamentales en la defensa inmunológica del organismo frente a los patógenos, y por otro lado, constituyen la principal barrera al trasplante de órganos y de células madre. Los genes MHC de Clase-I (MHC-I) codifican glucoproteínas, con estructura de inmunoglobulina (cadena pesada tipo  $\alpha$ ) que se subdivide en tres regiones:  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3. Estas tres regiones están expuestas al espacio extracelular y están unidas a la membrana de la célula mediante una región transmembrana. La cadena  $\alpha$  está siempre asociada a una molécula de microglobulina  $\beta$ 2. Estas moléculas se expresan en la superficie de todas las células nucleadas [484]. La principal función de los productos génicos de la

Clase-I es la presentación de péptidos antigénicos intracelulares a los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Parece ser que la grasa de la dieta está influenciando la respuesta del sistema inmune modificando la presentación de antígenos a los linfocitos.

## DISCUSIÓN GENERAL

En general, el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional de muestras de plasma, tanto de ratas como de humanos, nos ha permitido encontrar varias proteínas diferencialmente expresadas tras la administración de dietas con diferente contenido graso y suplementos de CoQ<sub>10</sub>.

Hemos comprobado la importancia que tiene la elección de un buen método de procesamiento en este tipo de muestras, previo al desarrollo de la técnica de análisis bidimensional, ya que la enorme complejidad que presenta el plasma sanguíneo limita mucho el rango de estudio y dificulta la elección adecuada del método que nos permita determinar correctamente biomarcadores implicados en nuestro estudio. El plasma no es un tipo celular, ni un tejido capaz de controlar la expresión de sus proteínas, sino que se trata de un fluido que recoge lo que diferentes células, tejidos y órganos liberan en él. En este sentido, son muy interesantes los estudios realizados en plasma, ya que nos da una idea de la respuesta del organismo en su conjunto a los componentes de la dieta.

Por otro lado, los cambios observados en las ratas fueron mucho más acusados que los encontrados en humanos. Esto puede deberse a que las personas estamos expuestas a más variantes, tanto internas (predisposición genética, sexo, etc...) como externas (factores ambientales), que afectan en mayor medida a la respuesta de nuestro organismo a las diferentes intervenciones dietéticas, al contrario de lo que ocurre en ratas, las cuales han estado sometidas a estos estudios bajo condiciones controladas.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos comprobado la importancia que tiene el componente graso y el suplemento de la dieta con antioxidantes sobre procesos oxidativos, condicionando la susceptibilidad celular a sufrir estrés. En este caso se han visto alteradas proteínas relacionadas con estos procesos como la peroxirredoxina tipo 1, la ceruloplasmina o la transferrina, las cuales han sufrido modificaciones en mayor o menor medida en ambos organismos.

Por otro lado, hemos comprobado el papel de la dieta en el desarrollo de la aterosclerosis. El perfil lipídico de los ácidos grasos tiene un efecto directo sobre la composición lipídica del plasma y por lo tanto, sobre el perfil lipídico de las lipoproteínas, haciéndolas más o menos susceptibles a oxidarse. Hemos comprobado cómo los procesos implicados en la integridad del endotelio, como los estados antiinflamatorios o antitrombóticos, están regulados por el tipo de dieta, modificándose

los niveles de proteínas asociadas a estos procesos, entre las que destacamos la fetuína, la proteína C reactiva o los factores del complemento; así como el fibrinógeno, la antitrombina o la apolipoproteína H, respectivamente. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran una vez más el beneficio que aporta la ingesta de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados, al compararse con otro tipo de dietas ricas en ácidos grasos saturados, tanto a edades tempranas como a edades más avanzadas.

Por otro lado, el suplemento de la dieta con Coenzima Q<sub>10</sub> ha potenciado aún más estos efectos, siendo un posible candidato para prevenir o paliar enfermedades asociadas a la edad, disminuyendo un estado prooxidante y modulando la síntesis de proteínas implicadas en procesos trombóticos, destacándose los cambios observados sobre los niveles de fibrinógeno o manteniendo la integridad de tejidos, modificando los niveles de alfa 1 antitripsina.

Finalmente, hemos comprobado cómo los modelos *in vitro* pueden reproducir algunos de los resultados obtenidos *in vivo*. En este sentido, hemos observado cómo la secreción de apolipoproteína J/clusterina disminuía tras suplementar células HepG2 con la misma concentración de CoQ<sub>10</sub> observada en los sujetos que consumieron la dieta suplementada con el antioxidante. Ello indica que las alteraciones encontradas sobre los niveles de algunas de las proteínas plasmáticas, en este caso de la clusterina, pueden ser resultado de un efecto directo del CoQ<sub>10</sub> sobre las células hepáticas y no de una respuesta indirecta a nivel sistémico.

En definitiva, la presente Tesis Doctoral muestra que el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional combinada con espectrometría de masas es una herramienta útil en el estudio de la expresión proteica en la sangre de diferentes organismos sometidos a estudios de intervención dietética. Los datos presentados abren la puerta a futuros estudios para elucidar la relevancia de estas variaciones en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares, o bien para evaluar su posible utilidad como biomarcadores pronósticos y/o de evolución de enfermedades asociadas con la edad que estén ligadas al estado nutricional.



## **Conclusiones**





- 1) La proteómica es una herramienta útil en la búsqueda de biomarcadores plasmáticos asociados a la ingesta de dietas con diferente contenido graso y suplementos con CoQ<sub>10</sub>.
- 2) Tanto la depleción de las proteínas mayoritarias del plasma utilizando un sistema cromatográfico de inmunoafinidad, como la normalización del rango dinámico de proteínas, son métodos eficaces y reproducibles que permiten estudiar la expresión de las proteínas menos abundantes del plasma mediante electroforesis bidimensional convencional (2-DE).
- 3) Los cambios observados sobre los niveles de las diferentes proteínas identificadas en nuestro estudio son más acentuados en ratas que en humanos.

En este sentido, tras los estudios realizados en ratas concluimos que:

- La ingesta de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados, tanto en ratas jóvenes como en ratas viejas, suponen mayores beneficios que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega 6, mejorando y manteniendo en el organismo a lo largo del envejecimiento un estado antioxidante, un estado antiinflamatorio y un perfil lipídico antiaterogénico.
- El suplemento de la dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados omega 6 con CoQ<sub>10</sub>, mejora el estado prooxidante proporcionado por este tipo de dietas, modificando los niveles de proteínas tanto en ratas jóvenes como en ratas viejas.
- El suplemento de la dieta con CoQ<sub>10</sub> incrementa de forma significativa los niveles del antioxidante en plasma y los mantiene a lo largo del envejecimiento.

Por otro lado, tras los estudios realizados en humanos concluimos que:

- El estudio del patrón de proteínas plasmáticas apoya que la ingesta de la dieta mediterránea, rica en ácidos grasos monoinsaturados, presenta mayores beneficios que una dieta rica en ácidos grasos saturados, mejorando el perfil

de proteínas relacionadas con procesos antiinflamatorios, antitrombóticos y antioxidantes.

- El suplemento de la dieta mediterránea rica en ácidos grasos monoinsaturados con CoQ<sub>10</sub> potencia aún más los beneficios cardioprotectores de este tipo de grasa. Hemos encontrado una disminución significativa de los niveles de gamma fibrinógeno tras la ingesta de la dieta suplementada con el antioxidante.
- 4) En conjunto, los datos presentados en esta Tesis Doctoral muestran que el análisis proteómico del plasma, tanto de ratas como de humanos sometidos a diferentes intervenciones dietéticas, permite identificar nuevas proteínas con alteraciones en sus niveles de expresión que las convierten en candidatas a ser consideradas como biomarcadores asociados con la edad que están ligadas al estado nutricional. Además, estos resultados permiten plantear nuevas líneas de investigación para estudiar la posible implicación de las proteínas identificadas en diversas enfermedades asociadas a la edad y la alimentación.

## **Bibliografía**



---

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kirkwood, T.B. and S.N. Austad, *Why do we age?* Nature, 2000. **408**(6809): p. 233-8.
2. Wallace, D.C., *Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?* Science, 1992. **256**(5057): p. 628-32.
3. Wallace, D.C., *Diseases of the mitochondrial DNA*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 1175-212.
4. Sohal, R.S., R.J. Mockett, and W.C. Orr, *Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(5): p. 575-86.
5. Sohal, R.S., *Oxidative stress hypothesis of aging*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(5): p. 573-4.
6. Barja, G. and A. Herrero, *Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals*. Faseb J, 2000. **14**(2): p. 312-8.
7. Barja, G., *Free radicals and aging*. Trends Neurosci, 2004. **27**(10): p. 595-600.
8. Harman, D., *The free radical theory of aging*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(5): p. 557-61.
9. West, S.G., *Effect of diet on vascular reactivity: an emerging marker for vascular risk*. Curr Atheroscler Rep, 2001. **3**(6): p. 446-55.
10. Vissers, M.N., P.L. Zock, and M.B. Katan, *Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(6): p. 955-65.
11. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
12. Finkel, T., *Ageing: a toast to long life*. Nature, 2003. **425**(6954): p. 132-3.
13. Saremi, A. and R. Arora, *Vitamin E and Cardiovascular Disease*. Am J Ther, 2009.
14. Dietrich, M., et al., *Vitamin E supplement use and the incidence of cardiovascular disease and all-cause mortality in the Framingham Heart Study: Does the underlying health status play a role?* Atherosclerosis, 2009. **205**(2): p. 549-53.
15. Galpern, W.R. and M.E. Cudkowicz, *Coenzyme Q treatment of neurodegenerative diseases of aging*. Mitochondrion, 2007. **7 Suppl**: p. S146-53.
16. Wadsworth, T.L., et al., *Evaluation of coenzyme Q as an antioxidant strategy for Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2008. **14**(2): p. 225-34.
17. Morris, M.C., *The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence*. Eur J Neurol, 2009. **16 Suppl 1**: p. 1-7.
18. Schewe, T., Y. Steffen, and H. Sies, *How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper*. Arch Biochem Biophys, 2008. **476**(2): p. 102-6.
19. Crozier, A., I.B. Jaganath, and M.N. Clifford, *Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*. Nat Prod Rep, 2009. **26**(8): p. 1001-43.
20. Hertog, M.G., et al., *Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study*. Lancet, 1993. **342**(8878): p. 1007-11.
21. Andrikopoulos, N.K., et al., *Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation*. J Med Food, 2002. **5**(1): p. 1-7.
22. Visioli, F., et al., *Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents*. Atherosclerosis, 1995. **117**(1): p. 25-32.
23. Vivancos, M. and J.J. Moreno, *Effect of resveratrol, tyrosol and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages*. Br J Nutr, 2008. **99**(6): p. 1199-207.

