

EFFECTOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN
EXTRA CON ALTO CONTENIDO EN
COMPUESTOS FENÓLICOS SOBRE LA
EXPRESIÓN GÉNICA Y LA FUNCIÓN
ENDOTELIAL EN PACIENTES CON ALTO
RIESGO CARDIOVASCULAR

Ana Isabel Jiménez Morales

Córdoba, 1 de marzo de 2012

TÍTULO: Efectos del aceite de oliva virgen extra con alto contenido en compuestos fenólicos sobre la expresión génica y la función endotelial en pacientes con alto riesgo cardiovascular

AUTOR: Ana Isabel Jiménez Morales

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2012
Campus de Rabanales Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

DON FRANCISCO PÉREZ JIMÉNEZ, CATEDRÁTICO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD CÓRDOBA Y DIRECTOR CIENTÍFICO DEL IMIBIC.

DON JUAN ALBERTO RUANO RUIZ, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Hacemos constar:

Que el trabajo titulado “Efectos del aceite de oliva virgen extra con alto contenido en compuestos fenólicos sobre la expresión génica y la función endotelial en pacientes con alto riesgo cardiovascular” ha sido realizado por Doña Ana Isabel Jiménez Morales, bajo nuestra dirección, en la Unidad de Investigación de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía/ Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

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

Córdoba, 1 de marzo de 2012

Fdo.: Prof. Dr. Francisco Pérez Jiménez

Fdo.: Dr. Juan Alberto Ruano Ruiz

Gracias a la vida, que me ha dado tanto...

A Juan

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a que este trabajo sea una realidad:

A Francisco Pérez Jiménez, por confiar en mí sin apenas conocerme, abrirme las puertas de la investigación, enseñarme los valores de la excelencia en el trabajo y por alentarme a continuar. Con cada una de sus críticas y correcciones, siempre acertadas, ha contribuido a mi crecimiento personal y profesional. Una referencia a seguir.

A Juan Ruano Ruiz, sin duda la persona más brillante que jamás he conocido. Ejemplo de trabajo, abnegación, honestidad, inteligencia y un sinfín más de virtudes. Me ha proporcionado las herramientas necesarias para caminar por un mundo nuevo y tener inquietudes, pero ante todo gracias por ser mi amigo.

A mis compañeros del laboratorio, por hacer más livianas las horas de trabajo, y en especial a Antonio Camargo, quien me enseñó todos los trucos del “cacharreo” y a Juan Fernandez por los buenos ratos durante las intervenciones.

A mis compañeros de Medicina Interna, adjuntos y residentes, que son los que hacen que disfrute de mi trabajo y de los que aprendo constantemente.

A Nieves y a Cristina, con quien he compartido risas y llantos y con las que siempre he podido contar.

A Beatriz y Álvaro, por todas las horas robadas.

A mi familia, por moldearme como soy, por inculcarme el afán de superación y el inconformismo, por no dudar nunca de mí y por apoyar incondicionalmente mis decisiones. Gracias papá, mamá, hermanito y abu.

A Juan, el motor de mi existencia, el mejor compañero del mundo para esta fantástica aventura que es la vida. Por tirar de mí cuando yo frenaba, calmarme cuando me lanzaba, por levantarme cuando me caía y por cuidarme mucho y muy bien. Sin tí nada tendría sentido.

A todos vosotros

Gracias

Índice

Índice general

1.	Resumen	VII
2.	Introducción	5
2.1.	Alimentación y salud cardiovascular.	5
2.1.1.	La Dieta mediterránea como modelo de alimentación cardiosaludable.	5
2.1.2.	Beneficios para la salud cardiovascular del aceite de oliva virgen: efectos biológicos y mecanismos de acción molecular.	7
2.2.	El Síndrome Metabólico.	25
2.2.1.	Concepto.	25
2.2.2.	El estilo de vida como causa del inicio y el mantenimiento del SMet.	27
2.2.3.	El tejido adiposo disfuncionante como origen del estado inflamatorio persistente del SMet.	29
2.2.4.	Genética poblacional, epigenética y biología de sistemas.	34
2.2.5.	Disfunción endotelial como marcador precoz de la enfermedad cardiovascular en el SMet.	40
2.3.	Función endotelial	43
2.3.1.	Estructura y funciones del endotelio arterial.	43
2.3.2.	Técnicas para medir la vasodilatación mediada por el endotelio.	45

2.3.3.	Óxido nítrico y función endotelial.	54
2.3.4.	Influencia de la alimentación sobre la función endotelial.	56
2.3.5.	Influencia de la variabilidad genética sobre la función endotelial: análisis de polimorfismos genéticos de NOS.	59
2.4.	Análisis de alto rendimiento y métodos computacionales en Nutrigenómica	65
2.4.1.	<i>Microarrays</i> de expresión génica.	65
2.4.2.	<i>Microarrays</i> de expresión génica en investigación nutricional.	77
2.4.3.	Métodos predictivos en el estudio de la regulación génica.	78
3.	Hipótesis	85
4.	Objetivos	89
5.	Diseño y metodología	93
5.1.	Criterios de inclusión y exclusión.	93
5.2.	Intervención alimentaria.	95
5.3.	Concentración postprandial de marcadores inflamatorios, del metabolismo glucídico y lipídico.	100
5.4.	Análisis del genotipo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) sobre la vasodilatación mediada por el endotelio.	101
5.5.	Análisis de la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica.	105
5.6.	Predicción de dianas y análisis de enriquecimiento para sitios de unión de Factores de Transcripción y microRNAs.	111
5.7.	Aspectos éticos.	114
5.8.	Procesamiento general de los datos y análisis estadístico.	114
6.	Resultados	119
6.1.	Características de la población estudiada.	119

6.1.1.	Características demográficas y clínicas	119
6.2.	Intervención alimentaria.	119
6.3.	Efecto del aceite de oliva virgen con diferente contenido en fenoles sobre la respuesta inflamatoria y metabolismo energético postprandial.	121
6.4.	Efecto del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) so- bre la respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio tras la ingesta de aceite de oliva virgen con diferente con- tenido en fenoles.	125
6.5.	Análisis de expresión génica en células mononucleares de sangre periférica.	134
6.6.	Predicción de dianas y análisis de enriquecimiento para sitios de unión para TF y miRNAs	145
7.	Discusión	157
8.	Conclusiones	175
9.	Nomenclatura	177
10.	Bibliografía	185
11.	Anexos	235

Resumen

1. Resumen

Introducción: Los pacientes con SMet presentan mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que la población general. El estado de inflamación crónica de bajo grado condiciona la aparición precoz de disfunción endotelial. La ingesta de aceite de oliva virgen podría mejorar esa alteración gracias a los efectos antioxidante, antitrombótico y antiinflamatorio que han demostrado sus componentes minoritarios, especialmente los compuestos fenólicos. Además de la capacidad antioxidante de dichos micronutrientes, no se conoce bien si esos beneficios podrían estar sujetos a mecanismos más específicos a nivel celular.

Hipótesis de trabajo: Determinados genes podrían estar implicados en la mejoría de la función endotelial observada al consumir aceite de oliva virgen, considerando que dicha relación, entre genes y aceite de oliva podría tener naturaleza bidireccional. Así, determinados polimorfismos genéticos condicionarían cierta variabilidad en el beneficio observado y, a su vez, dichos compuestos podrían ejercer su acción a través de la modificación de expresión de genes cuyas proteínas participan en la disfunción del endotelio.

Objetivos: 1.- Principal: Analizar si el polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) condiciona diferencias en la respuesta vasodilatadora tras la ingesta de aceite de oliva con diferente concentración de compuestos fenólicos. 2.- Secundarios: 2.1.-Evaluar si los cambios existentes en la respuesta vasodilatadora endotelial se asocian a cambios en la concentración de eNOS y de NO(x), la riqueza en compuestos fenólicos del aceite o las variantes polimórficas de NOS3 Glu298Asp (rs1799983). 2.2.-Determinar si existen diferencias en la expresión génica tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos. 2.3.-Investigar, mediante herramientas computacionales, elementos reguladores potencialmente involucrados en los cambios de expresión génica observados.

Población, diseño y metodología: 57 pacientes con SMet recibieron tres desayunos basados en aceite de oliva con diferente contenido en compuestos fenólicos. Se midieron varios parámetros de la función endotelial [iABC, pico y máximo de la hiperemia reactiva post isquemia (PORH)] mediante láser Doppler, así como las concentraciones plasmáticas de NO(x) y eNOS en ayunas y durante el periodo postprandial. En 20 de esos pacientes, se llevaron a cabo experimentos con *microarrays* de expresión génica a partir de células mononucleares de sangre periférica, tras la ingesta de aceite con alto y bajo contenido en compuestos fenólicos. Posteriormente se realizó un análisis de predicción de sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) y potenciales dianas de microRNAs (miRNAs) en la serie de genes diferencialmente expresados.

Resultados: 1.-Descubrimos una interacción gen-dieta para la respuesta postprandial de la PORHmax ($p=0,039$) y NO(x) ($p=0,043$). Las personas con

genotipo TT mostraron valores menores de eNOS, NO(x) y PORHmax, en comparación con los sujetos con genotipo GG y GT, especialmente en las medidas postprandiales (todas $p < 0,05$). Estas diferencias se atenuaban cuando se consumía el aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. 2.-Encontramos 98 genes diferencialmente expresados al comparar la ingesta de aceites con diferente concentración en compuestos fenólicos. Muchos de estos genes, relacionados con la obesidad, hipertensión, alteraciones en el metabolismo lipídico, DM tipo 2 y enfermedad coronaria, codifican proteínas que participan en rutas metabólicas como factor de transcripción NF- κ B, complejo del factor de transcripción activador de proteína 1 (AP-1), citoquinas o protein quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). 3.-Observamos una mayor frecuencia de potenciales sitios de unión para los factores de transcripción NF- κ B, FOXQ1 y SRF, y menor frecuencia para las secuencias reguladoras predichas para PPAR γ -RXR α y NHLH1 en aquellos genes cuya expresión se reprimía tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos.

Conclusiones: Nuestro trabajo describe, por primera vez, un efecto de interacción entre el aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos y un polimorfismo del gen que codifica una de las enzimas más importantes de la homeostasis del endotelio. Los pacientes con genotipo TT del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) muestran una respuesta vascular disminuida en comparación con los que tienen los genotipos GT o GG, hecho que es parcialmente compensado tras la ingesta de aceite de oliva virgen extra con alto contenido en compuestos fenólicos. Parte de estos efectos podrían estar mediados por modificaciones en la expresión de genes relacionados con rutas metabólicas vinculadas con la inflamación y la regulación del ciclo celular y regulados de forma compleja por un conjunto de factores de transcripción y miRNAs, si bien esta última conclusión no deja de ser una hipótesis que tendrá que ser sometida a prueba en futuros experimentos.

Este trabajo ha sido financiado con fondos AGR 922 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (a Francisco Pérez Jimenez); Ayuda 06/0129 (a Francisco Pérez Jimenez) y 0040/07 (a Juan Ruano) de la Consejería de Salud, Junta de Andalucía; Ayuda REF 200500253 del Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud (a Francisco Pérez Jimenez); y la Diputación Provincial de Córdoba, Agencia para el Aceite de Oliva y la Universidad de Córdoba. El trabajo ha sido financiado también en parte por fondos de investigación del Ministerio de Sanidad (Beca CB06/03/0047), Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, (a Francisco Pérez Jimenez) y a la Fundación Biomédica de Córdoba. Este trabajo carece de conflicto de intereses.

Introducción

2. Introducción

2.1. Alimentación y salud cardiovascular.

2.1.1. La Dieta mediterránea como modelo de alimentación cardiovascularmente saludable.

Diversos estudios ecológicos llevados a cabo entre 1950 y 1960, tales como el *Seven Countries Study*, el *Rockefeller Foundation Study* y el trabajo de la *European Atomic Energy Commission*, mostraron que existía relación entre ciertos patrones de alimentación y una mayor esperanza de vida, así como menor tasa de enfermedad cardiovascular y ciertos tipos de cáncer. Desde entonces, la investigación acerca de la repercusión que sobre la salud humana pueden ejercer los diferentes hábitos de alimentación ha sido muy fructífera. Se han obtenido abundantes datos científicos que confirman que existe un efecto beneficioso cuando las personas siguen un modelo de alimentación similar al de la Dieta mediterránea (DMed), en contraposición al modelo tradicional existente en países de Norteamérica y el norte de Europa, rico en grasas saturadas. El modelo de DMed no es el único con efectos beneficiosos para la salud, sino que comparte esta característica con otros patrones de alimentación existentes en el mundo como el modelo Indú o el modelo vegetariano, teniendo todos ellos en común un consumo alto de cereales, frutos secos, verduras y frutas, moderado de huevos, leche y derivados así como una menor o nula ingesta de grasas saturadas y carne.

En nuestro entorno, el modelo de DMed ha constituido durante décadas el paradigma de estilo de alimentación saludable. El término se definió en 1995 en la Conferencia Internacional de Dietas del Mediterráneo como “el patrón dietético hallado en los países mediterráneos de zonas de crecimiento de olivos caracterizado por un elevado consumo de aceite de oliva, elevado consumo de legumbres, cereales no refinados, frutas, vegetales, moderado consumo de productos diarios la mayoría en forma de queso y yogur y moderado a elevado consumo de pescado junto con un bajo consumo de carne y productos cárnicos

y moderado de vino” [1]. En el transcurso de las últimas décadas se han obtenido numerosos resultados científicos que lo avalan como saludable. De este modo, en varios estudios observacionales se ha comprobado que un alto grado de adherencia a dicho patrón se asocia a mayor longevidad [2], a menor morbilidad y mortalidad global [3] así como a una menor incidencia de factores de riesgo cardiovascular (RCV) [4], enfermedad cardiovascular [5] y menor estrés oxidativo postprandial[6]. Además, las poblaciones que siguen dicho patrón de alimentación tienen menor incidencia de diabetes mellitus (DM) [7], de algunos tipos de cáncer [8] y de deterioro cognitivo asociado a la edad [9, 10], en comparación con otros modelos [11]. Estos resultados han sido respaldados por un reciente metaanálisis que mostró cómo la modificación a largo plazo de factores de riesgo cardiovascular y de marcadores de inflamación es mayor cuando se sigue un modelo de alimentación tipo DMed en comparación con modelos pobres en grasa y ricos en hidratos de carbono [12].

En las décadas de los 60-70, los investigadores se centraron en explorar, a través de estudios ecológicos y observacionales, qué factores clínicos o analíticos podían estar implicados en la aparición de dichos efectos saludables. El principal resultado fue comprobar que existía una correlación positiva entre la concentración plasmática de colesterol y la mortalidad cardiovascular, de modo que un menor consumo de grasas saturadas junto a una mayor ingesta de ácidos grasos monoinsaturados (AGM), principalmente procedentes del aceite de oliva, o poliinsaturados (AGP) se asociaba a menores concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT) y colesterol LDL (LDLc), junto a concentraciones de colesterol HDL (HDLc) estables o ligeramente elevadas, y ésto, a su vez, iba acompañado de 2 a 4 veces menos mortalidad por enfermedad cardiovascular con respecto al modelo occidental. De este modo, quedó establecida la importancia de la relación entre un alto consumo de grasas saturadas y elevadas concentraciones de colesterol en sangre con la enfermedad cardiovascular. Posteriormente, los resultados del *Seven Countries Study* y el WHO-MONICA mostraron la asociación de concentraciones altas de colesterol en plasma con

otros factores como el consumo de tabaco, la obesidad, la hipertensión arterial y un bajo aporte de antioxidantes en la dieta [13].

Desde entonces se han llevado a cabo diferentes estudios prospectivos con el objetivo de definir mejor qué alimentos, nutrientes y micronutrientes serían responsables de dichos efectos saludables. En el estudio AIRGENE, las personas que siguieron un patrón de alimentación tipo DMed redujeron las concentraciones plasmáticas de diversos marcadores inflamatorios que se elevan tras sufrir un infarto de miocardio [14]. Por otra parte, en los estudios PREDIMED y SUN se ha constatado que se produce una reducción del riesgo de DM tipo 2 [15] y de las concentraciones plasmáticas de marcadores inflamatorios [16], mejoría en la calidad de vida [17] y reducción de los trastornos depresivos [18] en las personas que siguen estos hábitos de alimentación. Sin embargo, son escasos los estudios de intervención aleatorizados que investigan los efectos sobre la salud a largo plazo de la DMed. En prevención secundaria tan sólo el *Lyon Heart Diet* ha demostrado que seguir un patrón de alimentación tipo DMed conduce a una reducción del riesgo de cardiopatía isquémica (CI) [19], si bien hay que considerar que en este trabajo se utilizó mantequilla de canola como fuente de ácidos grasos monoinsaturados además del aceite de oliva típico de este patrón dietético. En la actualidad nuestro grupo está llevando a cabo el estudio de intervención CordioPrev¹, en el que se evaluará de forma aleatorizada y controlada, la capacidad del modelo de DMed de prevenir la aparición tanto de nuevos episodios coronarios como de muerte y otras formas de manifestación de la enfermedad cardiovascular en pacientes que ya han presentado un evento coronario.

2.1.2. Beneficios para la salud cardiovascular del aceite de oliva virgen: efectos biológicos y mecanismos de acción molecular.

Composición del aceite de oliva virgen. El aceite de oliva virgen extra (EVOO) constituye el componente graso mayoritario y uno de los tres pilares distintivos, junto con el pan y el vino, del modelo de DMed. Está compuesto

¹ClinicalTrials.govIdentifier:NCT00924937

MICRONUTRIENTES DEL ACEITE DE OLIVA	
Hidrocarburos	Escualeno
Tocoferoles	Carotenoides y clorofilas Alfa, Beta y gamma tocoferol
Aromatizantes	Hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes, cetonas, éteres y ésteres y derivados de tioterpeno y furano (hexanal, nonanal, 1-hexanol, 2--4 decadienal)
Estenoles y esteroides	Betasitosterol, campesterol y estigmasterol
Compuestos fenólicos	Ácidos fenólicos simples, socoiroides, flavonoides y lignanos
Taninos	Ácido tánico

Figura 1. Micronutrientes del aceite de oliva.

de dos grandes fracciones. La fracción saponificable comprende el 98-99% del peso y de la que forman parte triglicéridos (TG), fosfolípidos y ácidos grasos libres, especialmente ácido oleico, seguido de ácido palmítico y ácido linoléico, además de otros ácidos grasos en concentración de trazas, como el margárico o el esteárico. El aceite de oliva es único, si consideramos su elevada cantidad de ácido oleico, ya que la mayoría de aceites de semillas están compuestos fundamentalmente por AGP incluyendo el ácido linoleico, ácido graso esencial n-6. Comparado con éstos, el ácido oleico, al ser monoinsaturado, es menos susceptible a la oxidación, lo que repercute en una mayor estabilidad del aceite durante su conservación [20].

A pesar de que la fracción insaponificable representa tan sólo el 1-2% del peso del aceite, este hecho diferencia al aceite de oliva virgen de otros tipos de aceite, tanto los refinados como aquellos que son obtenidos a partir de semillas (soja, girasol, colza). Esta fracción contiene una gran variedad de moléculas de naturaleza orgánica y de pequeño peso molecular, conocidas como componentes minoritarios del aceite de oliva o micronutrientes. Entre ellos destacamos, por existir mayor documentación sobre su función biológica en el ser humano, el grupo de hidrocarburos constituido por escualeno, carotenoides y clorofila, el de los tocoferoles (alfa, beta y gamma tocoferol), así como los grupos de aromatizantes, estanoles/esteroides, terpenos y compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos presentan en la estructura molecular un grupo fenol, un anillo aromático y, al menos, un grupo funcional hidroxilo. Dentro de este grupo se conocen, a su vez, los fenoles simples [hidroxitirosol (HT), tirosol (T) y los ácidos cafeico, cumárico, gálico y vanílico], secoiroides (oleuropeina, oleocantal y ligstrósido), flavonoides (apegenina, luteolina) y lignanos (pinoresinol y acetopinoresinol) [21](**Figura 2**). La principal característica de este grupo de micronutrientes es la gran capacidad antioxidante que han demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* [21, 22]. La oleuropeina es precursora de HT y T, dos de los compuestos fenólicos biológicamente más activos y sobre los que se han descrito más efectos beneficiosos, tanto en ayunas como en el periodo postprandial tras el consumo de aceite de oliva virgen, ya sea de forma puntual o a largo plazo [23, 24].

Sin embargo, la concentración y proporción de los diferentes compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen no es constante. Depende de múltiples factores como la variedad de aceituna, las características del terreno donde crece el olivo, la forma de extracción del aceite, la forma de conservación y almacenamiento del mismo [25, 26]. Estos factores modifican las condiciones del estado redox de la aceituna en el olivo, poniendo en marcha los mecanismos que ésta tiene para defenderse de factores prooxidantes habituales como la alta temperatura o la radiación ultravioleta propios del clima mediterráneo. Estos compuestos, que se deterioran con la luz y la exposición al aire, aceleran su autooxidación tras la caída del árbol y en el proceso de producción de los aceites. Tan sólo el EVOO, que es el que procede de la primera prensa de la aceituna, es el que tiene la máxima concentración de dichos compuestos minoritarios, en comparación con otros aceites como el aceite virgen y el aceite refinado, para cuya obtención se siguen procesos que utilizan fuentes de calor o disolventes que los eliminan del producto final.

Efectos biológicos del aceite de oliva virgen.

Efectos antioxidantes.

COMPUESTOS FENÓLICOS	
Ácidos fenólicos simples	Hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico y ácido vainílico
Secoiroides	Oleuropeina, oleocantal, ligstrósido
Flavonoides	Apigenina, luteolina
Lignanos	Pinoresinol, 1-acetopinoresinol

Figura 2. Compuestos fenólicos

■ **En situación de ayunas.**

En muchos trabajos, los efectos beneficiosos del aceite de oliva se evalúan en situación de ayunas tras un periodo de ingesta diaria continuada que oscila entre semanas a meses. En 1999 se publicó en España el primer estudio de intervención que evaluó, siguiendo un diseño aleatorizado, secuencial y cruzado, en pacientes con enfermedad arterial periférica, el efecto sobre la oxidabilidad de las LDL y su captación por macrófagos después del consumo durante 3 meses aceite de oliva virgen en comparación con aceite refinado. Se observó un mayor tiempo de latencia y una menor captación de LDL por los macrófagos tras la ingesta del aceite de oliva virgen [28]. Dos años más tarde, en un estudio de intervención aleatorizado, controlado y cruzado realizado en Holanda con voluntarios sanos, no se observaron diferencias en la oxidabilidad de las partículas de LDL (*lag time* y la formación de dienos), lipoperóxidos, carbonilos proteicos ni en la capacidad antioxidante del plasma tras la ingesta durante 3 semanas de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos (HPOO) en comparación con otro aceite de oliva con bajo contenido (LPOO) en dichas sustancias [29]. Un resultado similar fue obtenido en Grecia por Moschandreas y cols. quienes llevaron a cabo un estudio de intervención aleatorizado, controlado, cruzado y simple ciego, en este caso en voluntarios sanos fumadores [30].