24. Visioli, F. and C. Galli, *Free radical-scavenging actions of olive oil phenolics*. *Lipids*, 1999. **34 Suppl**: p. S315.
25. Owen, R.W., et al., *Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene*. *Food Chem Toxicol*, 2000. **38**(8): p. 647-59.
26. Kang, M.H., et al., *Mode of action of sesame lignans in protecting low-density lipoprotein against oxidative damage in vitro*. *Life Sci*, 2000. **66**(2): p. 161-71.
27. Han, H.Y., et al., *Lignans isolated from *Campylotropis hirtella* (Franch.) Schindl. decreased prostate specific antigen and androgen receptor expression in LNCaP cells*. *J Agric Food Chem*, 2008. **56**(16): p. 6928-35.
28. Verschoyle, R.D., et al., *Consumption of silibinin, a flavonolignan from milk thistle, and mammary cancer development in the C3(1) SV40 T,t antigen transgenic multiple mammary adenocarcinoma (TAg) mouse*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2008. **62**(2): p. 369-72.
29. Owen, R.W., et al., *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil*. *Clin Chem*, 2000. **46**(7): p. 976-88.
30. Owen, R.W., et al., *The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil*. *Eur J Cancer*, 2000. **36**(10): p. 1235-47.
31. Yugarani, T., et al., *Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets*. *Lipids*, 1992. **27**(3): p. 181-6.
32. Nalini, D. and R. Kapoor, *Effect of plant fruits--Indian gall nut, bedda nut and gooseberry--on hypercholesterolemic rats*. *Plant Foods Hum Nutr*, 1999. **53**(4): p. 343-9.
33. Festenstein, G.N., et al., *A constituent of the unsaponifiable portion of animal tissue lipids ( $\lambda$  max. 272 m  $\mu$ )*. *Biochem J*, 1955. **59**(4): p. 558-66.
34. Crane, F.L., et al., *Isolation of a quinone from beef heart mitochondria*. *Biochim Biophys Acta*, 1957. **25**(1): p. 220-1.
35. D.E. Wolf, C.H.H., N.R. Trenner, B.H. Arison, C.H. Shunk, B.O. Linn, J.F. McPherson, K. Folkers, J. *Am. Chem. Soc.* 80 ( ) 4750– 4752. *Coenzyme Q. Structure studies on the coenzyme Q group*. 1958 [cited].
36. Ernster, L., et al., *Studies with ubiquinone-depleted submitochondrial particles. Essentiality of ubiquinone for the interaction of succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and cytochrome b*. *Eur J Biochem*, 1969. **9**(3): p. 299-310.
37. Mitchell, P., *Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c1 complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle*. *FEBS Lett*, 1975. **56**(1): p. 1-6.
38. Villalba JM, P.C., Santos-Gonzalez M, Alcain FJ., *Therapeutic use of coenzyme Q(10) and coenzyme Q(10)-related compounds and formulations*. *Expert Opin Investig Drugs*. , 2010. **19**: p. 535-54.
39. Turunen, M., J. Olsson, and G. Dallner, *Metabolism and function of coenzyme Q*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1660**(1-2): p. 171-99.
40. Quiles, J.L., et al., *Coenzyme Q supplementation protects from age-related DNA double-strand breaks and increases lifespan in rats fed on a PUFA-rich diet*. *Exp Gerontol*, 2004. **39**(2): p. 189-94.
41. Bello, R.I., et al., *Enhanced anti-oxidant protection of liver membranes in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet*. *Exp Gerontol*, 2005. **40**(8-9): p. 694-706.
42. Ochoa, J.J., et al., *Coenzyme Q10 protects from aging-related oxidative stress and improves mitochondrial function in heart of rats fed a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2005. **60**(8): p. 970-5.
43. McNamara, R.K. and S.E. Carlson, *Role of omega-3 fatty acids in brain development and function: potential implications for the pathogenesis and prevention of psychopathology*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2006. **75**(4-5): p. 329-49.

44. Smit, E.N., F.A. Muskiet, and E.R. Boersma, *The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004. **71**(4): p. 241-50.
45. Agostoni, C. and M.G. Bruzzese, [*Fatty acids: their biochemical and functional classification*]. *Pediatr Med Chir*, 1992. **14**(5): p. 473-9.
46. Mataix, ed. *Lípidos*. Ergon ed. Nutrición y Alimentación Humana. Vol. I. 2002: Madrid.
47. Perez-Jimenez, F., et al., *International conference on the healthy effect of virgin olive oil*. *Eur J Clin Invest*, 2005. **35**(7): p. 421-4.
48. Ascherio, A., et al., *Trans fatty acids and coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(25): p. 1994-8.
49. Moyad, M.A., *An introduction to dietary/supplemental omega-3 fatty acids for general health and prevention: part I*. *Urol Oncol*, 2005. **23**(1): p. 28-35.
50. Roche, H.M., *Unsaturated fatty acids*. *Proc Nutr Soc*, 1999. **58**(2): p. 397-401.
51. Das, U.N., *Essential fatty acids, lipid peroxidation and apoptosis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999. **61**(3): p. 157-63.
52. Sacks, F.M. and H. Campos, *Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and cardiovascular disease: time to widen our view of the mechanisms*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(2): p. 398-400.
53. Wijendran, V. and K.C. Hayes, *Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health*. *Annu Rev Nutr*, 2004. **24**: p. 597-615.
54. Mori, T.A. and L.J. Beilin, *Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction*. *Curr Opin Lipidol*, 2001. **12**(1): p. 11-7.
55. Schmidt, E.B., et al., *Fish, marine n-3 polyunsaturated fatty acids and coronary heart disease: a minireview with focus on clinical trial data*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 191-5.
56. Chalon, S., *Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(4-5): p. 259-69.
57. Bakewell, L., G.C. Burdge, and P.C. Calder, *Polyunsaturated fatty acid concentrations in young men and women consuming their habitual diets*. *Br J Nutr*, 2006. **96**(1): p. 93-9.
58. Freemantle, E., et al., *Omega-3 fatty acids, energy substrates, and brain function during aging*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 213-20.
59. Hibbeln, J.R., et al., *Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1483S-1493S.
60. Sinclair, A.J., N.M. Attar-Bashi, and D. Li, *What is the role of alpha-linolenic acid for mammals?* *Lipids*, 2002. **37**(12): p. 1113-23.
61. Burdge, G.C., *Metabolism of alpha-linolenic acid in humans*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. **75**(3): p. 161-8.
62. Bourre, J.M., *Roles of unsaturated fatty acids (especially omega-3 fatty acids) in the brain at various ages and during ageing*. *J Nutr Health Aging*, 2004. **8**(3): p. 163-74.
63. Nettleton, J.A., *Omega-3 fatty acids: comparison of plant and seafood sources in human nutrition*. *J Am Diet Assoc*, 1991. **91**(3): p. 331-7.
64. Covas, M.I., V. Konstantinidou, and M. Fito, *Olive oil and cardiovascular health*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009. **54**(6): p. 477-82.
65. Bautista, M.C. and M.M. Engler, *The Mediterranean diet: is it cardioprotective?* *Prog Cardiovasc Nurs*, 2005. **20**(2): p. 70-6.
66. Fito, M., et al., *Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial*. *Atherosclerosis*, 2005. **181**(1): p. 149-58.
67. Menendez, J.A., et al., *Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth*



- inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification.* Ann Oncol, 2005. **16**(3): p. 359-71.
68. Colomer, R. and J.A. Menendez, *Mediterranean diet, olive oil and cancer.* Clin Transl Oncol, 2006. **8**(1): p. 15-21.
69. Menendez, J.A., et al., *Extra-virgin olive oil polyphenols inhibit HER2 (erbB-2)-induced malignant transformation in human breast epithelial cells: relationship between the chemical structures of extra-virgin olive oil secoiridoids and lignans and their inhibitory activities on the tyrosine kinase activity of HER2.* Int J Oncol, 2009. **34**(1): p. 43-51.
70. Lopez-Soldado, I., M. Avella, and K.M. Botham, *Differential influence of different dietary fatty acids on very low-density lipoprotein secretion when delivered to hepatocytes in chylomicron remnants.* Metabolism, 2009. **58**(2): p. 186-95.
71. Degirolamo, C., G.S. Shelness, and L.L. Rudel, *LDL cholesteryl oleate as a predictor for atherosclerosis: evidence from human and animal studies on dietary fat.* J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S434-9.
72. Perez-Jimenez, F., J. Lopez-Miranda, and P. Mata, *Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol.* Atherosclerosis, 2002. **163**(2): p. 385-98.
73. Gimeno, E., et al., *Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition.* Eur J Clin Nutr, 2002. **56**(2): p. 114-20.
74. Mensink, R.P. and M.B. Katan, *Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials.* Arterioscler Thromb, 1992. **12**(8): p. 911-9.
75. Witztum, J.L., *The oxidation hypothesis of atherosclerosis.* Lancet, 1994. **344**(8925): p. 793-5.
76. Parthasarathy, S., et al., *Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(10): p. 3894-8.
77. Tsimikas, S., et al., *LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesion when exposed to oxidative stress.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(1): p. 122-30.
78. Carluccio, M.A., et al., *Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(2): p. 220-8.
79. SanGiovanni, J.P. and E.Y. Chew, *The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina.* Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(1): p. 87-138.
80. Muskiet, F.A., et al., *Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials.* J Nutr, 2004. **134**(1): p. 183-6.
81. Arterburn, L.M., E.B. Hall, and H. Oken, *Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans.* Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1467S-1476S.
82. Helland, I.B., et al., *Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age.* Pediatrics, 2003. **111**(1): p. e39-44.
83. Oken, E., et al., *Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort.* Environ Health Perspect, 2005. **113**(10): p. 1376-80.
84. Oken, E., et al., *Associations of seafood and elongated n-3 fatty acid intake with fetal growth and length of gestation: results from a US pregnancy cohort.* Am J Epidemiol, 2004. **160**(8): p. 774-83.