Sin embargo, estos desalentadores intentos de demostrar los efectos antioxidantes de la fracción fenólica del aceite de oliva dieron paso a otros estudios

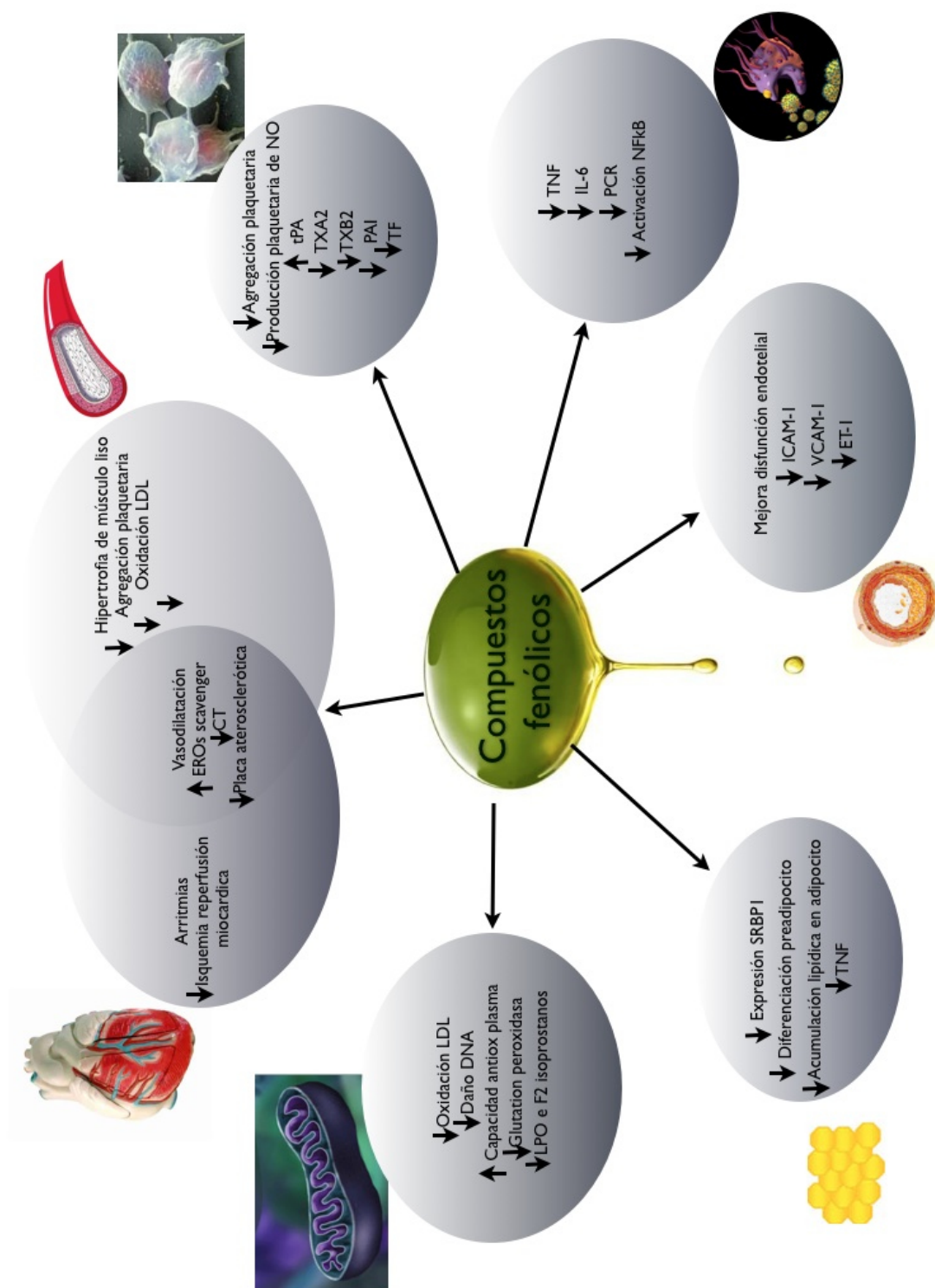


Figura 3. Efectos de los compuestos fenólicos. Adaptación de Badimón y cols. [27]

como el realizado en Italia por Visioli y cols. quienes, en pacientes dislipémicos y siguiendo un diseño aleatorizado, controlado y cruzado, evaluaron el efecto a largo plazo, sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo, de la ingesta durante 7 semanas, con un periodo de lavado de 4 semanas, de aceite de oliva virgen y aceite refinado con una composición en ácidos grasos prácticamente igual. Se observó un incremento en la capacidad antioxidante del plasma tras la ingesta del aceite virgen comparado con el aceite refinado [31]. Ese mismo año, Marrugat y cols. publicaron otro estudio de intervención, aleatorizado, controlado, cruzado y doble ciego, realizado en 30 voluntarios sanos residentes en España, que tomaron durante 3 semanas, con un periodo de lavado de 2 semanas, tres aceites de oliva con diferente concentración en compuestos fenólicos. Observaron un descenso en la concentración plasmática de LDL oxidadas (LDLox) y un incremento en la resistencia a la oxidación de las LDL tras las ingesta de los aceite de oliva con mayor contenido en compuestos fenólicos comparado con el aceite sin estas sustancias [32]. Con el mismo diseño y participantes del trabajo anterior, Covas y cols. evaluaron el efecto del tipo de aceite consumido sobre las concentraciones de LDLox, lipoperóxidos (LPO), F2-isoprostanos (F2IP), dienos conjugados, balance de glutatión y la actividad de superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) (SOD), glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) (GPx), glutatión reductasa (EC 1.6.4.2) (GR) y paraoxonasa (EC 3.1.1.2) (PON). En este caso sí observaron que estos marcadores de estrés oxidativo descendían de forma lineal y opuesta al incremento en las concentraciones de los compuestos fenólicos (T, HT, metil-O-hidroxitirosol) contenidos en las partículas plasmáticas de LDL [33].

Otros dos trabajos analizaron el efecto protector que sobre el ADN mitocondrial y nuclear pueden tener los micronutrientes del aceite de oliva. Así, un estudio de intervención multicéntrico (España, Dinamarca, Finlandia, Italia, Alemania), aleatorizado, cruzado y doble ciego, evaluó en hombres sanos el efecto que podría tener el consumo de tres tipos de aceite oliva con diferente concentración en compuestos fenólicos durante 3 semanas con un periodo de lavado

de 2 semanas entre ellos, sobre la eliminación urinaria de formas 8-hidroxiadas de guanosina (8-OHdG), desoxiguanosina y sus formas monóxidas (8OHGua), como marcadores de daño del ADN mitocondrial por estrés oxidativo [34]. Se observó una menor eliminación de estas sustancias al acabar cada periodo de intervención con respecto a los valores basales, pero no se encontraron diferencias de efecto al comparar los tres aceites entre sí. Sin embargo, Salvini y cols. llevaron a cabo un trabajo de intervención alimentaria en mujeres postmenopausicas que consumieron dos tipos de aceite de oliva con diferente concentración de compuestos fenólicos, siguiendo un diseño aleatorizado y cruzado. El daño oxidativo fue un 30 % menor durante el periodo en el que se consumió el HPOO comparado con el LPOO [35].

En resumen, de estos ocho estudios, con participación de 292 personas (250 hombres y 42 mujeres), cinco (n=128) muestran que la ingesta diaria durante más de 3 semanas de aceite de oliva virgen modifica los marcadores de estrés oxidativo en situación de ayunas (Covas y cols., 2006; Visioli y cols., 2004; Marrugat y cols., 2004; Ramirez-Tortosa y cols., 1999; Salvini 2006). En dos estudios (n=64), en los que se incluyeron fumadores y mujeres, no observaron dichos efectos beneficiosos.

■ En situación postprandial.

Se considera que un incremento o una mayor duración de la lipemia postprandial es un factor de riesgo de desarrollo de arteriosclerosis debido a que se asocia a un estado de estrés oxidativo [36]. Varios estudios en humanos han evaluado el efecto del aceite de oliva virgen, concretamente el papel de los compuestos fenólicos que contiene, sobre esta situación de riesgo. Los cuatro que destacan por su mayor calidad en cuanto a diseño aleatorizado, secuencial, cruzado y controlado son los que se comentan seguidamente.

En 2004, Weinbrenner y cols. publicaron un estudio llevado a cabo en España con voluntarios sanos a los que se indicó que consumieran durante 4 días 25 mL de tres tipos de aceite de oliva con diferente concentración en compuestos

fenólicos siguiendo un diseño aleatorizado, cruzado y doble ciego, con periodos de lavado de 10 días entre los aceites. En el periodo postprandial, observaron que se reducían la concentración de LDLox y de 8-OHdG tras la ingesta de HPOO y MPOO (contenido medio en compuestos fenólicos) y la actividad de GPx tras el consumo de LPOO [23].

En otro estudio de intervención aleatorizado, cruzado y doble ciego realizado por nuestro grupo en el que participaron 15 mujeres postmenopáusicas y 6 hombres, todos diagnosticados de hipercolesterolemia poligénica y con edades entre 53-68 años, se evaluó el efecto de la ingesta aguda de 40 mL de dos aceites de oliva con diferente concentración en compuestos fenólicos sobre las concentraciones plasmáticas de LPO y F2IP. Los participantes siguieron una dieta baja en compuestos antioxidantes 24 horas antes de cada ingesta de aceite de oliva. Se observó una disminución significativa en el periodo postprandial de ambos marcadores tras la ingesta del aceite de oliva con alto contenido en fenoles comparado con el aceite de oliva con bajo contenido en dichos compuestos [37].

Covas y cols. llevaron a cabo un estudio de intervención aleatorizado, cruzado, doble ciego, en el que se evaluó en 12 hombres sanos, residentes en España y con edades de 20-22 años, el efecto de la ingesta aguda de 40 mL de tres aceite de oliva con diferente concentración en compuestos fenólicos, sobre la oxidabilidad de las partículas de LDL colesterol. Los tres aceites se administraron de forma aleatorizada y cruzada, con un periodo de lavado de 10 días, durante el cuál los participantes siguieron estrictamente una dieta baja en sustancias antioxidantes. Estos autores encontraron que la concentración de partículas de LDLox guardaba una relación inversa con la concentración de compuestos fenólicos en los aceites administrados y directa con la concentración que alcanzaban algunas de estas sustancias (T, HT y 3-O-metil-hidroxitirosol) en el interior de dichas partículas de colesterol [24].

Bogani y cols. evaluaron los cambios en marcadores inflamatorios, [tromboxano B2 (TXB2) y leucotrieno B4 (LTB4)] y marcadores de estrés oxidativo

[niveles de peróxido de hidrógeno urinario (H_2O_2) y capacidad antioxidante total del plasma] tras una comida grasa administrada a 12 sujetos sanos. Mediante un diseño de cuadrados latinos y divididos en tres grupos, los sujetos recibieron EVOO, aceite de oliva y aceite de girasol, con dos semanas de lavado en cada periodo. Se detectó un descenso significativo de TXB2 y LTB4 tras 2 y 6 horas de la ingesta de EVOO, pero no tras la ingesta de aceite de oliva y aceite de girasol, así como un incremento de la capacidad antioxidante total del plasma [38].

En resumen, los cuatro estudios citados previamente, con 69 participantes, 54 hombres y 15 mujeres, muestran que la ingesta aguda de aceite de oliva virgen modifica los marcadores de estrés oxidativo durante el periodo postprandial. Los autores tuvieron en cuenta los potenciales efectos antioxidantes de diversos alimentos en las dietas habituales de los participantes y los posibles errores en la interpretación de los resultados, por lo que fueron sometidos a un periodo de *wash-in* durante 1-10 días con dietas pobres en micronutrientes con capacidad antioxidante. En todos los estudios se observa que dichos efectos son dosis dependiente en relación a las concentraciones de los compuestos fenólicos en los aceites suministrados (Covas y col., 2006; Ruano y cols., 2005; Weinbrenner y cols., 2004 y Bogani 2007) y a la biodisponibilidad de los mismos, representada por las concentraciones alcanzadas por éstos tanto en plasma como las partículas de LDLc (Covas y cols., 2006).

Recientemente, la EFSA (*European Food Safety Authority*) ha publicado un documento en el que se destacan, en base a evidencias científicas, los beneficios para la salud de los compuestos fenólicos en la protección de las LDL del daño oxidativo².

Efectos antiinflamatorios. También se han atribuido efectos antiinflamatorios a los micronutrientes del aceite virgen, tal y como diferentes trabajos realizados *in vitro* apuntaban hace un par de décadas. Los primeros indicios

²www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2033.htm

fueron encontrados en modelos animales en los que se vio que tanto la producción de factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) como la citotoxicidad mediada por macrófagos se reducían tras alimentar ratas con aceite de oliva [39]. Posteriormente, Carluccio y cols. llevaron a cabo un estudio en células endoteliales procedentes de vena umbilical humana (HUVECs) activadas con lipopolisacáridos (LPS) y citoquinas. Comprobaron que, tras ser cultivadas en un medio que contenía oleuropeína, HT o resveratrol a concentraciones nutricionales, se producía la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión celular vascular (VCAM-1)[40]. Posteriormente se verificó que la oleuropeína, el HT y el ácido homovalínico reducían la concentración de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y VCAM-1, tanto de la expresión de la proteína en la superficie de la HUVECs como de los respectivos niveles de mRNA, siendo mayor el efecto para oleuropeína e HT [41]. Estos resultados experimentales han servido de estímulo para el desarrollo posterior de estudios de intervención con el fin de comprobar si los resultados observados *in vitro* eran replicados al administrar aceite de oliva virgen a poblaciones sanas y con enfermedad cardiovascular.

- **En situación de ayunas.**

Salas-Salvadó y cols. encontraron, en una cohorte de personas asintomáticas con elevado RCV, que unos hábitos de alimentación próximos al patrón de DMed, con fuente de grasa tanto nueces como aceite de oliva virgen, se asociaba a menores concentraciones plasmáticas en ayunas de VCAM-1, ICAM-1, interleucina 6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR) en comparación a un patrón de alimentación caracterizado por un consumo pobre en grasas y elevado en frutas o cereales [42]. En 2009 Mena y cols. llevaron a cabo un estudio de intervención en 106 personas con elevado RCV, a las que se les administraron durante 3 meses y de manera paralela una dieta tipo DMed enriquecida con aceite de oliva, otra tipo DMed enriquecida con nueces y una control rica en hidratos de carbono (HCO) y baja en grasas. Al cabo de los tres meses, las personas que habían consumido las dos dietas tipo DMed presentaron un descenso de la expresión en monoci-

tos de CD49d (quimioaxis leucocitaria) y CD40 (ligando proinflamatorio), así como una disminución de las concentraciones plasmáticas de IL-6 e ICAM-1. Además, los participantes que siguieron una DMed enriquecida con aceite de oliva mostraron una reducción de VCAM-1 y PCR [43].

Para aclarar si estos efectos se debían al contenido en compuestos minoritarios del aceite de oliva, Fitó y cols. diseñaron un estudio de intervención en el que participaron 28 pacientes con enfermedad coronaria a los que administraron dos tipos de aceite de oliva que solo se diferenciaban en la concentración de compuestos fenólicos, siguiendo un diseño aleatorizado, secuencial y cruzado. Después de la administración diaria, durante 3 semanas, de 50 mL de cada aceite con 2 semanas de lavado entre ambos, comprobaron que las concentraciones plasmáticas de IL-6 y PCR fueron menores tras la ingesta de HPOO en comparación con el LPOO[44].

- **En situación postprandial.**

Durante estos años, nuestro grupo de investigación ha estado muy interesado en dilucidar si el efecto antiinflamatorio observado en situación de ayunas se producía también en el periodo postprandial. De este modo, diseñamos un estudio de intervención con personas sanas a las que se les administró durante 4 semanas, de forma secuencial y cruzada, tres tipos de dieta, que tenían como fuente de grasa principal aceite de oliva, mantequilla y nueces respectivamente. Además, al principio y al final de cada periodo, se les administró un desayuno rico en la fuente grasa en la que se había basado dicha intervención. Tanto en situación de ayunas como durante el periodo postprandial, cuando la dieta fue rica en aceite de oliva, no se produjo la activación de NF κ B observada tras las otras dos intervenciones [45, 46]. Esta respuesta se vio acompañada de un incremento de la concentración de NO_(x) y de una reducción de VCAM-1 durante el periodo postprandial [47].

Estos resultados han sido parcialmente reproducidos en un estudio griego de diseño paralelo en 67 voluntarios sanos, en el que se compararon los efectos

de diferentes tipos de aceite sobre marcadores solubles de inflamación. Estos autores demostraron que el consumo agudo de aceite de oliva, de soja, de hígado de bacalao y de girasol disminuía de manera significativa los niveles de ICAM-1 y además el aceite de oliva los niveles de $\text{TNF}\alpha$ [48].

Efectos antitrombóticos. El aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos también ha demostrado ejercer un efecto beneficioso sobre los factores de coagulación y la agregabilidad plaquetaria.

Inicialmente se realizaron estudios en animales de experimentación. Así, Petroni y cols. ya en el año 1995 investigaron los efectos *in vitro* de un compuesto fenólico obtenido del aceite de oliva, el 2-(3,4-di-hidroxifenil)-etanol (DHPE), encontrando que era capaz de inhibir la agregación plaquetaria y la producción de eicosanoides [49]. González-Correa y cols. postularon que este efecto estaría mediado por la inhibición que sobre la ciclooxigenasa (EC 1.14.99.1) (COX) tendrían compuestos como el HT, presente en la fracción minoritaria del aceite de oliva, lo que conduciría, en un segundo paso, a la reducción de la síntesis de tromboxano A₂ (TXA₂) [50].

En este tiempo varios estudios de intervención en humanos han intentando aclarar esta cuestión. López Segura y cols. demostraron que el consumo de una dieta rica en aceite de oliva durante 24 días reducía los niveles plasmáticos del inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1) en comparación con una dieta NCEP-1 (rica en HCO y pobre en grasas)[51]. Oubina y cols. compararon el efecto del consumo diario de aceite de oliva virgen y de aceite de girasol alto en ácido oléico en 14 mujeres sanas. Tras un mes, comprobaron que se reducían las concentraciones de TXB₂ en ayunas cuando las participantes tomaban aceite de oliva virgen. En la discusión, los autores atribuyen este efecto a la fracción fenólica del aceite de oliva, ya que el aceite de girasol alto en oleico posee más cantidad de dicho ácido que el propio aceite de oliva [52]. En este trabajo también se observó un descenso significativo de TXB₂ y LTB₄ en el periodo postprandial tras 2 y 6 horas de la ingesta de aceite de oliva virgen en comparación con el

aceite de oliva refinado y el aceite de girasol [38]. Fueron Leger y cols. los que demostraron la reducción de TXB2 en plasma tras administrar diariamente 25 mg de HT a personas sanas durante tres días [53], hecho que se corresponde con un hallazgo similar de Visioli y cols. tras administrar HPOO a pacientes hiperlipémicos [31].

Aparte del efecto que el aceite de oliva tendría sobre la producción de leucotrienos y tromboxanos, se han publicado varios trabajos que demuestran la acción beneficiosa de sus micronutrientes sobre los mecanismos de la trombosis y coagulación, especialmente FVII y PAI-1, adoptando un perfil menos deletéreo. En uno de ellos se compararon los efectos que tendría la administración durante 3 semanas de tres dietas basadas en aceites de girasol, colza y aceite de oliva virgen sobre las concentraciones de FVII coagulante, tanto en ayunas como durante el periodo postprandial, en personas sanas, resultando menores tras la ingesta de aceite de oliva en comparación con los otros tipos de aceites [54]. Posteriormente se ha visto que el consumo de aceite de oliva también reduce otros factores de la coagulación, como VII, XII, XIIa y X, cuando se compara con el aceite de colza y el de girasol [54]. Un efecto de similar naturaleza se ha encontrado también sobre el PAI-1, el activador tisular del plasminógeno (t-PA) , el factor tisular [-*Tissue factor*- (TF)] o el fibrinógeno, al comparar aceite de oliva virgen con otros aceites como el de soja, el aceite refinado o grasas saturadas [55]. Estos cambios parecen estar relacionados con el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva, tanto en ayunas [56] como en el periodo postprandial [57].

Acción vasodilatadora arterial. El aceite de oliva ha demostrado también mejorar la función vasodilatadora arterial mediada por el endotelio. Una limitación para poder interpretar los resultados de estos estudios es que la metodología utilizada es muy heterogénea, especialmente en relación a los parámetros medidos y las poblaciones objeto de estudio.

Nuestro grupo ha evaluado la función endotelial tras la ingesta aguda de aceite de oliva y después de su consumo mantenido. Fuentes y cols. analizaron

el efecto que tenía en pacientes hipercolesterolémicos una alimentación de tipo DMed rica en aceite de oliva, en comparación con una dieta rica en grasas saturadas, sobre la función endotelial medida con ecografía bidimensional. La dilatación mediada por flujo dependiente del endotelio (FMD) postisquémia mejoró tras la administración de la dieta tipo DMed, pero no tras la segunda[58]. Esposito y cols. realizaron en Italia un estudio de intervención con 180 pacientes diagnosticados de Síndrome Metabólico (SMet) a los que, de forma paralela y simple ciego, se les indicó que consumieran una dieta de tipo DMed rica en aceite de oliva frente o una dieta baja en grasas y rica en HCO. Después de dos años de seguimiento, la función endotelial (medida como una escala de puntuación basada en las diferencias de presión arterial tras infusión de L Arginina) mejoró en el grupo de la intervención mientras que permaneció estable en el grupo control [59].

En estos años también se ha estudiado el efecto del aceite de oliva virgen y el vino sobre la función endotelial en sujetos sanos. En un trabajo de Karatzi y cols. los participantes recibieron diariamente una comida estándar junto a 50 g de aceite de oliva y 250 ml de vino. Se administraron dos tipos de aceite (aceite de oliva virgen y refinado) y dos tipos de vino (tinto y blanco) en un diseño 2 x 2. La FMD se midió con ecografía, tanto en ayunas como en el periodo postprandial. El consumo combinado de vino tinto con aceite de oliva virgen, ambos ricos en micronutrientes con capacidad antioxidante, mejoró la FMD tras una y dos horas de su ingesta en comparación con la FMD en ayunas [60].

Años más tarde, nuestro grupo, llevó cabo un estudio de intervención en pacientes hipercolesterolémicos quienes, con un diseño aleatorizado, secuencial y cruzado, recibieron desayunos basados en dos tipos de aceite de oliva virgen cuya única diferencia era la concentración en compuestos fenólicos [37]. La hiperemia reactiva postisquémia (PORH) medida con láser Doppler, mejoró durante el periodo postprandial tras la ingesta de HPOO en comparación con el LPOO.