85. Cheatham, C.L., J. Colombo, and S.E. Carlson, *N-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1458S-1466S.
86. Cakiner-Egilmez, T., *Omega 3 fatty acids and the eye*. *Insight*, 2008. **33**(4): p. 20-5; quiz 26-7.
87. Tsubura, A., et al., *Role of fatty acids in malignancy and visual impairment: epidemiological evidence and experimental studies*. *Histol Histopathol*, 2009. **24**(2): p. 223-34.
88. Nguyen, C.T., et al., *Dietary omega 3 fatty acids decrease intraocular pressure with age by increasing aqueous outflow*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. **48**(2): p. 756-62.
89. Muskiet, F.A., et al., *Long-chain polyunsaturated fatty acids in maternal and infant nutrition*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2006. **75**(3): p. 135-44.
90. Logan, A.C., *Omega-3 fatty acids and major depression: a primer for the mental health professional*. *Lipids Health Dis*, 2004. **3**: p. 25.
91. Simopoulos, A.P., *Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases*. *J Am Coll Nutr*, 2002. **21**(6): p. 495-505.
92. Wright, S.A., et al., *A randomised interventional trial of omega-3-polyunsaturated fatty acids on endothelial function and disease activity in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(6): p. 841-8.
93. Sinha, R.A., et al., *Anti-apoptotic role of omega-3-fatty acids in developing brain: perinatal hypothyroid rat cerebellum as apoptotic model*. *Int J Dev Neurosci*, 2009. **27**(4): p. 377-83.
94. Salvati, S., et al., *Diet, lipids and brain development*. *Dev Neurosci*, 2000. **22**(5-6): p. 481-7.
95. Dijck-Brouwer, D.A., et al., *Lower fetal status of docosahexaenoic acid, arachidonic acid and essential fatty acids is associated with less favorable neonatal neurological condition*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005. **72**(1): p. 21-8.
96. Turner, D., et al., *Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(1): p. CD006320.
97. El-Matary, W., *Enteral nutrition as a primary therapy of Crohn's disease: the pediatric perspective*. *Nutr Clin Pract*, 2009. **24**(1): p. 91-7.
98. Kato, I., et al., *Dietary fatty acids, luminal modifiers, and risk of colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2009.
99. Giros, A., et al., *Regulation of colorectal cancer cell apoptosis by the n-3 polyunsaturated fatty acids Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic*. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*, 2009. **2**(8): p. 732-42.
100. Kim, J., et al., *Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 216.
101. Fernandes, G., et al., *Effects of n-3 fatty acids on autoimmunity and osteoporosis*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 4015-20.
102. Gottrand, F., *Long-chain polyunsaturated fatty acids influence the immune system of infants*. *J Nutr*, 2008. **138**(9): p. 1807S-1812S.
103. Koch, C., et al., *Docosahexaenoic acid (DHA) supplementation in atopic eczema: a randomized, double-blind, controlled trial*. *Br J Dermatol*, 2008. **158**(4): p. 786-92.
104. Galarraga, B., et al., *Cod liver oil (n-3 fatty acids) as an non-steroidal anti-inflammatory drug sparing agent in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47**(5): p. 665-9.
105. Sales, C., F. Oliviero, and P. Spinella, *[Role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in diet of patients with rheumatic diseases]*. *Reumatismo*, 2008. **60**(2): p. 95-101.
106. O'Rourke, M.F., *Arterial aging: pathophysiological principles*. *Vasc Med*, 2007. **12**(4): p. 329-41.

107. Robert, L., *Aging of the vascular-wall and atherosclerosis*. Exp Gerontol, 1999. **34**(4): p. 491-501.
108. Wolfram, G., *Dietary fatty acids and coronary heart disease*. Eur J Med Res, 2003. **8**(8): p. 321-4.
109. Martins e Silva, J. and C. Saldanha, *Diet, atherosclerosis and atherothrombotic events*. Rev Port Cardiol, 2007. **26**(3): p. 277-94.
110. Viljoen, A., *New approaches in the diagnosis of atherosclerosis and treatment of cardiovascular disease*. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2008. **3**(2): p. 84-91.
111. Wahrburg, U., *What are the health effects of fat?* Eur J Nutr, 2004. **43 Suppl 1**: p. 1/6-11.
112. Mensink, R.P., et al., *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**(5): p. 1146-55.
113. Dietschy, J.M., *Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations*. J Nutr, 1998. **128**(2 Suppl): p. 444S-448S.
114. Bonanome, A. and S.M. Grundy, *Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels*. N Engl J Med, 1988. **318**(19): p. 1244-8.
115. Fernandez de la Puebla, R.A., et al., *Factor VII polymorphisms influence the plasma response to diets with different fat content, in a healthy Caucasian population*. Mol Nutr Food Res, 2007. **51**(5): p. 618-24.
116. Bowman, R., et al., *Factor VII, blood lipids and fat intake: gene-nutrient interaction and risk of coronary heart disease with the factor VII R353Q polymorphism*. Eur J Clin Nutr, 2009. **63**(6): p. 771-7.
117. Keys, A., et al., *The diet and 15-year death rate in the seven countries study*. Am J Epidemiol, 1986. **124**(6): p. 903-15.
118. Lapointe, A., C. Couillard, and S. Lemieux, *Effects of dietary factors on oxidation of low-density lipoprotein particles*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(10): p. 645-58.
119. Kris-Etherton, P.M. and S. Yu, *Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies*. Am J Clin Nutr, 1997. **65**(5 Suppl): p. 1628S-1644S.
120. Hu, F.B., et al., *Dietary intake of alpha-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women*. Am J Clin Nutr, 1999. **69**(5): p. 890-7.
121. Lee, J.H., et al., *Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(12): p. 753-8.
122. Mesa, M.D., et al., *Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein*. Atherosclerosis, 2004. **175**(2): p. 333-43.
123. De Caterina, R., R. Madonna, and M. Massaro, *Effects of omega-3 fatty acids on cytokines and adhesion molecules*. Curr Atheroscler Rep, 2004. **6**(6): p. 485-91.
124. De Caterina, R. and M. Massaro, *Omega-3 fatty acids and the regulation of expression of endothelial pro-atherogenic and pro-inflammatory genes*. J Membr Biol, 2005. **206**(2): p. 103-16.
125. Harris, W.S., *Extending the cardiovascular benefits of omega-3 Fatty acids*. Curr Atheroscler Rep, 2005. **7**(5): p. 375-80.
126. Deckelbaum, R.J. and S.R. Akabas, *n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: navigating toward recommendations*. Am J Clin Nutr, 2006. **84**(1): p. 1-2.
127. Calder, P.C., *n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(6 Suppl): p. 1505S-1519S.
128. Lopez-Garcia, E., et al., *Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women*. J Nutr, 2004. **134**(7): p. 1806-11.

129. Dyerberg, J., et al., *Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?* Lancet, 1978. **2**(8081): p. 117-9.
130. Hartweg, J., et al., *Meta-analysis of the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on haematological and thrombogenic factors in type 2 diabetes.* Diabetologia, 2007. **50**(2): p. 250-8.
131. Siddiqui, R.A., K.A. Harvey, and G.P. Zaloga, *Modulation of enzymatic activities by n-3 polyunsaturated fatty acids to support cardiovascular health.* J Nutr Biochem, 2008. **19**(7): p. 417-37.
132. Conde, C.M., et al., *Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and microvascular reactivity: observation in the hamster cheek pouch.* Microvasc Res, 2007. **73**(3): p. 237-47.
133. Bellenger-Germain, S., J.P. Poisson, and M. Narce, *Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats.* Lipids, 2002. **37**(6): p. 561-7.
134. Singh, R.B., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the Indian experiment of infarct survival--4.* Cardiovasc Drugs Ther, 1997. **11**(3): p. 485-91.
135. Burr, M.L., et al., *Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART).* Lancet, 1989. **2**(8666): p. 757-61.
136. Marchioli, R., et al., *Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione.* Circulation, 2002. **105**(16): p. 1897-903.
137. Brouwer, I.A., et al., *Intake of very long-chain n-3 fatty acids from fish and incidence of atrial fibrillation. The Rotterdam Study.* Am Heart J, 2006. **151**(4): p. 857-62.
138. Leaf, A., et al., *Prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids.* Pharmacol Ther, 2003. **98**(3): p. 355-77.
139. Felton, C.V., et al., *Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(7): p. 1337-45.
140. Plutzky, J., *Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities.* Am J Cardiol, 1999. **84**(1A): p. 15J-20J.
141. Thies, F., et al., *Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial.* Lancet, 2003. **361**(9356): p. 477-85.
142. Nestel, P.J., *Fish oil and cardiovascular disease: lipids and arterial function.* Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1 Suppl): p. 228S-31S.
143. Goodfellow, J., et al., *Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia.* J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(2): p. 265-70.
144. Oda, E., et al., *Relationships between serum unsaturated fatty acids and coronary risk factors: negative relations between nervonic acid and obesity-related risk factors.* Int Heart J, 2005. **46**(6): p. 975-85.
145. Escrich, E., et al., *Are the olive oil and other dietary lipids related to cancer? Experimental evidence.* Clin Transl Oncol, 2006. **8**(12): p. 868-83.
146. La Vecchia, C., *Association between Mediterranean dietary patterns and cancer risk.* Nutr Rev, 2009. **67 Suppl 1**: p. S126-9.
147. Sharma, A., et al., *The effects of Omega-3 fatty acids on growth regulation of epithelial ovarian cancer cell lines.* Gynecol Oncol, 2005. **99**(1): p. 58-64.
148. Stehr, S.N. and A.R. Heller, *Omega-3 fatty acid effects on biochemical indices following cancer surgery.* Clin Chim Acta, 2006. **373**(1-2): p. 1-8.