Mecanismos de acción del aceite de oliva. De la mayoría de los beneficios del aceite de oliva que han sido expuestos hasta ahora serían responsables tanto el ácido oleico como muchos de los compuestos minoritarios que hemos visto que contiene. Se ha demostrado que estos compuestos modifican algunos de los mecanismos biológicos implicados en la patogénesis de diferentes factores de RCV gracias a sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitrombóticos [54, 9, 21]. Los trabajos más recientes apuntan a que sería el efecto sinérgico obtenido de la interacción de los distintos micronutrientes, más que la simple suma de actividad de cada uno por separado, el responsable del efecto beneficioso observado a nivel poblacional [61]. Este hecho reforzaría la idea de que es la suma de efectos obtenidos del conjunto de alimentos y no de los alimentos o nutrientes aislados, la responsable de los beneficios para la salud atribuidos al modelo de DMed. Además, algunos compuestos minoritarios del aceite de oliva virgen como el escualeno, HT o triterpenos como el eritrodiol, uvaol, ácido maslínico y ácido oleanólico actuarían en múltiples niveles celulares mediando efectos antiproliferativos, citotóxicos, inductores de la apoptosis, reductores de radicales libres o preventivos del daño oxidativo del ADN [62, 63]

1.- Modificación del microambiente prooxidante. Como se ha comentado con anterioridad, la capacidad antioxidante es una característica común a la mayoría de micronutrientes del aceite de oliva. El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo del envejecimiento, inflamación, infecciones, cáncer y enfermedades cardiovasculares. Se define como el desequilibrio entre la producción de especies radicales reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs) y las defensas antioxidantes, en favor de los primeros. El oxígeno es esencial como aceptor terminal de electrones en las cadenas respiratorias de los organismos aerobios. Estas moléculas interaccionan con lípidos, CHO, proteínas y aminoácidos, ADN y otros radicales libres y antioxidantes. Ésto pone en marcha sistemas enzimáticos antioxidantes como la catalasa (EC 1.11.1.6) (CAT), SOD y GR así como otras enzimas relacionadas con la reparación del ADN como la

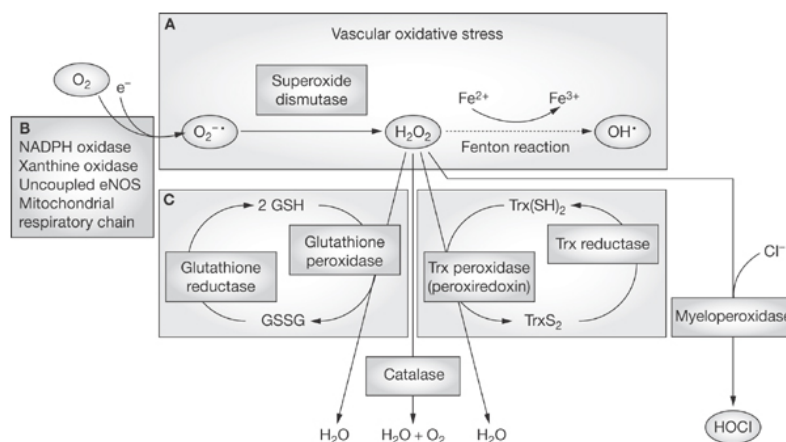


Figura 4. Sistemas enzimáticos involucrados en la generación e inactivación de ROS. Tomado de Förstermann U (2008). [64]

poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP-1), Ref-1, ADN-PK y p53. Del equilibrio entre ambos sistemas, oxidante y antioxidante, depende el mantenimiento de la función biológica celular normal y cuando falla se origina un estado denominado estrés oxidativo (**Figura 4**).

Existen muchas fuentes de EROs que pueden favorecer un ambiente prooxidante en la proximidad del endotelio como el tabaco, ciertos medicamentos, moléculas contenidas en los alimentos (ácidos grasos oxidados, trazas metálicas, aditivos alimentarios, alcohol, trazas de pesticidas), el metabolismo citosólico y mitocondrial de las células circulantes en el plasma y de la pared vascular, y los perixisomas de los macrófagos activados.

Los compuestos fenólicos han mostrado *in vitro* ejercer un efecto antioxidante sobre las LDLox [65] y disminuir la producción de F2IP, marcador también de oxidación lipídica [21]. En un estudio reciente, al incubar células mononucleares de sangre periférica con TCDD, una potente dioxina, se comprobó que disminuía significativamente la viabilidad de dichas células y la actividad de CAT y GP, aumentando las concentraciones de SOD, GR y otros marcadores de estrés oxidativo como LPO, proteínas carboniladas (PC) y EROs. Sin embargo, al incubar las células conjuntamente con TCDD y un compuesto fenólico del aceite de oliva como es el HT, todos estos marcadores de estrés oxidativo se normali-

zaron, aumentó la supervivencia de la célula y disminuyeron las concentraciones de LPO, PC, SOD y GR [66]. *In vivo*, aumenta la capacidad antioxidante del plasma, [38] protege frente al daño oxidativo en el ADN mitocondrial y aumenta la actividad GP [23]. Otros compuestos fenólicos también han demostrado poseer actividad antioxidante, como la oleuropeína, que inhibe la oxidación de las LDL inducida por sulfato de cobre, la formación de LPO y actúan como *scavenger* de aniones superóxido generados por las células polimorfonucleares [21]. Por último, uno de los mecanismos de acción conocidos del escualeno, otro componente minoritario del aceite de oliva, sería su papel como *scavenger* de radicales libres [67]. Otras sustancias antioxidantes como la coenzima Q, añadidas a una DMed, han demostrado disminuir el estrés oxidativo postprandial[6].

2.- Interacción con proteínas transportadoras y enzimas. El oleocantal, secoiroide responsable del sabor picante del aceite de oliva virgen, ha demostrado tener efectos antiinflamatorios al inhibir COX-1 y COX-2 de una manera análoga al ibuprofeno [68]. Además, se ha comprobado que las modificaciones de la actividad enzimática que median la capacidad antiproliferativa del escualeno son la inhibición de la farnesilación de la oncoproteína *ras* y de la HMG-CoA reductasa, lo que reduciría la producción de mevalonato, necesario para la síntesis de DNA durante la proliferación celular. También se ha demostrado que el escualeno tiene capacidad de modular la función de enzimas implicadas en la activación de ciertos carcinógenos [69]. Por otro lado, los sitosteroles del aceite de oliva virgen podrían disminuir de manera significativa las concentraciones de LDLs, CT y TG a través del bloqueo competitivo de la familia de receptores intestinales ABCG5/8 [70]. Estos compuestos interactuarían también a nivel del sistema nervioso con la proteína Tau impidiendo su cambio a conformación fibrilar, uno de los principales fenómenos implicados en el proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Alzheimer [71].

3.-Regulación de la expresión génica. Se ha sugerido que uno de los mecanismos implicados en los efectos biológicos beneficiosos observados en las

personas que siguen una DMed sería la modulación de la expresión de aquellos genes involucrados en los fenómenos de inflamación vascular, de la generación de macrófagos espumosos y en la trombogénesis [72]. Recientemente se ha descrito cómo la adición de coenzima Q a una DMed es capaz de reducir la expresión postprandial de genes antioxidantes así como de modular la respuesta inflamatoria postprandial y el estrés del retículo endoplásmico [73, 74]. Aunque existe ya información sobre el efecto que a nivel génico ejercerían algunos de los micronutrientes contenidos en la DMed, como resveratrol [75], flavonoides [76] o alfatocoferol [77], aún falta mucho por conocer referente al mecanismo de acción por el que los compuestos minoritarios del aceite de oliva virgen ejercerían dichos cambios de expresión génica. Con el fin de aclarar esta cuestión se han realizado estudios preliminares tanto *in vitro* como en modelos animales usando plataformas de *microarrays* de expresión génica [78]. Éstos han sugerido que el aceite de oliva podría modificar la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en los mecanismos celulares que median la resistencia al estrés oxidativo [79], el metabolismo lipídico [80] y otras rutas relacionadas con la patogénesis de la arteriosclerosis [81]. A pesar de que estos resultados han abierto una interesante línea de investigación, queda aun por dilucidar si estos cambios en la expresión génica están mediados por el propio ácido oleico o se deben a la presencia de los componentes minoritarios, como consecuencia de su actividad antioxidante o por la interacción directa con receptores, enzimas o factores de transcripción.

2.2. El Síndrome Metabólico.

2.2.1. Concepto.

El SMet representa un estado crónico inflamatorio sistémico desencadenado por el desequilibrio energético ocasionado por un estilo de vida en el que predomina el hábito sedentario y una excesiva alimentación, cuya fuente de energía está constituida principalmente por grasas saturadas. La importancia de dicho estado radica en que, si se mantiene en el tiempo y el sustrato genético es el adecuado, las personas que lo padecen desarrollan alteraciones celulares de carácter deletéreo a nivel del tejido adiposo, el músculo, el hígado o el endotelio arterial. Estos cambios, en último término, condicionan la aparición de obesidad, resistencia periférica a la acción de la insulina, hipertensión arterial o de enfermedad coronaria arteriosclerótica. El síndrome no es sino un conjunto de características fenotípicas que aparecen tardíamente en la historia natural de la enfermedad. De hecho, hasta hace pocos años, han existido discrepancias en la forma de abordar su estudio por parte de los grupos de investigadores clínicos y de los investigadores básicos. Los primeros, centrados en definir mejor los criterios diagnósticos del síndrome, tan sólo consideraban los aspectos clínicos que eran reflejo de la alteración de los órganos implicados. Los segundos han intentado dilucidar tanto la patogenia del síndrome como su historia natural a nivel celular y de tejidos. A la luz de los trabajos experimentales realizados en este campo en los últimos 10 años, ha sido necesario corregir en varias ocasiones los criterios del SMet, de tal modo que se han bajado los umbrales definitorios para algunos de los parámetros utilizados, con la intención de identificar más precozmente muchos de los pacientes con SMet [82]. Ha sido necesario conocer mejor la naturaleza de esta alteración inflamatoria para introducir en el área clínica el concepto evolutivo del SMet, desbancando así la concepción estática que había hasta la fecha. Este nuevo paradigma, que centra el origen del problema en la inflamación sistémica iniciada en el tejido adiposo, permite explicar cómo pueden existir poblaciones que, con un estado inflamatorio crónico similar

al de SMet, pero sin cumplir todos los criterios clínicos definitorios del SMet, presenten mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que la población normal. Ejemplos son aquellas personas con normopeso, con lipodistrofia o incluso enfermos obesos sin resistencia a la acción de la insulina [83, 84].

Tanto los estudios genéticos como el abordaje mediante biología de sistemas han sido dos estrategias que han facilitado esta labor investigadora y cuya mayor aportación es la de identificar poblaciones en riesgo de desarrollar la enfermedad cuando se exponen a estilos de vida similares a los que condicionan la aparición del SMet [85]. Esto permitiría diseñar de forma personalizada estrategias preventivas encaminadas tanto a evitar la aparición del estado inflamatorio en personas genéticamente predispuestas como a seleccionar qué cambios en el estilo de vida y qué modalidades de tratamiento serían más coste-eficientes para modificar su riesgo antes de que aparezca la enfermedad cardiovascular [7].

El convencimiento de que la obesidad es un problema de salud mundial y la percepción de que el tejido adiposo es algo más que un mero depósito de grasa han llevado a centrar su atención como órgano endocrino. Este aspecto es importante, ya que probablemente el factor necesario para iniciar la cascada de eventos patogénicos no sea el incremento en la masa grasa corporal sino de la capacidad que ésta tenga para adaptarse a modificaciones en el equilibrio energético y de la sensibilidad del mismo a responder a dichas modificaciones activando un fenotipo pro-inflamatorio. De hecho, aunque la obesidad central se ha considerado siempre un rasgo característico del síndrome, en los últimos años se han encontrado evidencias que apoyan la anterior hipótesis. En este sentido, diferentes trabajos han demostrado que, por un lado, existen personas delgadas que sí presentan el resto de los criterios definitorios del SMet y, por otro, pacientes obesos que no desarrollan en el tiempo ninguno de los rasgos característicos de SMet [83]. Por este motivo, en 2009 se publicó un documento de consenso internacional elaborado conjuntamente por varias sociedades científicas entre las que se encontraban *International Diabetes Federation (IDF)*, *Task Force on Epidemiology and Prevention*, *National Heart, Lung and Blood Ins-*

titute (NHLBI), *American Heart Association* (AHA), *World Heart Federation* (WHF), *International Atherosclerosis Society* (IAS) e *International Association for the Study of Obesity* (IASO). Revisando los criterios del ATP III, en el documento elaborado no se consideraba la obesidad abdominal como un componente necesario para la definición de SMet [86]. Esta declaración aglutina la principal conclusión de los investigadores básicos, quienes sostienen que realmente nos encontramos ante un problema de inflamación crónica sistémica, originado por una alteración en el equilibrio energético corporal, en el que la obesidad, al igual que la resistencia a la insulina, no es sino un fenotipo intermedio muy frecuente, pero no imprescindible, que conecta el inicio de la enfermedad, el desarrollo de la arteriosclerosis y la aparición de eventos cardiovasculares.