149. Noble, L.S., et al., *Prostaglandin E2 stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 600-6.
150. Larsson, S.C., et al., *Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(6): p. 935-45.
151. Schwartz, S.A., A. Hernandez, and B. Mark Evers, *The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies*. Surg Oncol, 1999. **8**(3): p. 143-53.
152. Novak, T.E., et al., *NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **284**(1): p. L84-9.
153. Higdon, J.V., et al., *Supplementation of postmenopausal women with fish oil does not increase overall oxidation of LDL ex vivo compared to dietary oils rich in oleate and linoleate*. J Lipid Res, 2001. **42**(3): p. 407-18.
154. Calder, P.C., et al., *Fatty acids and lymphocyte functions*. Br J Nutr, 2002. **87 Suppl 1**: p. S31-48.
155. Dommels, Y.E., et al., *The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE(2) synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines*. Carcinogenesis, 2003. **24**(3): p. 385-92.
156. Popp-Snijders, C., et al., *Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes*. Diabetes Res, 1987. **4**(3): p. 141-7.
157. Minami, A., et al., *Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia*. Br J Nutr, 2002. **87**(2): p. 157-62.
158. Alkaabi, J.K., et al., *Rheumatoid arthritis and macrovascular disease*. Rheumatology (Oxford), 2003. **42**(2): p. 292-7.
159. Hagen, K.B., et al., *Dietary interventions for rheumatoid arthritis*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD006400.
160. Rollins, C.J., *Effect of Intravenous Omega-3 Fatty Acids on Clinical Symptoms of Rheumatoid Arthritis*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2009.
161. Galli, C. and P.C. Calder, *Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review*. Ann Nutr Metab, 2009. **55**(1-3): p. 123-39.
162. Darlington, L.G. and T.W. Stone, *Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders*. Br J Nutr, 2001. **85**(3): p. 251-69.
163. Williamson, C., *Dietary factors and depression in older people*. Br J Community Nurs, 2009. **14**(10): p. 422, 424-6.
164. Sontrop, J. and M.K. Campbell, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and depression: a review of the evidence and a methodological critique*. Prev Med, 2006. **42**(1): p. 4-13.
165. Hibbeln, J.R. and N. Salem, Jr., *Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(1): p. 1-9.
166. Hibbeln, J.R., T.A. Ferguson, and T.L. Blasbalg, *Omega-3 fatty acid deficiencies in neurodevelopment, aggression and autonomic dysregulation: opportunities for intervention*. Int Rev Psychiatry, 2006. **18**(2): p. 107-18.
167. Yehuda, S., S. Rabinovitz, and D.I. Mostofsky, *Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging*. Neurobiol Aging, 2005. **26 Suppl 1**: p. 98-102.
168. Yehuda, S., et al., *The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane*. Neurobiol Aging, 2002. **23**(5): p. 843-53.
169. Suarez, E.C., R.R. Krishnan, and J.G. Lewis, *The relation of severity of depressive symptoms to monocyte-associated proinflammatory cytokines and chemokines in apparently healthy men*. Psychosom Med, 2003. **65**(3): p. 362-8.

170. Logan, A.C., *Neurobehavioral aspects of omega-3 fatty acids: possible mechanisms and therapeutic value in major depression*. *Altern Med Rev*, 2003. **8**(4): p. 410-25.
171. Hashimoto, K., E. Shimizu, and M. Iyo, *Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004. **45**(2): p. 104-14.
172. Wong, K.W., *Clinical efficacy of n-3 fatty acid supplementation in patients with asthma*. *J Am Diet Assoc*, 2005. **105**(1): p. 98-105.
173. Fogarty, A. and J. Britton, *Nutritional issues and asthma*. *Curr Opin Pulm Med*, 2000. **6**(1): p. 86-9.
174. Mickleborough, T.D. and M.R. Lindley, *Diet and exercise-induced bronchoconstriction*. *Chest*, 2006. **130**(2): p. 623-4; author reply 624.
175. Salam, M.T., et al., *Maternal fish consumption during pregnancy and risk of early childhood asthma*. *J Asthma*, 2005. **42**(6): p. 513-8.
176. Blackstock, W.P. and M.P. Weir, *Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins*. *Trends Biotechnol*, 1999. **17**(3): p. 121-7.
177. Tyers, M. and M. Mann, *From genomics to proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 193-7.
178. Mann, M., R.C. Hendrickson, and A. Pandey, *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 437-73.
179. Archakov, A.I., et al., *AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics*. *Proteomics*, 2007. **7**(1): p. 4-9.
180. Fang, X. and W.W. Zhang, *Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis*. *J Proteomics*, 2008. **71**(3): p. 284-303.
181. Medzihradszky, K.F., et al., *Protein identification by in-gel digestion, high-performance liquid chromatography, and mass spectrometry: peptide analysis by complementary ionization techniques*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2001. **12**(2): p. 215-21.
182. Badock, V., et al., *Prefractionation of protein samples for proteome analysis using reversed-phase high-performance liquid chromatography*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(14): p. 2856-64.
183. Pieper, R., et al., *Multi-component immunoaffinity subtraction chromatography: an innovative step towards a comprehensive survey of the human plasma proteome*. *Proteomics*, 2003. **3**(4): p. 422-32.
184. Issaq, H.J., *The role of separation science in proteomics research*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(17): p. 3629-38.
185. Lesley, S.A., *High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world*. *Protein Expr Purif*, 2001. **22**(2): p. 159-64.
186. Griffin, T.J. and R. Aebersold, *Advances in proteome analysis by mass spectrometry*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(49): p. 45497-500.
187. Link, A.J., et al., *Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17**(7): p. 676-82.
188. Washburn, M.P., et al., *Analysis of quantitative proteomic data generated via multidimensional protein identification technology*. *Anal Chem*, 2002. **74**(7): p. 1650-7.
189. Wolters, D.A., M.P. Washburn, and J.R. Yates, 3rd, *An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics*. *Anal Chem*, 2001. **73**(23): p. 5683-90.
190. Wu, C.C. and M.J. MacCoss, *Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems*. *Curr Opin Mol Ther*, 2002. **4**(3): p. 242-50.
191. Haegler, K., et al., *QuantiSpec--Quantitative mass spectrometry data analysis of (15)N-metabolically labeled proteins*. *J Proteomics*, 2009. **71**(6): p. 601-8.
192. Ralhan, R., et al., *iTRAQ-multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry-based identification of potential biomarkers of oral epithelial dysplasia*

- and novel networks between inflammation and premalignancy. *J Proteome Res*, 2009. **8**(1): p. 300-9.
193. Ernoult, E., et al., *A proteomic approach for plasma biomarker discovery with iTRAQ labelling and OFFGEL fractionation*. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 927917.
194. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. *Nat Biotechnol*, 1999. **17**(10): p. 994-9.
195. Wiese, S., et al., *Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research*. *Proteomics*, 2007. **7**(3): p. 340-50.
196. Gan, C.S., et al., *Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(2): p. 821-7.
197. Gorg, A., W. Weiss, and M.J. Dunn, *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. *Proteomics*, 2004. **4**(12): p. 3665-85.
198. Gygi, S.P., et al., *Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(17): p. 9390-5.
199. Kenrick, K.G. and J. Margolis, *Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique*. *Anal Biochem*, 1970. **33**(1): p. 204-7.
200. Klose, J., *Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals*. *Humangenetik*, 1975. **26**(3): p. 231-43.
201. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
202. Bjellqvist, B., et al., *Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications*. *J Biochem Biophys Methods*, 1982. **6**(4): p. 317-39.
203. Gorg, A., W. Postel, and S. Gunther, *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. *Electrophoresis*, 1988. **9**(9): p. 531-46.
204. Marouga, R., S. David, and E. Hawkins, *The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology*. *Anal Bioanal Chem*, 2005. **382**(3): p. 669-78.
205. Unlu, M., M.E. Morgan, and J.S. Minden, *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(11): p. 2071-7.
206. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. *Nature*, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
207. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. *Science*, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
208. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. *Anal Chem*, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
209. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. *Chem Rev*, 2001. **101**(2): p. 269-95.
210. McLuckey, S.A., et al., *Ion trap mass spectrometry. Using high-pressure ionization*. *Anal Chem*, 1994. **66**(14): p. 737A-743A.
211. Cotter, R.J., *Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules*. *Anal Chem*, 1992. **64**(21): p. 1027A-1039A.
212. Medzihradsky, K.F., et al., *The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer*. *Anal Chem*, 2000. **72**(3): p. 552-8.
213. Shevchenko, A., et al., *MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research*. *Anal Chem*, 2000. **72**(9): p. 2132-41.

214. Le Blanc, J.C., et al., *Unique scanning capabilities of a new hybrid linear ion trap mass spectrometer (Q TRAP) used for high sensitivity proteomics applications*. *Proteomics*, 2003. **3**(6): p. 859-69.
215. Comisarow, M.B. and A.G. Marshall, *The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy*. *J Mass Spectrom*, 1996. **31**(6): p. 581-5.
216. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer*. *Mass Spectrom Rev*, 1998. **17**(1): p. 1-35.
217. Issaq, H.J., et al., *SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics*. *Anal Chem*, 2003. **75**(7): p. 148A-155A.
218. Merchant, M. and S.R. Weinberger, *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(6): p. 1164-77.
219. Clauser, K.R., P. Baker, and A.L. Burlingame, *Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching*. *Anal Chem*, 1999. **71**(14): p. 2871-82.
220. James, P., et al., *Protein identification in DNA databases by peptide mass fingerprinting*. *Protein Sci*, 1994. **3**(8): p. 1347-50.
221. Pappin, D.J., P. Hojrup, and A.J. Bleasby, *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*. *Curr Biol*, 1993. **3**(6): p. 327-32.
222. Perkins, D.N., et al., *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data*. *Electrophoresis*, 1999. **20**(18): p. 3551-67.
223. Zhang, W. and B.T. Chait, *ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information*. *Anal Chem*, 2000. **72**(11): p. 2482-9.
224. Biemann, K. and H.A. Scoble, *Characterization by tandem mass spectrometry of structural modifications in proteins*. *Science*, 1987. **237**(4818): p. 992-8.
225. Chernushevich, I.V., A.V. Loboda, and B.A. Thomson, *An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2001. **36**(8): p. 849-65.
226. Shevchenko, A., et al., *Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(25): p. 14440-5.
227. Biemann, K., *Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure*. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1988. **16**(1-12): p. 99-111.
228. Clauser, K.R., et al., *Rapid mass spectrometric peptide sequencing and mass matching for characterization of human melanoma proteins isolated by two-dimensional PAGE*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(11): p. 5072-6.
229. Pieper, R., et al., *The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins*. *Proteomics*, 2003. **3**(7): p. 1345-64.
230. Anderson, L. and N.G. Anderson, *High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(12): p. 5421-5.
231. Celis, J.E., et al., *The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways*. *Electrophoresis*, 1995. **16**(12): p. 2177-240.
232. Westermeier, R. and R. Marouga, *Protein detection methods in proteomics research*. *Biosci Rep*, 2005. **25**(1-2): p. 19-32.
233. Barderas, M.G., et al., *Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile*. *J Proteome Res*, 2007. **6**(2): p. 876-86.
234. Gallego-Delgado, J., et al., *Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy*. *J Proteome Res*, 2006. **5**(2): p. 404-13.