2.2.2. El estilo de vida como causa del inicio y el mantenimiento del SMet.

Como se ha comentado anteriormente, existen ciertos estilos de vida que favorecen el inicio del SMet. De este modo, tener hábitos de alimentación inadecuados o la escasez de ejercicio físico regular condicionan su desarrollo. La población occidental se encuentra en situación postprandial la mayor parte del día. La hiperlipemia postprandial ejerce efectos negativos sobre la integridad vascular, los fenómenos inflamatorios y el metabolismo de los ácidos grasos, pero también puede ser influida de manera positiva por la dieta y por estilos de vida saludables. La hiperlipemia postprandial es la respuesta fisiológica ante una comida grasa y esta respuesta puede ser diferente según el tipo y cantidad de grasa ingerida [54, 87]. Se ha comprobado que en diferentes poblaciones con modelos de alimentación ricos en grasa saturada, especialmente en países industrializados, existe una mayor frecuencia de SMet [88] y, de forma inversa, cómo la dieta rica en monoinsaturados ejercería un efecto protector [89]. La inactividad física también se ha relacionado en diversos estudios con una mayor incidencia de SMet [90]. En un reciente trabajo conducido en adolescentes, con un seguimiento medio de 22 años, encontraron que el hábito sedentario durante

este periodo interaccionaba con factores genéticos sobre los cambios observados en el índice de masa corporal (IMC) en el paso de la adolescencia a la edad adulta [91].

Como es de suponer, cambios en el estilo de vida de aquellas personas en riesgo de SMet, tanto en lo referente a sus patrones de alimentación como en la actividad física, son objetivo principal en el diseño de estrategias de prevención de las alteraciones metabólicas-inflamatorias o del control de las complicaciones asociadas al SMet [92]. Con respecto a los estilos de alimentación, existen suficientes pruebas que sugieren que los patrones de alimentación ricos en frutas y verduras, fibra no absorbible, aceite de oliva virgen y diversas fuentes de ácidos grasos ω -3 reducen algunos de los rasgos clínicos [93, 94, 95, 96, 97] y parámetros de alteración tisular e inflamación sistémica [98, 99] en estas personas. Por ejemplo, un estudio reciente ha demostrado, en pacientes con SMet y sobrepeso, que el consumo durante 18 semanas de una dieta rica en fibra de cereales mejora la sensibilidad a la insulina [93] o que una dieta baja en grasas y rica en carbohidratos suplementada con ω -3 de cadena larga pueden mejorar el perfil lipoproteico postprandial en pacientes con SMet, en el sentido de producir una reducción de TG en comparación con otras dietas [96]. Con respecto a esta última dieta, recientemente se ha publicado, en el marco del proyecto LIPGENE, un estudio que concluye que además es capaz disminuir la incidencia de SMet o de revertirlo en casos ya diagnosticados [100].

La DMed, constituye uno de los patrones de alimentación más saludables en la actualidad, habiendo mostrado sus beneficios en cuanto a la prevención y la modificación del curso evolutivo del SMet y de enfermedades cardiovasculares relacionados con éste [101, 42, 102]. La adherencia a una DMed también se ha relacionado con efectos beneficiosos sobre cada uno de los componentes clínicos definitorios del SMet. Con respecto al perímetro abdominal, una alta adherencia a la DMed se ha asociado a cifras menores de este parámetro en varias poblaciones. En lo que se refiere al perfil lipídico, un metaanálisis reciente analizó 50 estudios, algunos prospectivos, otros ensayos clínicos y otros transversales,

determinando que la DMed se asocia a una reducción en la concentración de TG y a un aumento de HDL-c [103]. En ese mismo trabajo se evaluó la relación existente entre la presión arterial y la DMed. Una gran adherencia a la DMed se relacionaba con un descenso en cifras de PA en comparación con una adherencia menor [104] y, si se comparaba la DMed con otra dieta control, la reducción de la presión arterial resultaba mayor tras el consumo de la primera [103]. El patrón de DMed también ha demostrado tener un efecto beneficioso sobre el metabolismo hidrocarbonado, disminuyendo tanto las cifras de glucosa plasmática en ayunas como el valor del índice HOMA-IR [105].

2.2.3. El tejido adiposo disfuncionante como origen del estado inflamatorio persistente del SMet.

Algunas paradojas, como el hecho de que la disminución del riesgo cardiovascular sea limitada, incluso alcanzando en la clínica un control intensivo de la homeostasis de la glucosa en la DM tipo 2, o que existan rasgos propios del SMet en pacientes con atrofia de tejido adiposo, como ocurre en algunas lipodistrofias, han llevado a cambiar el papel principal que tenía el fenómeno de resistencia periférica a la insulina en la fisiopatología del SMet por el del tejido adiposo como el primer órgano que falla [106].

El tejido adiposo, además de las funciones clásicas de aislamiento térmico, protección mecánica y almacenamiento de grasa en forma TG, se comporta como un órgano metabólicamente activo donde, coordinado con el hígado, el músculo esquelético y el sistema nervioso, se inician todas las alteraciones que aparecen en el desarrollo del SMet [107]. Una de sus funciones principales es almacenar los lípidos absorbidos en el tubo digestivo durante el periodo postprandial. Un exceso en la cantidad de grasa ingerida asociado al sedentarismo puede alterar el balance energético, tal y como ocurre en algunos modelos de alimentación frecuentemente seguidos en los países industrializados. Esta situación inestable puede ser adecuadamente manejada por el tejido graso o precipitar el fallo de la homeostasis lipídica, dando lugar a cambios en el sistema de transporte

energético del adipocito, la alteración del metabolismo de la glucosa y la activación de mecanismos autorreguladores que extienden el desequilibrio al resto del organismo. La respuesta adecuada ante un exceso de grasa postprandial es el almacenamiento de los TG en adipocitos pequeños y periféricos, localizados en la grasa subcutánea de las extremidades. Cuando se sobrepasa su capacidad, dichos TG se acumularían en otras regiones donde existen poblaciones de adipocitos inicialmente no preparados para dicha función. De este modo, su acúmulo mantenido, tanto intraabdominal como en el tejido muscular, facilitará la aparición de resistencia a la insulina allí donde se depositen [108].

La composición corporal de masa grasa también depende del número y del tamaño de dichos adipocitos. El número de adipocitos está limitado en la edad adulta, por lo que los cambios que experimente la persona en esta etapa de la vida en la masa grasa se atribuyen a cambios en el tamaño de los mismos. Además, el tejido graso puede sufrir dos tipos de transformaciones, ante condiciones de balance energético positivo: a) si el tejido sufre hiperplasia y es capaz de expandirse, las personas no desarrollaran características del SMet; b) si las células sufren hipertrofia y el tejido tiene escasa capacidad de expandirse, se hace resistente a la insulina, contribuyendo así al conjunto de alteraciones metabólicas de este síndrome. Es lo que se conoce con el término de obesidad hipertrófica [109].

Parece ser que en la obesidad que acompaña al SMet hay una correlación negativa entre el IMC y el número de preadipocitos, lo que ha hecho pensar que se produce un deterioro de la diferenciación de preadipocito a adipocito, aunque este fenómeno aún no es bien conocido. Ciertos mediadores, como el $\text{TNF}\alpha$, inducen una transdiferenciación del preadipocito hacia un fenotipo macrófago-*like*. Este hecho explicaría la disminución del número de adipocitos y la perpetuación del estado inflamatorio. Sin embargo basados en que este efecto es reversible, otros autores postulan que lo realmente existe es una incapacidad intrínseca del preadipocito para diferenciarse a adipocito en los pacientes predispuestos a desarrollar SMet, en los que el tejido adiposo circundante se ha expandido e

hipertrofiado[110]. Estos adipocitos hipertrofiados, grandes, más insulín resistentes y lipolíticos, secretarían más mediadores inflamatorios. En resumen, no sólo el aumento de la masa grasa por hipertrofia de adipocitos, sino su localización en el cuerpo también tendrá un papel importante en el desarrollo de obesidad y SMet. La grasa visceral es más activa en cuanto a la incorporación y liberación de ácidos grasos libres, mientras que el almacenamiento masivo de energía tiene lugar de forma más eficiente en el tejido adiposo subcutáneo. La capacidad de amortiguación del pico de absorción postprandial de TG por parte del tejido adiposo visceral es limitada cuando la capacidad del tejido adiposo periférico es superada [106].

Existen varios mecanismos que dirigen el paso de la simple obesidad central al desarrollo de SMet. En primer lugar, el estado lipolítico de la grasa omental muestra resistencia a la insulina, lo que contribuye a la exposición del hígado, a través de la circulación portal, a grandes cantidades de ácidos grasos libres, facilitando así los cambios metabólicos hepáticos que conducen a la hiperinsulinemia (por disminución del aclaramiento hepático de insulina), la intolerancia a la glucosa (por aumento de producción hepática de glucosa) y la hipertrigliceridemia [por aumento de secreción de apolipoproteína B (APO B) y VLDL][111]. En el caso de los depósitos grasos periféricos no ocurre esta situación, pues los ácidos grasos liberados evitan la circulación portal y sus consecuencias. El segundo mecanismo se fundamenta en la capacidad secretora del tejido adiposo, como órgano endocrino, de liberar adipocinas como la adiponectina y, bajo determinadas condiciones, citoquinas proinflamatorias como la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1 (MCP-1), IL-6 o $\text{TNF}\alpha$, promoviendo tanto la inflamación como la disminución de la sensibilidad a la insulina y contribuyendo de ésta manera al perfil inflamatorio y protrombótico que tiene lugar en el SMet [112].

Una inflamación crónica de bajo grado en el tejido adiposo puede ser el factor central en el desarrollo de muchas patologías que caracterizan el SMet. Las adipocinas son citoquinas que funcionarían como moduladores de dicha inflamación, en primera instancia a nivel local y, posteriormente, con repercu-

sión sistémica [113]. Este estado, junto a la resistencia periférica a la acción de la insulina y la disfunción del endotelio arterial, son los principales fenómenos biológicos que dirigen el desarrollo de la arteriosclerosis en estos pacientes [114]. En un estudio reciente se evaluó la presencia de SMet en pacientes obesos con y sin grasa ‘inflamada’, de acuerdo con la presencia o no de *crown like structures* (CLS), figuras histológicas resultado de la disposición de los macrófagos alrededor de un adipocito muerto en una estructura similar a una corona, y cuya presencia sugiere actividad inflamatoria, comparándolos con personas delgadas. Observaron que aquellos pacientes obesos en cuyo tejido adiposo no aparecían estas estructuras, presentaban un fenotipo clínico con menos resistencia insulínica y menos expresión de genes proaterogénicos junto a una función vascular preservada, situación más parecido a la de las personas delgadas que a la de los obesos con tejido adiposo inflamado [115]. La presencia de las CLS en el tejido adiposo periférico se ha relacionado recientemente con la cantidad de tejido adiposo visceral, un incremento de producción de $\text{TNF}\alpha$, mayor secreción de insulina en ayunas y concentración elevada de glucosa junto a la sobreexpresión de metalopeptidasa de matriz 9 (MMP-9), CD 14 y de otros genes relacionados con la ruta de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ [116].

A diferencia de la IL-6, el $\text{TNF}\alpha$ no es secretado mayoritariamente por adipocitos, sino por macrófagos activados que infiltran dicho tejido. Ambas citoquinas promueven la lipólisis y la secreción de ácidos grasos libres que, una vez liberados a través del sistema portal, contribuyen al aumento de glucogénesis hepática, induciendo resistencia periférica a la acción de la insulina [117]. Además, la IL-6 promueve la inflamación no solo en el propio tejido adiposo, donde es primariamente producida, sino también en el endotelio arterial y en el hígado. De hecho, se ha comprobado que la concentración portal de IL-6 presenta una correlación positiva con la concentración de PCR en dicho sistema, lo que explicaría cómo cambios metabólicos e inflamatorios iniciados localmente en la grasa visceral repercuten en el estado de inflamación sistémica crónica de bajo grado observada en los pacientes con SMet [118].