235. Lazaro, A., et al., *Analysis of antihypertensive drugs in the heart of animal models: a proteomic approach*. Methods Mol Biol, 2007. **357**: p. 45-58.
236. Alfonso, P., et al., *Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis*. Proteomics, 2005. **5**(10): p. 2602-11.
237. Huang, H.L., et al., *Biomarker discovery in breast cancer serum using 2-D differential gel electrophoresis/ MALDI-TOF/TOF and data validation by routine clinical assays*. Electrophoresis, 2006. **27**(8): p. 1641-50.
238. Mann, M. and O.N. Jensen, *Proteomic analysis of post-translational modifications*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 255-61.
239. Duran, M.C., et al., *Characterization of HSP27 phosphorylation sites in human atherosclerotic plaque secretome*. Methods Mol Biol, 2007. **357**: p. 151-63.
240. Figeys, D., *Functional proteomics: mapping protein-protein interactions and pathways*. Curr Opin Mol Ther, 2002. **4**(3): p. 210-5.
241. Yanagida, M., *Functional proteomics; current achievements*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **771**(1-2): p. 89-106.
242. Buey, R.M., et al., *Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(2): p. 117-25.
243. Bantscheff, M., et al., *Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(9): p. 1035-44.
244. Abdul-Salam, V.B., et al., *Identification of plasma protein biomarkers associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Proteomics, 2006. **6**(7): p. 2286-94.
245. Chaurand, P., et al., *New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry*. J Proteome Res, 2006. **5**(11): p. 2889-900.
246. Chaurand, P., S.A. Schwartz, and R.M. Caprioli, *Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections*. Curr Opin Chem Biol, 2002. **6**(5): p. 676-81.
247. Rabilloud, T., *Solubilization of proteins for electrophoretic analyses*. Electrophoresis, 1996. **17**(5): p. 813-29.
248. England, S. and S. Seifter, *Precipitation techniques*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 285-300.
249. Granier, F., *Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis*. Electrophoresis, 1988. **9**(11): p. 712-8.
250. Luche, S., V. Santoni, and T. Rabilloud, *Evaluation of nonionic and zwitterionic detergents as membrane protein solubilizers in two-dimensional electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**(3): p. 249-53.
251. Gorg, A., et al., *The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1037-53.
252. Sanchez, J.C., et al., *Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 324-7.
253. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
254. Gorg, A., et al., *Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations*. Electrophoresis, 1988. **9**(1): p. 37-46.
255. Rabilloud, T., *Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis*. Anal Chem, 2000. **72**(1): p. 48A-55A.
256. Sasse, J. and S.R. Gallagher, *Staining proteins in gels*. Curr Protoc Immunol, 2004. **Chapter 8**: p. Unit 8 9.
257. Patton, W.F., *A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1123-44.

258. Lopez, M.F., et al., *A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling*. Electrophoresis, 2000. **21**(17): p. 3673-83.
259. Dowsey, A.W., M.J. Dunn, and G.Z. Yang, *The role of bioinformatics in two-dimensional gel electrophoresis*. Proteomics, 2003. **3**(8): p. 1567-96.
260. Palagi, P.M., et al., *Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data*. Proteomics, 2006. **6**(20): p. 5435-44.
261. Karas, M., M. Gluckmann, and J. Schafer, *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*. J Mass Spectrom, 2000. **35**(1): p. 1-12.
262. Anderson, N.L. and N.G. Anderson, *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(11): p. 845-67.
263. Weston, A.D. and L. Hood, *Systems biology, proteomics, and the future of health care: toward predictive, preventative, and personalized medicine*. J Proteome Res, 2004. **3**(2): p. 179-96.
264. Vivanco, F., et al., *Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis*. J Proteome Res, 2005. **4**(4): p. 1181-91.
265. Tirumalai, R.S., et al., *Characterization of the low molecular weight human serum proteome*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(10): p. 1096-103.
266. Veenstra, T.D., et al., *Biomarkers: mining the biofluid proteome*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(4): p. 409-18.
267. Arab, S., et al., *Cardiovascular proteomics: tools to develop novel biomarkers and potential applications*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(9): p. 1733-41.
268. Paoletti, A.C., B. Zybailov, and M.P. Washburn, *Principles and applications of multidimensional protein identification technology*. Expert Rev Proteomics, 2004. **1**(3): p. 275-82.
269. Kislinger, T., et al., *Multidimensional protein identification technology (MudPIT): technical overview of a profiling method optimized for the comprehensive proteomic investigation of normal and diseased heart tissue*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(8): p. 1207-20.
270. Thadikkaran, L., et al., *Recent advances in blood-related proteomics*. Proteomics, 2005. **5**(12): p. 3019-34.
271. Yang, Z. and W.S. Hancock, *Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column*. J Chromatogr A, 2004. **1053**(1-2): p. 79-88.
272. Marshall, J., et al., *Human serum proteins pre-separated by electrophoresis or chromatography followed by tandem mass spectrometry*. J Proteome Res, 2004. **3**(3): p. 364-82.
273. Chromy, B.A., et al., *Proteomic analysis of human serum by two-dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins*. J Proteome Res, 2004. **3**(6): p. 1120-7.
274. Bjorhall, K., T. Miliotis, and P. Davidsson, *Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples*. Proteomics, 2005. **5**(1): p. 307-17.
275. Kim, H.O., T.D. Durance, and E.C. Li-Chan, *Reusability of avidin-biotinylated immunoglobulin Y columns in immunoaffinity chromatography*. Anal Biochem, 1999. **268**(2): p. 383-97.
276. Darde, V.M., M.G. Barderas, and F. Vivanco, *Depletion of high-abundance proteins in plasma by immunoaffinity subtraction for two-dimensional difference gel electrophoresis analysis*. Methods Mol Biol, 2007. **357**: p. 351-64.

277. Gomez-Diaz, C., et al., *Effect of dietary coenzyme Q and fatty acids on the antioxidant status of rat tissues*. Protoplasma, 2003. **221**(1-2): p. 11-7.
278. Santos-Gonzalez, M., et al., *Modifications of plasma proteome in long-lived rats fed on a coenzyme Q10-supplemented diet*. Exp Gerontol, 2007. **42**(8): p. 798-806.
279. Kontula, K., et al., *Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing*. Clin Chem, 1990. **36**(12): p. 2087-92.
280. Yang Z, H.W., *Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column*. J Chromatogr A. , 2004 **1053**: p. 79-88.
281. Echan, L.A., et al., *Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma*. Proteomics, 2005. **5**(13): p. 3292-303.
282. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
283. Ahmed, N., et al., *An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum*. Proteomics, 2003. **3**(10): p. 1980-7.
284. Wessel, D. and U.I. Flugge, *A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids*. Anal Biochem, 1984. **138**(1): p. 141-3.
285. Stessl, M., C.R. Noe, and B. Lachmann, *Influence of image-analysis software on quantitation of two-dimensional gel electrophoresis data*. Electrophoresis, 2009. **30**(2): p. 325-8.
286. Lass, A., S. Agarwal, and R.S. Sohal, *Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19199-204.
287. Sugiyama, S., K. Yamada, and T. Ozawa, *Preservation of mitochondrial respiratory function by coenzyme Q10 in aged rat skeletal muscle*. Biochem Mol Biol Int, 1995. **37**(6): p. 1111-20.
288. Kwong, L.K., et al., *Effects of coenzyme Q(10) administration on its tissue concentrations, mitochondrial oxidant generation, and oxidative stress in the rat*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(5): p. 627-38.
289. De Cabo, R., et al., *Calorie restriction attenuates age-related alterations in the plasma membrane antioxidant system in rat liver*. Exp Gerontol, 2004. **39**(3): p. 297-304.
290. Shaper, A.G., S.G. Wannamethee, and P.H. Whincup, *Serum albumin and risk of stroke, coronary heart disease, and mortality: the role of cigarette smoking*. J Clin Epidemiol, 2004. **57**(2): p. 195-202.
291. Chlebovska, K. and O. Chlebovsky, *Favourable effect of K, Mg aspartate on serum proteins in aging rats*. Mech Ageing Dev, 1999. **108**(2): p. 127-38.
292. Kim, J.W., et al., *Age-related changes in redox status of rat serum*. Arch Gerontol Geriatr, 2002. **34**(1): p. 9-17.
293. Stocker, R., V.W. Bowry, and B. Frei, *Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1646-50.
294. Bowry, V.W., et al., *Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5756-63.
295. Mohr, D., V.W. Bowry, and R. Stocker, *Dietary supplementation with coenzyme Q10 results in increased levels of ubiquinol-10 within circulating lipoproteins and increased resistance of human low-density lipoprotein to the initiation of lipid peroxidation*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1126**(3): p. 247-54.
296. Melamed-Frank, M., et al., *Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3693-8.

297. Tolosano, E., et al., *Defective recovery and severe renal damage after acute hemolysis in hemopexin-deficient mice*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3906-14.
298. Barnard, M.L., U. Muller-Eberhard, and J.F. Turrens, *Protective role of hemopexin on heme-dependent lung oxidative stress*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **192**(1): p. 82-7.
299. Cooke, N.E., *Rat vitamin D binding protein. Determination of the full-length primary structure from cloned cDNA*. J Biol Chem, 1986. **261**(7): p. 3441-50.
300. Haddad, J.G., *Plasma vitamin D-binding protein (Gc-globulin): multiple tasks*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53**(1-6): p. 579-82.
301. Fleet, J.C., *Molecular actions of vitamin D contributing to cancer prevention*. Mol Aspects Med, 2008. **29**(6): p. 388-96.
302. Ochoa, J.J., Quiles, J.L., Planells, E., López-Frías, M. *Proceedings of the 4th Conference of the International Coenzyme Q10 Association 2005*. Los Angeles, CA.
303. Basu, S., et al., *Association between oxidative stress and bone mineral density*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(1): p. 275-9.
304. Maggio, D., et al., *Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(4): p. 1523-7.
305. Wong, C.M., K.L. Siu, and D.Y. Jin, *Peroxiredoxin-null yeast cells are hypersensitive to oxidative stress and are genomically unstable*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23207-13.
306. Tolle, A., et al., *Vitamin E differentially regulates the expression of peroxiredoxin-1 and -6 in alveolar type II cells*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(10): p. 1401-8.
307. van Campenhout, A., et al., *Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus*. Free Radic Res, 2003. **37**(10): p. 1069-77.
308. Weinberg, E.D., *The role of iron in cancer*. Eur J Cancer Prev, 1996. **5**(1): p. 19-36.
309. Chan DC, W.G., *Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk*. QJM, 2006. **99**: p. 277-87.
310. Duverger N, K.H., Emmanuel F, *Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits*. 1996. **94**: p. 713-7.
311. Anderson, L., *Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease*. J Physiol, 2005. **563**(Pt 1): p. 23-60.
312. Aldred, S., et al., *Alpha tocopherol supplementation elevates plasma apolipoprotein A1 isoforms in normal healthy subjects*. Proteomics, 2006. **6**(5): p. 1695-703.
313. Utermann, G. and U. Beisiegel, *Apolipoprotein A-IV: a protein occurring in human mesenteric lymph chylomicrons and free in plasma. Isolation and quantification*. Eur J Biochem, 1979. **99**(2): p. 333-43.
314. Weisgraber, K.H., T.P. Bersot, and R.W. Mahley, *Isolation and characterization of an apoprotein from the d less than 1.006 lipoproteins of human and canine lymph homologous with the rat A-IV apoprotein*. Biochem Biophys Res Commun, 1978. **85**(1): p. 287-92.
315. Rodriguez, M.D., et al., *Rapid synthesis and secretion of intestinal apolipoprotein A-IV after gastric fat loading in rats*. Am J Physiol, 1997. **272**(4 Pt 2): p. R1170-7.
316. Stein, O., et al., *The role of apolipoprotein A-IV in reverse cholesterol transport studied with cultured cells and liposomes derived from an ether analog of phosphatidylcholine*. Biochim Biophys Acta, 1986. **878**(1): p. 7-13.
317. Steinmetz, A., et al., *Human apolipoprotein A-IV binds to apolipoprotein A-I/A-II receptor sites and promotes cholesterol efflux from adipose cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(14): p. 7859-63.
318. Steinmetz, A. and G. Utermann, *Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV*. J Biol Chem, 1985. **260**(4): p. 2258-64.