Ambas citoquinas participan también en el fenómeno de resistencia a la acción de la insulina que ocurre en los tejidos periféricos. Un mecanismo implicado es la inhibición de la fosforilación de IRS-1, molécula clave en las vías de señalización de la insulina [119]. La activación de los receptores de $\text{TNF}\alpha$ e IL-6 induce la activación de importantes activadores de la inflamación como la kinasa $\text{IKK}\beta$ y la kinasa N-terminal c-Jun (JNK). JNK también se activaría por los AGL y por las proteínas de respuesta ante el ‘estrés en el retículo endoplásmico’, factores que se han relacionado con la actividad asociada a la obesidad [120]. La activación de $\text{IKK}\beta$ no causaría resistencia insulínica mediante la fosforilación de IRS-1, sino a través de la activación del factor de transcripción $\text{NF-}\kappa\text{B}$, que mediaría la expresión de diferentes genes responsables de la respuesta proinflamatoria [119].

Por último, hay que mencionar el papel que desempeña la infiltración de monocitos-macrófagos en el tejido adiposo, probablemente desencadenada como respuesta al aumento del tamaño de los adipocitos que se observa al inicio del SMet. Este incremento se asocia a mayor estrés de las células del tejido adiposo, lo que origina especies radicálicas de oxígeno y libera AGL y citoquinas proinflamatorias. De éstas, MCP-1 parece ser la más importante para iniciar el reclutamiento de monocitos, pues se ha visto que aparece en el tejido graso de forma precoz, mucho antes que otros marcadores inflamatorios. La transmigración de monocitos desde el endotelio capilar que atraviesa los lobulillos de tejido graso se realiza mediante la expresión secuencial de moléculas de adhesión por ambas partes, tanto de las células endoteliales como de los propios monocitos (**Figura 5**).

Tras su salida al tejido adiposo, los monocitos se diferencian en macrófagos activados con capacidad de liberar citoquinas proinflamatorias. Los macrófagos activados constituyen la fuente principal $\text{TNF}\alpha$ en el tejido adiposo y es posible que actúen de manera sinérgica con los adipocitos, amplificando así el fenómeno inflamatorio a nivel local. Los monocitos residentes en el tejido adiposo tienen una producción escasa de citoquinas proinflamatorias, pero pueden ser

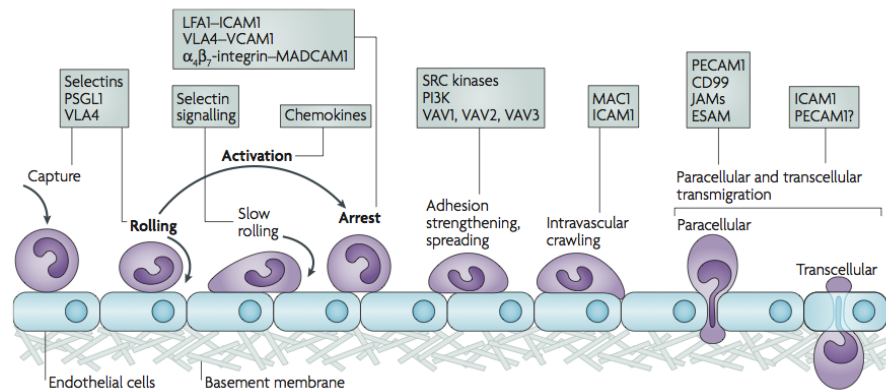


Figura 5. Migración transendotelial. Tomado de Ley K y cols. Nature Rev (2007). [121]

también activados a a partir de las citoquinas producidas por macrófagos procedentes del torrente circulatorio, obteniendo así un efecto multiplicador [112]. Hay autores que argumentan que más que representar una simple enfermedad inflamatoria, el SMet constituiría un trastorno específico de activación macrófaga con la consecuente pérdida de coordinación metabólica. Como tal, las secuelas de la obesidad serían más producto de la pérdida de influencia positiva de los macrófagos y no solo del perjuicio de la inflamación. Las implicaciones de estas conclusiones podrían ser importantes, ya que supondrían una nueva diana terapéutica para esta pandemia: la activación macrófaga [122].

2.2.4. Genética poblacional, epigenética y biología de sistemas.

La fisiopatología del SMet es un problema complejo de abordar ya que no obedece a un único mecanismo, sino que es consecuencia de una serie de alteraciones mantenidas en el tiempo en personas que, con un sustrato genético predisponente, se exponen a una serie de estímulos medioambientales poco saludables. Saber en qué proporción es responsable cada uno de los factores es difícil de discernir ya que carecemos de estudios que sean capaces de cuantificar la carga genética, y en ocasiones nos vemos obligados a confiar en informaciones separadas de los componentes fenotípicos o rasgos metabólicos que conforman

dicho síndrome como la dislipemia, la resistencia insulínica, la obesidad o la hipertensión arterial [2]. Dichos rasgos podrían estar condicionados entre un 40 y un 70% de ocasiones por el componente hereditario [85]. La naturaleza familiar del SMet y la marcada diferencia en la prevalencia entre varios grupos raciales son claramente consistentes con la existencia de un componente genético de susceptibilidad para la enfermedad. Pero no es suficiente sólo con el sustrato genético, pues la expresividad fenotípica está también modulada por factores ambientales relacionados con los hábitos de vida como el exceso de la ingesta calórica, baja actividad física, exceso de grasas saturadas, dieta con bajo contenido en fibra, el excesivo consumo de alcohol o el tabaquismo.

El interés por dilucidar los aspectos genéticos en el desarrollo del SMet ha dado lugar a nuevas áreas de investigación. Una de ellas sería la Nutrigenómica, que analiza el papel que diferentes variaciones genéticas [polimorfismos de nucleótido único (SNPs) o variaciones en el número de copias (CNVs)], seleccionadas en el proceso evolutivo, que actuarían como moduladoras del desarrollo del SMet en presencia de ciertos hábitos alimentarios. En la era paleolítica, el hombre se veía obligado a realizar una enorme tarea física diaria para conseguir sus alimentos. De dicha necesidad y de la interacción con el medio, se postula que se favoreció la selección de un ‘genotipo ahorrador’, es decir, determinadas variaciones genéticas asociadas a una maquinaria enzimática capaz de facilitar el almacenamiento eficiente del exceso de energía en forma de glucógeno muscular y de TG en el tejido adiposo con la finalidad de almacenarlos en los periodos de abundancia y utilizarlos en momentos de escasez [123]. Esta capacidad ahorradora programada genéticamente desde hace miles de años ha tenido que enfrentarse a cambios en el estilo de vida del ser humano, sobre todo en los países industrializados del primer mundo. En éstos, existen hábitos de vida donde son frecuentes el consumo abundante de alimentos de alto contenido calórico y una menor actividad física. La selección de ‘polimorfismos genéticos ahorradores’ unidos a una elevada ingesta calórica podrían explicar el aumento de peso que se observa en estos países y que ha conducido al incremento de magnitud

epidémica de SMet y de DM tipo 2 en las últimas décadas.

La Epigenética es otro área de investigación cuya aplicación al estudio del SMet ha cobrado interés en los últimos años [124]. Su objetivo es analizar qué factores podrían regular la transcripción génica mediante la programación de patrones de metilación de las zonas promotoras durante la etapa de vida intra-uterina y cómo dicha regulación influiría en el desarrollo de SMet tanto en la infancia como en la etapa adulta [125](**Figura 6**). Existen evidencias epidemiológicas que relacionan el peso al nacer con el desarrollo en la edad adulta de SMet y de enfermedad cardiovascular [126]. Uno de los modelos que se ha creado para explicar este fenómeno ha sido el del 'genotipo ahorrador'. De manera similar a lo que ocurrió en la era paleolítica, según esta hipótesis, un microambiente fetal deficitario en nutrientes conduciría a la reprogramación del patrón de metilación de aquellos genes cuyas proteínas faciliten una respuesta metabólica adaptativa que permita asegurar la supervivencia hasta el nacimiento. En este caso, si tras el nacimiento el ambiente fuese rico en nutrientes, la anterior programación epigenética 'ahorradora' facilitaría el desarrollo de SMet en la edad adulta [127]. Esto sucedió en una población femenina holandesa en un periodo de hambruna tras la segunda guerra mundial. Sin embargo, estas conclusiones son difíciles de extrapolar al estado actual de los países del primer mundo. Una situación de privación de nutrientes de tal magnitud durante el embarazo tan solo se encontraría a día de hoy en países del tercer mundo o en situaciones muy concretas como la hiperémesis gravídica o bien en el caso de trastornos de la conducta alimentaria durante el embarazo.

Además de la hipótesis anterior de desnutrición prenatal, existe otro modelo que considera que el patrón de metilación también puede ser alterado en el caso de que exista sobrenutrición de la madre durante el periodo de gestación. Cada vez hay más resultados que apuntan a que la ingesta abundante de grasas durante el embarazo y la lactancia puede condicionar que el recién nacido desarrolle SMet en la edad adulta [128]. De este modo, se ha observado en animales de experimentación que la alimentación materna con elevada cantidad de grasas

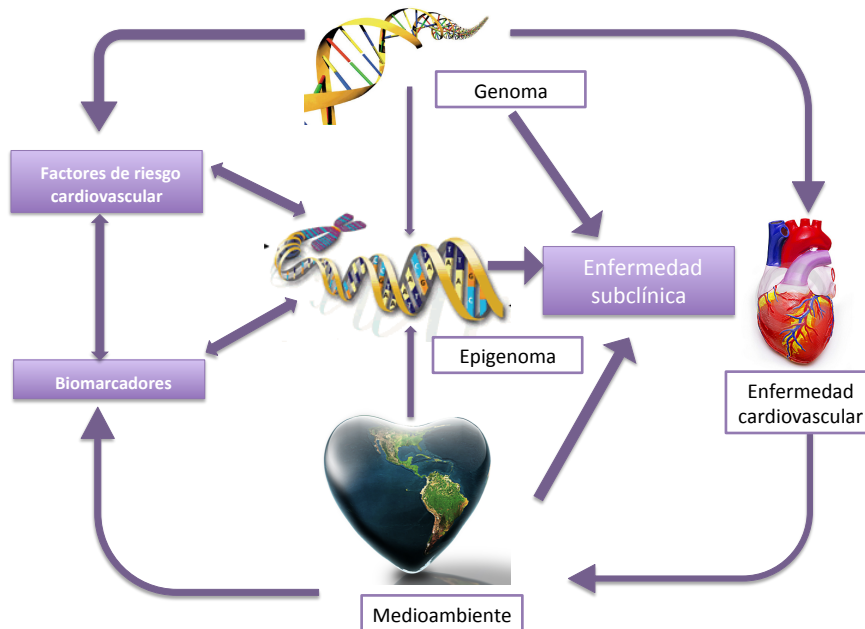


Figura 6. Relaciones entre genética, epigenética y enfermedad cardiovascular.

origina en las crías un aumento de la adiposidad y la expresión modificada de proteínas clave implicadas en la señalización hepática de la insulina, lo que origina a su vez una disminución de la sensibilidad hepática a dicha hormona [129]. Estos animales desarrollan posteriormente disfunción endotelial, hipertensión y enfermedad cardiovascular [130]. De todos modos, parece ser que la realidad es más compleja, ya que un reciente metaanálisis encuentra que la relación entre el peso al nacimiento y la masa grasa adulta adopta la morfología de una curva en ‘U’, de manera que, pesos extremos al nacimiento, tanto muy bajos como muy altos, pueden predisponer a la aparición de DM tipo 2 en la edad adulta [131].

La genética del SMet es por tanto muy compleja y depende de muchos factores. Estudios recientes sugieren que los mecanismos epigenéticos de programación involucrados son cambios en el patrón de metilación de islas CpG (tanto hiper como hipometilación de las regiones promotoras), la modificación mediante metilación y acetilación de histonas y la expresión de determinados miRNAs.

Todos estos mecanismos actuarían tanto en el periodo prenatal como durante el resto de la vida regulando la expresión génica sin alterar la secuencia del ADN. De cualquier manera, las evidencias indican que el epigenoma se puede ver afectado por factores medioambientales durante periodos críticos del desarrollo [132] y durante el inicio de la obesidad y el SMet [133].