319. Duverger, N., et al., *Protection against atherogenesis in mice mediated by human apolipoprotein A-IV*. Science, 1996. **273**(5277): p. 966-8.
320. Ostos, M.A., et al., *Antioxidative and antiatherosclerotic effects of human apolipoprotein A-IV in apolipoprotein E-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(6): p. 1023-8.
321. Qin, X., et al., *Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 2): p. H1836-40.
322. Mahley RW, R.S., *Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein*. Annu Rev Genomics Hum Genet 2000. **1**: p. 507-37.
323. Davignon, J., *Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 267-9.
324. Thomas, S.R., et al., *Dietary cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q(10) inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E gene knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(4): p. 585-93.
325. Mooijaart, S.P., et al., *ApoE plasma levels and risk of cardiovascular mortality in old age*. PLoS Med, 2006. **3**(6): p. e176.
326. Koenig, W., *Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update*. Thromb Haemost, 2003. **89**(4): p. 601-9.
327. Yalcin, A., et al., *Coenzyme Q10 concentrations in coronary artery disease*. Clin Biochem, 2004. **37**(8): p. 706-9.
328. Lopez-Lira, F., et al., *The role of beta2-glycoprotein I (beta2GPI) in the activation of plasminogen*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1764**(4): p. 815-23.
329. Matsuura, E., et al., *Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis*. Prog Lipid Res, 2006. **45**(6): p. 466-86.
330. Schousboe, I., *beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway*. Blood, 1985. **66**(5): p. 1086-91.
331. Sheng, Y., et al., *Impaired thrombin generation in beta 2-glycoprotein I null mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13817-21.
332. Miyakis, S., B. Giannakopoulos, and S.A. Krilis, *Beta 2 glycoprotein I--function in health and disease*. Thromb Res, 2004. **114**(5-6): p. 335-46.
333. Yasuda, S., et al., *Nicked beta2-glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3766-72.
334. Colman, R.W. and A.H. Schmaier, *Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes*. Blood, 1997. **90**(10): p. 3819-43.
335. Isordia-Salas, I., et al., *[High molecular weight kininogen in inflammation and angiogenesis: a review of its properties and therapeutic applications]*. Rev Invest Clin, 2005. **57**(6): p. 802-13.
336. Asakura, S., et al., *Inhibition of cell adhesion by high molecular weight kininogen*. J Cell Biol, 1992. **116**(2): p. 465-76.
337. Chavakis, T., et al., *Inhibition of platelet adhesion and aggregation by a defined region (Gly-486-Lys-502) of high molecular weight kininogen*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23157-64.
338. Daveau, M., et al., *Hepatic and extra-hepatic transcription of inter-alpha-inhibitor family genes under normal or acute inflammatory conditions in rat*. Arch Biochem Biophys, 1998. **350**(2): p. 315-23.
339. Sandford, A.J., et al., *alpha1-antitrypsin genotypes and the acute-phase response to open heart surgery*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(5 Pt 1): p. 1624-8.
340. Wang, X.L., et al., *Cosupplementation with vitamin E and coenzyme Q10 reduces circulating markers of inflammation in baboons*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(3): p. 649-55.

341. Schmelzer, C., et al., *Functions of coenzyme Q10 in inflammation and gene expression*. Biofactors, 2008. **32**(1-4): p. 179-83.
342. Muller-Eberhard, H.J. and R.D. Schreiber, *Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement*. Adv Immunol, 1980. **29**: p. 1-53.
343. Binkert, C., et al., *Regulation of osteogenesis by fetuin*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28514-20.
344. Price, P.A., et al., *Serum levels of the fetuin-mineral complex correlate with artery calcification in the rat*. J Biol Chem, 2004. **279**(3): p. 1594-600.
345. Ix, J.H., et al., *Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study*. Circulation, 2006. **113**(14): p. 1760-7.
346. Quiles, J.L., et al., *Coenzyme Q addition to an n-6 PUFA-rich diet resembles benefits on age-related mitochondrial DNA deletion and oxidative stress of a MUFA-rich diet in rat heart*. Mech Ageing Dev, 2010. **131**(1): p. 38-47.
347. Moreno, J.A., J. Lopez-Miranda, and F. Perez-Jimenez, *[Influence of genetic and environmental factors on lipid metabolism and cardiovascular risk associated with the apoE gene]*. Med Clin (Barc), 2006. **127**(9): p. 343-51.
348. Duell PB, I.D., Connor WE, *Disorders of lipid metabolism*, ed. F.L. Felig P. 2001, New York Endocrinology and Metabolism 4th 993-1075.
349. Briviba K., a.S.H., *Nonenzymatic antioxidant defense systems*, in *Natural Antioxidants* B. Frei, Editor. 1994, Academic Press. : San Diego CA. p. 107-129.
350. Romagnoli A, O.A., Destito C, Iacocagni A, Marin AW, Littarru GP., *Protective role in vivo of coenzyme Q10 during reperfusion of ischemic limbs*. Mol Aspects Med., 1994. **15**: p. 177-85.
351. Ernster L, F.-A.P., *Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms*. Clin Investig., 1993. **71**: p. 60-5.
352. Frei B, K.M., Ames BN., *Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1990. **87**: p. 4879-83.
353. Forsmark-Andrée P, L.C., Dallner G, Ernster L., *Lipid peroxidation and changes in the ubiquinone content and the respiratory chain enzymes of submitochondrial particles*. Free Radic Biol Med., 1997. **22**: p. 391-400.
354. Napoli, C., F. de Nigris, and W. Palinski, *Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall*. J Cell Biochem, 2001. **82**(4): p. 674-82.
355. Thomas, S.R., J. Neuzil, and R. Stocker, *Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10. A protective mechanism for coenzyme Q in atherogenesis?* Mol Aspects Med, 1997. **18 Suppl**: p. S85-103.
356. Thomas, S.R., P.K. Witting, and R. Stocker, *A role for reduced coenzyme Q in atherosclerosis?* Biofactors, 1999. **9**(2-4): p. 207-24.
357. Hodgson, J.M., et al., *Coenzyme Q10 improves blood pressure and glycaemic control: a controlled trial in subjects with type 2 diabetes*. Eur J Clin Nutr, 2002. **56**(11): p. 1137-42.
358. Stoscheck, C.M., *Quantitation of protein*. Methods Enzymol, 1990. **182**: p. 50-68.
359. Jenne, D.E., et al., *Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 11030-6.
360. de Silva, H.V., et al., *Purification and characterization of apolipoprotein J*. J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14292-7.
361. French, L.E., et al., *Murine clusterin: molecular cloning and mRNA localization of a gene associated with epithelial differentiation processes during embryogenesis*. J Cell Biol, 1993. **122**(5): p. 1119-30.
362. White, P. and N. Cooke, *The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(8): p. 320-7.

363. Piquette CA, R.-H.R., Webster RO., *Human monocyte chemotaxis to complement-derived chemotaxins is enhanced by Gc-globulin*. J Leukoc Biol. , 1994. **55**: p. 349-54.
364. Van Lenten BJ, W.A., Navab M, Fogelman AM., *Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoI but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6*. J Biol Chem. , 2001. **276**: p. 1923-9.
365. Durrington, P.N., B. Mackness, and M.I. Mackness, *Paraoxonase and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(4): p. 473-80.
366. Azizi, F., et al., *Association of lipids, lipoproteins, apolipoproteins and paraoxonase enzyme activity with premature coronary artery disease*. Coron Artery Dis, 2002. **13**(1): p. 9-16.
367. Depre C, W.L., Sui X, Qiu H, Hong C, Hedhli N, Ginion A, Shah A, Pelat M, Bertrand L, Wagner T, Gaussin V, Vatner SF., *H11 kinase prevents myocardial infarction by preemptive preconditioning of the heart*. Circ Res. , 2006. **98**: p. 280-8.
368. Yavuz, D.G., et al., *Association of serum paraoxonase activity with insulin sensitivity and oxidative stress in hyperthyroid and TSH-suppressed nodular goitre patients*. Clin Endocrinol (Oxf), 2004. **61**(4): p. 515-21.
369. Bielli P, C.L., *Structure to function relationships in ceruloplasmin: a 'moonlighting' protein*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**: p. 1413-27.
370. Hellman, N.E. and J.D. Gitlin, *Ceruloplasmin metabolism and function*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 439-58.
371. Fox, P.L., C. Mukhopadhyay, and E. Ehrenwald, *Structure, oxidant activity, and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin*. Life Sci, 1995. **56**(21): p. 1749-58.
372. Shukla N, M.J., Masters J, Angelini GD, Jeremy JY., *Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?* Atherosclerosis., 2006. **187**: p. 238-50.
373. Fox, P.L., et al., *Ceruloplasmin and cardiovascular disease*. Free Radic Biol Med, 2000. **28**(12): p. 1735-44.
374. Gomaraschi, M., et al., *Structure and function of the apoA-IV T347S and Q360H common variants*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **393**(1): p. 126-30.
375. Mahley, R.W., *Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology*. Science, 1988. **240**(4852): p. 622-30.
376. Curtiss, L.K., *ApoE in atherosclerosis : a protein with multiple hats*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(8): p. 1852-3.
377. Raffai, R.L., S.M. Loeb, and K.H. Weisgraber, *Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 436-41.
378. Gearing, M., et al., *Regional variation in the distribution of apolipoprotein E and A beta in Alzheimer's disease*. J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(6): p. 833-41.
379. Weisgraber, K.H., A.D. Roses, and W.J. Strittmatter, *The role of apolipoprotein E in the nervous system*. Curr Opin Lipidol, 1994. **5**(2): p. 110-6.
380. Ramassamy, C., et al., *Impact of apoE deficiency on oxidative insults and antioxidant levels in the brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **86**(1-2): p. 76-83.
381. Kelso GJ, S.W., Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA., *Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma*. Biochemistry. , 1994. **33**: p. 832-9
382. Rosenberg, M.E. and J. Silkensen, *Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations*. Int J Biochem Cell Biol, 1995. **27**(7): p. 633-45.
383. Shannan, B., et al., *Clusterin and DNA repair: a new function in cancer for a key player in apoptosis and cell cycle control*. J Mol Histol, 2006. **37**(5-7): p. 183-8.

384. French LE, W.A., Sappino AP, Tschopp J, Schifferli JA., *Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death*. J Clin Invest. , 1994. **93**: p. 877-84.
385. Trougakos, I.P. and E.S. Gonos, *Functional analysis of clusterin/apolipoprotein J in cellular death induced by severe genotoxic stress*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1019**: p. 206-10.
386. Tschopp, J., et al., *Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9*. J Immunol, 1993. **151**(4): p. 2159-65.
387. Ishikawa, Y., et al., *Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(4): p. 665-72.
388. Millis, A.J., et al., *Clusterin regulates vascular smooth muscle cell nodule formation and migration*. J Cell Physiol, 2001. **186**(2): p. 210-9.
389. Miyata M, B.S., Kaieda H, Eto H, Orihara K, Kihara T, Obata H, Matsushita N, Matsuyama T, Tei C., *Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury*. Circulation. , 2001. **104**: p. 1407-12.
390. Kruskal, J.B., et al., *Fibrin and fibrinogen-related antigens in patients with stable and unstable coronary artery disease*. N Engl J Med, 1987. **317**(22): p. 1361-5.
391. Meade, T.W., et al., *The effect of physiological levels of fibrinogen on platelet aggregation*. Thromb Res, 1985. **38**(5): p. 527-34.
392. Ernst E, R.K., *Fibrinogen as a cardiovascular risk factor: a meta-analysis and review of the literature*. Ann Intern Med., 1993. **118**: p. 956-63.
393. Danesh J, L.S., Thompson SG, Lowe GD, Collins R, Kostis JB, Wilson AC, Folsom AR, Wu K, Benderly M, Goldbourt U, Willeit J, Kiechl S, Yarnell JW, Sweetnam PM, Elwood PC, Cushman M, Psaty BM, Tracy RP, Tybjaerg-Hansen A, Haverkate F, de Maat MP, Fowkes FG, Lee AJ, Smith FB, Salomaa V, Harald K, Rasi R, Vahtera E, Jousilahti P, Pekkanen J, D'Agostino R, Kannel WB, Wilson PW, Tofler G, Arocha-Piñango CL, Rodriguez-Larralde A, Nagy E, Mijares M, Espinosa R, Rodriguez-Roa E, Ryder E, Diez-Ewald MP, Campos G, Fernandez V, Torres E, Marchioli R, Valagussa F, Rosengren A, Wilhelmsen L, Lappas G, Eriksson H, Cremer P, Nagel D, Curb JD, Rodriguez B, Yano K, Salonen JT, Nyyssönen K, Tuomainen TP, Hedblad B, Lind P, Loewel H, Koenig W, Meade TW, Cooper JA, De Stavola B, Knottenbelt C, Miller GJ, Cooper JA, Bauer KA, Rosenberg RD, Sato S, Kitamura A, Naito Y, Palosuo T, Ducimetiere P, Amouyel P, Arveiler D, Evans AE, Ferrieres J, Juhan-Vague I, Bingham A, Schulte H, Assmann G, Cantin B, Lamarche B, Després JP, Dagenais GR, Tunstall-Pedoe H, Woodward M, Ben-Shlomo Y, Davey Smith G, Palmieri V, Yeh JL, Rudnicka A, Ridker P, Rodeghiero F, Tosetto A, Shepherd J, Ford I, Robertson M, Brunner E, Shipley M, Feskens EJ, Kromhout D, Dickinson A, Ireland B, Juzwishin K, Kaptoge S, Lewington S, Memon A, Sarwar N, Walker M, Wheeler J, White I, Wood A., *Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: an individual participant meta-analysis*. JAMA., 2005 **294**: p. 1799-809.
394. Lovely, R.S., et al., *Gamma' fibrinogen: evaluation of a new assay for study of associations with cardiovascular disease*. Clin Chem, 2010. **56**(5): p. 781-8.
395. Fuller, G.M. and Z. Zhang, *Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 469-79.
396. Carty CL, H.P., Heckbert SR, Jarvik GP, Lange LA, Cushman M, Tracy RP, Reiner AP., *Interaction between fibrinogen and IL-6 genetic variants and associations with cardiovascular disease risk in the Cardiovascular Health Study*. Ann Hum Genet. , 2010. **74**: p. 1-10.



397. Blajchman, M.A., *An overview of the mechanism of action of antithrombin and its inherited deficiency states*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1994. **5 Suppl 1**: p. S5-11; discussion S59-64.
398. Levi, M. and T. van der Poll, *Inflammation and coagulation*. Crit Care Med. **38**(2 Suppl): p. S26-34.
399. Swahn, E., H. von Schenck, and A.G. Olsson, *Omega-3 Ethyl Ester Concentrate Decreases Total Apolipoprotein CIII and Increases Antithrombin III in Postmyocardial Infarction Patients*. Clin Drug Investig, 1998. **15**(6): p. 473-82.
400. Perez-Jimenez, F., et al., *Circulating levels of endothelial function are modulated by dietary monounsaturated fat*. Atherosclerosis, 1999. **145**(2): p. 351-8.
401. Cacciapuoti, F., *Opposite effects of metabolic syndrome and calorie restriction on thrombotic disease: heads and tails of the same coin--resveratrol's role*. Metab Syndr Relat Disord, 2009. **7**(5): p. 397-400.
402. Vandekerckhove, J. and K. Weber, *Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins*. J Mol Biol, 1984. **179**(3): p. 391-413.
403. Korn, E.D., *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiol Rev, 1982. **62**(2): p. 672-737.
404. Dahl, B., *The extracellular actin scavenger system in trauma and major surgery. Clinical and experimental studies*. Acta Orthop Suppl, 2005. **76**(317): p. 2 p preceding table of contents-24.
405. Lind, S.E., et al., *Role of plasma gelsolin and the vitamin D-binding protein in clearing actin from the circulation*. J Clin Invest, 1986. **78**(3): p. 736-42.
406. Harper, K.D., et al., *Vitamin D binding protein sequesters monomeric actin in the circulation of the rat*. J Clin Invest, 1987. **79**(5): p. 1365-70.
407. Janmey, P.A., et al., *Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking*. Biochemistry, 1985. **24**(14): p. 3714-23.
408. Dahl B, S.F., Ott P, Gvozdenovic R, Yin HL, Lee WM., *Plasma gelsolin is reduced in trauma patients*. Shock. , 1999. **12**: p. 102-4.
409. Meier, U., et al., *Gc-globulin: roles in response to injury*. Clin Chem, 2006. **52**(7): p. 1247-53.
410. Coue, M. and E.D. Korn, *Interaction of plasma gelsolin with G-actin and F-actin in the presence and absence of calcium ions*. J Biol Chem, 1985. **260**(28): p. 15033-41.
411. Lee, W.M. and R.M. Galbraith, *The extracellular actin-scavenger system and actin toxicity*. N Engl J Med, 1992. **326**(20): p. 1335-41.
412. Goshima, M., et al., *Characterization of a novel Ras-binding protein Ce-FLI-1 comprising leucine-rich repeats and gelsolin-like domains*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 111-6.
413. Barkalow, K., et al., *Coordinated regulation of platelet actin filament barbed ends by gelsolin and capping protein*. J Cell Biol, 1996. **134**(2): p. 389-99.
414. Spinardi, L. and W. Witke, *Gelsolin and diseases*. Subcell Biochem, 2007. **45**: p. 55-69.
415. Kwiatkowski, D.J., *Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(1): p. 103-8.
416. Ito, H., et al., *Depression of plasma gelsolin level during acute liver injury*. Gastroenterology, 1992. **102**(5): p. 1686-92.
417. Mielnicki, L.M., et al., *Epigenetic regulation of gelsolin expression in human breast cancer cells*. Exp Cell Res, 1999. **249**(1): p. 161-76.
418. Fujita H, O.F., Hamada J, Hosokawa M, Moriuchi T, Koya RC, Kuzumaki N., *Gelsolin functions as a metastasis suppressor in B16-BL6 mouse melanoma cells and requirement of the carboxyl-terminus for its effect*. Int J Cancer. , 2001. **93**: p. 773-80.

419. Witke, W., et al., *Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin*. Cell, 1995. **81**(1): p. 41-51.
420. Aidinis V, C.P., Armaka M, Witke W, Harokopos V, Pavelka N, Koczan D, Argyropoulos C, Thwin MM, Möller S, Waki K, Gopalakrishnakone P, Ricciardi-Castagnoli P, Thiesen HJ, Hayashizaki Y, Kollias G., *Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis*. PLoS Genet., 2005 **1**: p. 48.
421. Gejyo, F., et al., *Characterization of the B-chain of human plasma alpha 2HS-glycoprotein. The complete amino acid sequence and primary structure of its heteroglycan*. J Biol Chem, 1983. **258**(8): p. 4966-71.
422. Triffitt, J.T., *Plasma proteins present in human cortical bone: enrichment of the alpha2HS-glycoprotein*. Calcif Tissue Res, 1976. **22**(1): p. 27-33.
423. Lebreton JP, J.F., Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G, *Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant*. J Clin Invest., 1979 **64**: p. 1118-29.
424. Haglund, A.C., B. Ek, and P. Ek, *Phosphorylation of human plasma alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein (human fetuin) in vivo*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 2): p. 437-45.
425. Jahnen-Dechent, W., et al., *Posttranslational processing of human alpha 2-HS glycoprotein (human fetuin). Evidence for the production of a phosphorylated single-chain form by hepatoma cells*. Eur J Biochem, 1994. **226**(1): p. 59-69.
426. Yoshida, Y., et al., *Suppressive effect of alpha2 Heremans-Schmid glycoprotein on in vitro calcification of osteogenesis*. Pediatr Int, 2006. **48**(1): p. 11-6.
427. Westenfeld, R., et al., *Fetuin-A protects against atherosclerotic calcification in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(6): p. 1264-74.
428. Yang, F., et al., *Alpha 2-HS-glycoprotein: expression in chondrocytes and augmentation of alkaline phosphatase and phospholipase A2 activity*. Bone, 1991. **12**(1): p. 7-15.
429. Lewis, J.G. and C.M. Andre, *Enhancement of human monocyte phagocytic function by alpha 2HS glycoprotein*. Immunology, 1981. **42**(3): p. 481-7.
430. Wang, H., et al., *Fetuin (alpha2-HS-glycoprotein) opsonizes cationic macrophage-deactivating molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(24): p. 14429-34.
431. Lehtinen, A.B., et al., *Association of alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein polymorphisms with subclinical atherosclerosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 345-52.
432. Wang, A.Y., et al., *Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(8): p. 1676-85.
433. Srinivas, P.R., et al., *Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(11): p. 1445-55.
434. Kaushik, S.V., et al., *Extended-release niacin decreases serum fetuin-A concentrations in individuals with metabolic syndrome*. Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25**(5): p. 427-34.
435. Ix, J.H., et al., *Fetuin-A and incident diabetes mellitus in older persons*. Jama, 2008. **300**(2): p. 182-8.
436. Koj, A., et al., *Synthesis of antithrombin III and alpha-1-antitrypsin by the perfused rat liver*. Biochim Biophys Acta, 1978. **539**(4): p. 496-504.
437. Mornex, J.F., et al., *Expression of the alpha-1-antitrypsin gene in mononuclear phagocytes of normal and alpha-1-antitrypsin-deficient individuals*. J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 1952-61.

438. Hu, C. and D.H. Perlmutter, *Regulation of alpha1-antitrypsin gene expression in human intestinal epithelial cell line caco-2 by HNF-1alpha and HNF-4*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 1): p. G1181-94.
439. Cichy, J., J. Potempa, and J. Travis, *Biosynthesis of alpha1-proteinase inhibitor by human lung-derived epithelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(13): p. 8250-5.
440. Brunt, P.W., *Antitrypsin and the liver*. Gut, 1974. **15**(7): p. 573-80.
441. Beatty, K., J. Bieth, and J. Travis, *Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin*. J Biol Chem, 1980. **255**(9): p. 3931-4.
442. Rao, N.V., et al., *Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties*. J Biol Chem, 1991. **266**(15): p. 9540-8.
443. Gooptu, B., U.I. Ekeowa, and D.A. Lomas, *Mechanisms of emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: molecular and cellular insights*. Eur Respir J, 2009. **34**(2): p. 475-88.
444. Fairbanks, K.D. and A.S. Tavill, *Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review*. Am J Gastroenterol, 2008. **103**(8): p. 2136-41; quiz 2142.
445. Talmud, P.J., et al., *Progression of atherosclerosis is associated with variation in the alpha1-antitrypsin gene*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 644-9.
446. Petrache, I., J. Hajjar, and M. Campos, *Safety and efficacy of alpha-1-antitrypsin augmentation therapy in the treatment of patients with alpha-1-antitrypsin deficiency*. Biologics, 2009. **3**: p. 193-204.
447. Abboud RT, F.G., Chapman KR., *Emphysema in alpha1-antitrypsin deficiency: does replacement therapy affect outcome?* Treat Respir Med., 2005. **4**: p. 1-8.
448. Akira S, I.H., Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T., *A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family*. EMBO J. , 1990. **9**: p. 1897-906.
449. Sandström CS, O.B., Melander O, Westin U, Mahadeva R, Janciauskiene S., *An association between Type 2 diabetes and alpha-antitrypsin deficiency*. Diabet Med, 2008 **25**: p. 1370-3.
450. Burghaus, B., et al., *Elevated alpha1-antitrypsin is a risk factor for arterial ischemic stroke in childhood*. Acta Haematol, 2006. **115**(3-4): p. 186-91.
451. Sifers, R.N., et al., *Elevated synthesis of human alpha 1-antitrypsin hinders the secretion of murine alpha 1-antitrypsin from hepatocytes of transgenic mice*. J Biol Chem, 1989. **264**(26): p. 15696-700.
452. Cichy, J., et al., *Stimulatory effect of inflammatory cytokines on alpha 1-antichymotrypsin expression in human lung-derived epithelial cells*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2729-33.
453. Rubin, H., et al., *Cloning, expression, purification, and biological activity of recombinant native and variant human alpha 1-antichymotrypsins*. J Biol Chem, 1990. **265**(2): p. 1199-207.
454. Lomas, D.A. and H. Parfrey, *Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology*. Thorax, 2004. **59**(6): p. 529-35.
455. Wei, A., et al., *Crystal structure of an uncleaved serpin reveals the conformation of an inhibitory reactive loop*. Nat Struct Biol, 1994. **1**(4): p. 251-8.
456. Berman G, A.S., Burnett D, Stockley RA., *Alpha 1-Antichymotrypsin in lung secretions is not an effective proteinase inhibitor*. J Biol Chem. , 1986. **261**: p. 14095-9.
457. Faber, J.P., et al., *The molecular basis of alpha 1-antichymotrypsin deficiency in a heterozygote with liver and lung disease*. J Hepatol, 1993. **18**(3): p. 313-21.

- 
- 
458. Banfi, C., et al., *Proteomic Analysis of Plasma from Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting Reveals a Protease/Antiprotease Imbalance in Favor of the Serpin alpha1-Antichymotrypsin*. J Proteome Res, 2010.
459. Shirai, R., et al., *Up-regulation of the expression of leucine-rich [alpha]2-glycoprotein in hepatocytes by the mediators of acute-phase response*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2009. **382**(4): p. 776-779.
460. Serada S, F.M., Ogata A, Terabe F, Hirano T, Iijima H, Shinzaki S, Nishikawa T, Ohkawara T, Iwahori K, Ohguro N, Kishimoto T, Naka T., *iTRAQ-based proteomic identification of leucine-rich alpha-2 glycoprotein as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases*. Ann Rheum Dis. , 2010. **69**: p. 770-4.
461. Kentsis A, L.Y., Kurek K, Calicchio M, Wang YY, Monigatti F, Campagne F, Lee R, Horwitz B, Steen H, Bachur R., *Discovery and validation of urine markers of acute pediatric appendicitis using high-accuracy mass spectrometry*. Ann Emerg Med., 2010 **55**: p. 62-70.
462. Zhang, J., et al., *Potential diagnostic biomarkers in serum of idiopathic pulmonary arterial hypertension*. Respir Med, 2009. **103**(12): p. 1801-6.
463. Lopez JA, C.D., Fujikawa K, Hagen FS, Davie EW, Roth GJ., *The alpha and beta chains of human platelet glycoprotein Ib are both transmembrane proteins containing a leucine-rich amino acid sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A. , 1988. **85**: p. 2135-9.
464. Cummings, C., et al., *Serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1 binds cytochrome c and inhibits antibody detection of this apoptotic marker in enzyme-linked immunosorbent assay*. Apoptosis, 2006. **11**(7): p. 1121-9.
465. Codina, R., et al., *Cytochrome c-induced lymphocyte death from the outside in: inhibition by serum leucine-rich alpha-2-glycoprotein-1*. Apoptosis, 2010. **15**(2): p. 139-52.
466. Lynn C. O'Donnell, L.J.D.a.B.R.A., *Molecular characterization and expression analysis of leucine-rich 2-glycoprotein, a novel marker of granulocytic differentiation* Journal of Leukocyte Biology. , 2002. **72**: p. 478-485.
467. Kakisaka, T., et al., *Plasma proteomics of pancreatic cancer patients by multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): up-regulation of leucine-rich alpha-2-glycoprotein in pancreatic cancer*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **852**(1-2): p. 257-67.
468. Clyne, B. and J.S. Olshaker, *The C-reactive protein*. J Emerg Med, 1999. **17**(6): p. 1019-25.
469. Eisenhardt SU, H.J., Peter K., *Monomeric C-reactive protein generation on activated platelets: the missing link between inflammation and atherothrombotic risk*. Trends Cardiovasc Med., 2009. **19**: p. 232-7.
470. Khreiss, T., et al., *Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood*. Circulation, 2004. **110**(17): p. 2713-20.
471. Kaluzny, M., et al., *The role of fibrinogen and CRP in cardiovascular risk in patients with acromegaly*. Endokrynol Pol, 2010. **61**(1): p. 83-8.
472. Muller-Eberhard, H.J., *Molecular organization and function of the complement system*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 321-47.
473. Lambris, J.D., K.B. Reid, and J.E. Volanakis, *The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement*. Immunol Today, 1999. **20**(5): p. 207-11.
474. Shernan, S.K. and C.D. Collard, *Role of the complement system in ischaemic heart disease: potential for pharmacological intervention*. BioDrugs, 2001. **15**(9): p. 595-607.
475. Akerstrom, B., D.R. Flower, and J.P. Salier, *Lipocalins: unity in diversity*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 1-8.

476. Akerstrom, B., et al., *alpha(1)-Microglobulin: a yellow-brown lipocalin*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 172-84.
477. Penders, J. and J.R. Delanghe, *Alpha 1-microglobulin: clinical laboratory aspects and applications*. Clin Chim Acta, 2004. **346**(2): p. 107-18.
478. Falkenberg, C., et al., *Isolation and characterization of fibronectin-alpha 1-microglobulin complex in rat plasma*. Biochem J, 1994. **301 ( Pt 3)**: p. 745-51.
479. McKeehan, W.L., et al., *Two apparent human endothelial cell growth factors from human hepatoma cells are tumor-associated proteinase inhibitors*. J Biol Chem, 1986. **261**(12): p. 5378-83.
480. Zhuo, L., et al., *Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 7693-6.
481. Fries, E. and A. Kaczmarczyk, *Inter-alpha-inhibitor, hyaluronan and inflammation*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(3): p. 735-42.
482. Mataix, J., *Aceite de Oliva Virgen: nuestro patrimonio alimentario*. 2001.
483. Schmelzer, C., et al., *In Vitro Effects of the Reduced Form of Coenzyme Q(10) on Secretion Levels of TNF-alpha and Chemokines in Response to LPS in the Human Monocytic Cell Line THP-1*. J Clin Biochem Nutr, 2009. **44**(1): p. 62-6.
484. Abbas, A.B.L.A.H., *Antigen capture and presentation to lymphocytes*, in *Basic Immunology. Functions and disorders of the immune system*, S.E. 3rd edición, Editor. 2009.