En el seno del SMet se ven afectadas multitud de rutas metabólicas e infinidad de genes involucrados en ellas describiéndose SNPs relacionados con rasgos y componentes de SMet como la dislipemia, la obesidad o la resistencia insulínica. Así Povel y cols. demostraron que los polimorfismos CETP Ile405Val y APOE Cys112Arg se asociaban a concentraciones bajas de HDLc y a obesidad abdominal, siendo el efecto de uno independiente del otro y viceversa [134]. Frederiksen y cols demostraron que los pacientes homocigotos para el alelo Ala del polimorfismo Pro12Ala de PPAR-gamma 2 presentaban una reducción de riesgo de resistencia insulínica en una población danesa de pacientes no diabéticos [135]. También se han realizado estudios explorando las interacciones de otros polimorfismos con factores dietéticos como el de Pérez-Martínez y cols. que demostraron en el proyecto LIPGENE, cómo el polimorfismo P446L de GCKR interaccionaba con los ácidos grasos ω -3, modulando así la resistencia insulínica y la concentración plasmática de ciertos marcadores de inflamación en pacientes con SMet [136]. Deram y cols., analizando las variantes polimórficas del gen que codifica la perilipina, encontraron que el alelo minoritario de PLIN4 se asociaba a un mayor riesgo de padecer SMet, mientras que el PLIN6 se asoció a mayor pérdida ponderal en una población de adolescentes obesos a los que se sometió durante 20 semanas a terapia conductual y nutricional para perder peso [137].

También se ha estudiado el papel que juegan los miRNAs en el desarrollo y mantenimiento del SMet. Así se ha visto que determinados miRNAs se relacionan con la adipogénesis a través de la vía WNT (miR-8, -210, -21) o con el funcionamiento de adipocitos maduros (miRs-10b, -15, -26a) [138, 139, 140]. Otros miRNAs actúan como mediadores de vías de señalización de inflamación en el tejido adiposo como el miR-132, que promueve la producción de factores

proinflamatorios en respuesta al estrés nutricional [141]. Otros miRNAs se han asociado al metabolismo hidrocarbonado (miRs-20b, -21, -24, -15a, -126, -191, -197, -223, -320, -486, -28-3p) encontrándose expresados de manera diferencial en diabéticos, lo que podría constituir en el futuro un posible marcador biológico de DM [142].

Un aspecto también estudiado es el efecto que podrían tener sobre rasgos del SMet otras variaciones en la secuencia de ADN como son las microinserciones y microdelecciones agrupadas genericamente bajo el nombre CNV. Se han encontrado deleciones en genes relacionados con la adiponectina (ADIPOQ)[143], CNVs relacionados con el metabolismo lipídico (LDLR, LPA) [144] y obesidad (LEP) [145].

En los últimos años existe una tendencia al cambio de modelo de abordaje del SMet desde un punto de vista genético (**Figura 7**).

Los métodos tradicionales incluían la identificación de variantes genéticas y mutaciones subyacentes a una alteración de un solo gen con grandes efectos en rasgos metabólicos, describiendo genes estadísticamente relacionados con rasgos clínicos de interés en una gran cohorte [85]. La biología de sistemas por el contrario identifica la contribución de pequeños efectos en las variaciones genéticas en muchos

genes en la aparición de un rasgo determinado. Permite la generación de un modelo en red de interacciones funcionales entre genes. Además en los últimos años nos ha sobrevenido una avalancha de estudios genéticos poblacionales a gran escala que vienen a cubrir las carencias metodológicas que los clásicos estudios de ligamiento basados en estructuras familiares, especialmente la falta de potencia estadística, para identificar el grado de contribución en el fenotipo

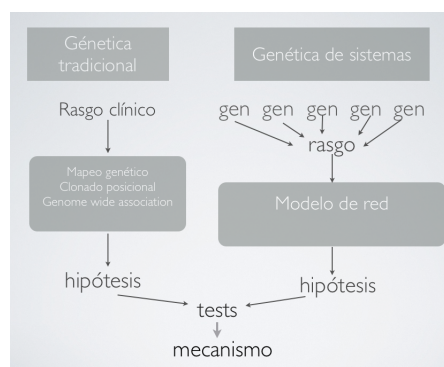


Figura 7. De la genética tradicional a la biología de sistemas.

de polimorfismos genéticos de baja frecuencia poblacional [146]. Así, diferentes estudios denominados GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) relacionan variaciones genéticas comunes con la obesidad y otros rasgos relacionados con el SMet [147, 148, 149]. Un reciente estudio GWAS analizó si las variantes genéticas más comunes con efectos pleiotrópicos podían explicar los distintos rasgos del SMet. Compararon los rasgos metabólicos pareados utilizando un panel de 2,5 millones de SNPs en 22.161 pacientes con SMet, encontrando 29 variantes genéticas asociadas a SMet. Los efectos de los 16 SNPs más importantes en los rasgos de SMet, desde el punto de vista cuantitativo, fueron relativamente pequeños, explicando tan solo el 9 % de las variaciones en TG, el 5,8 % de las variaciones en el HDLc, el 3,6 % de las variaciones en glucemia basal y el 1,4 % de la presión arterial sistólica. Estos resultados resaltan el carácter de enfermedad genéticamente compleja que tiene el SMet y acentúan la necesidad de abordar su conocimiento desde estrategias holísticas e integradoras [150].

Para concluir, podríamos resumir que el SMet se ve condicionado por un sustrato genético hereditario, en el que factores medioambientales, modificaciones epigenéticas y de regulación de la expresión génica a nivel trascricional y postranscricional influyen en su desarrollo y su expresión clínica [151, 152, 153](Figura 8).

2.2.5. Disfunción endotelial como marcador precoz de la enfermedad cardiovascular en el SMet.

Como ya hemos apuntado, uno de los principales motivos por los que es importante la existencia de SMet es que constituye una situación de alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, siendo la disfunción endotelial el marcador más precoz de daño del vaso.

La existencia de SMet como predictor de RCV ha sido un tema controvertido en los últimos tiempos. En el año 2005 la ADA (*American Diabetes Association*) subrayó la necesidad de establecer el RCV asociado al SMet. A partir de entonces, se han llevado a cabo más de 70 estudios observacionales para investigar

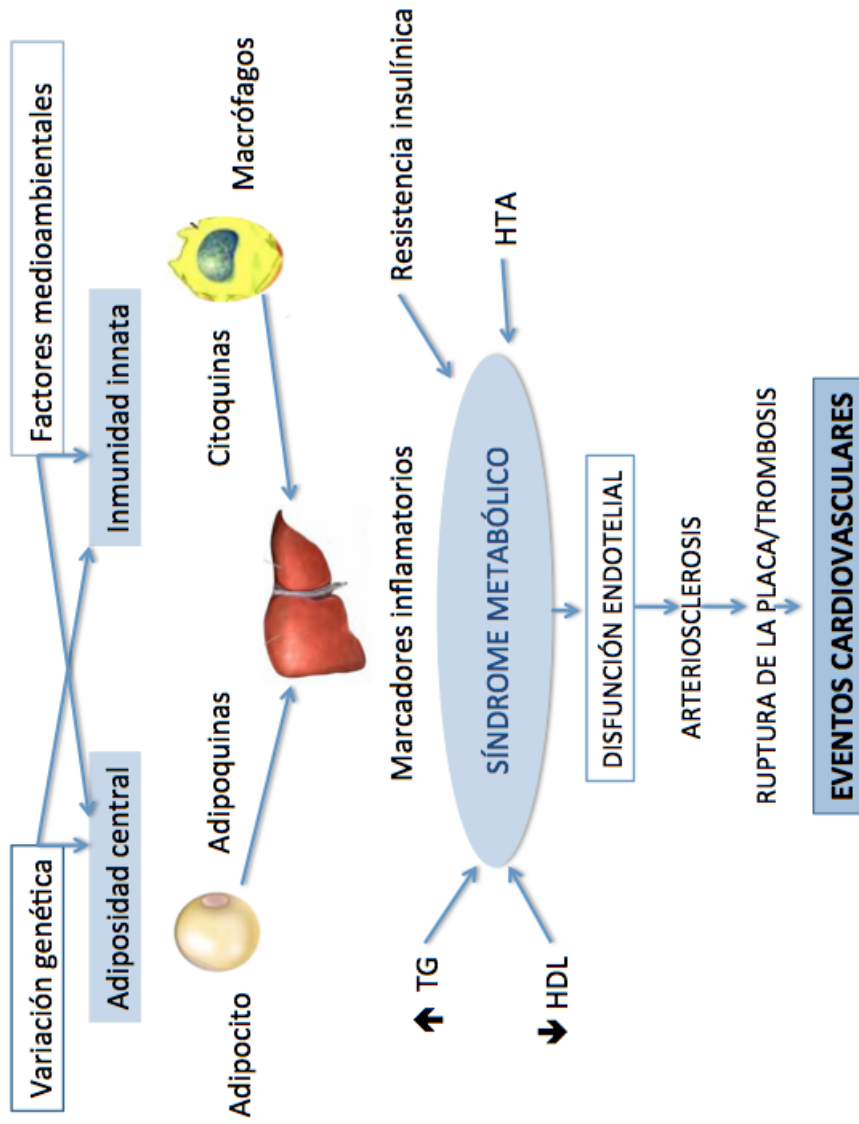


Figura 8. Fisiopatología del SMet. Adaptado de Reilly y cols. [154].

dicha relación. Mottillo y cols. publicaron los resultados de un metaanálisis con 83 estudios prospectivos, observacionales, estratificados en función de la presencia o no de SMet con el fin de estimar el RCV asociado al SMet en 10 años, concluyendo que los pacientes con SMet tienen un riesgo dos veces mayor de padecer enfermedad cardiovascular y muerte por causa cardiovascular e ictus comparado con las personas que no lo padecen. Además presentan una mortalidad global 1,5 veces superior y dos veces más riesgo de sufrir un infarto de miocardio [155].

2.3. Función endotelial

2.3.1. Estructura y funciones del endotelio arterial.

El endotelio vascular constituye el mayor órgano del cuerpo humano en extensión, al representar una superficie de 150 m². Está formado por una monocapa de células planas alineadas en la misma dirección del flujo sanguíneo (**Figura 9**). Junto al papel de barrera semipermeable al paso de sustancias desde la sangre, constituye el regulador primordial del tono vascular, asegurando una vasodilatación adecuada que permita mantener la presión arterial en el rango de valores normales y, de este modo, posibilitar la perfusión de los tejidos. Además es el encargado de mantener la homeostasis vascular mediante la secreción endocrina, autocrina y paracrina de sustancias vasoactivas moduladoras del crecimiento, adhesión celular, fibrinólisis o adhesión de plaquetas activadas, entre otras funciones [157](**Figura 10**). La disminución en la biodisponibilidad de alguna de las moléculas vasodilatadoras y antiaterogénicas, principalmente el óxido nítrico (NO), es lo que caracteriza la disfunción endotelial.

El NO regula la fluidez de la sangre, al controlar la vasorreactividad y permeabilidad de la pared en respuesta inmediata a los cambios hemodinámicos provocados por factores físicos, como son la presión tangencial sobre la pared de la arteria o por fuerzas de cizallamiento del flujo de la circulación sanguínea. Tanto en la enfermedad cardiovascular como en presencia de factores de riesgo asociados, las alteraciones hemostáticas y el estado proinflamatorio conducen a una alteración funcional de la células endoteliales denominada disfunción endotelial. Este fenómeno aparece de forma temprana en el curso evolutivo de dichas enfermedades, de ahí que su detección precoz permitiría conocer el estado de salud del árbol vascular antes del desarrollo de una placa aterosclerótica angiográficamente significativa, estratificando el riesgo de estos pacientes para iniciar intervenciones de carácter preventivo. El endotelio, como veremos a continuación, también es un órgano diana del estado inflamatorio crónico que se observa en los pacientes con SMet.

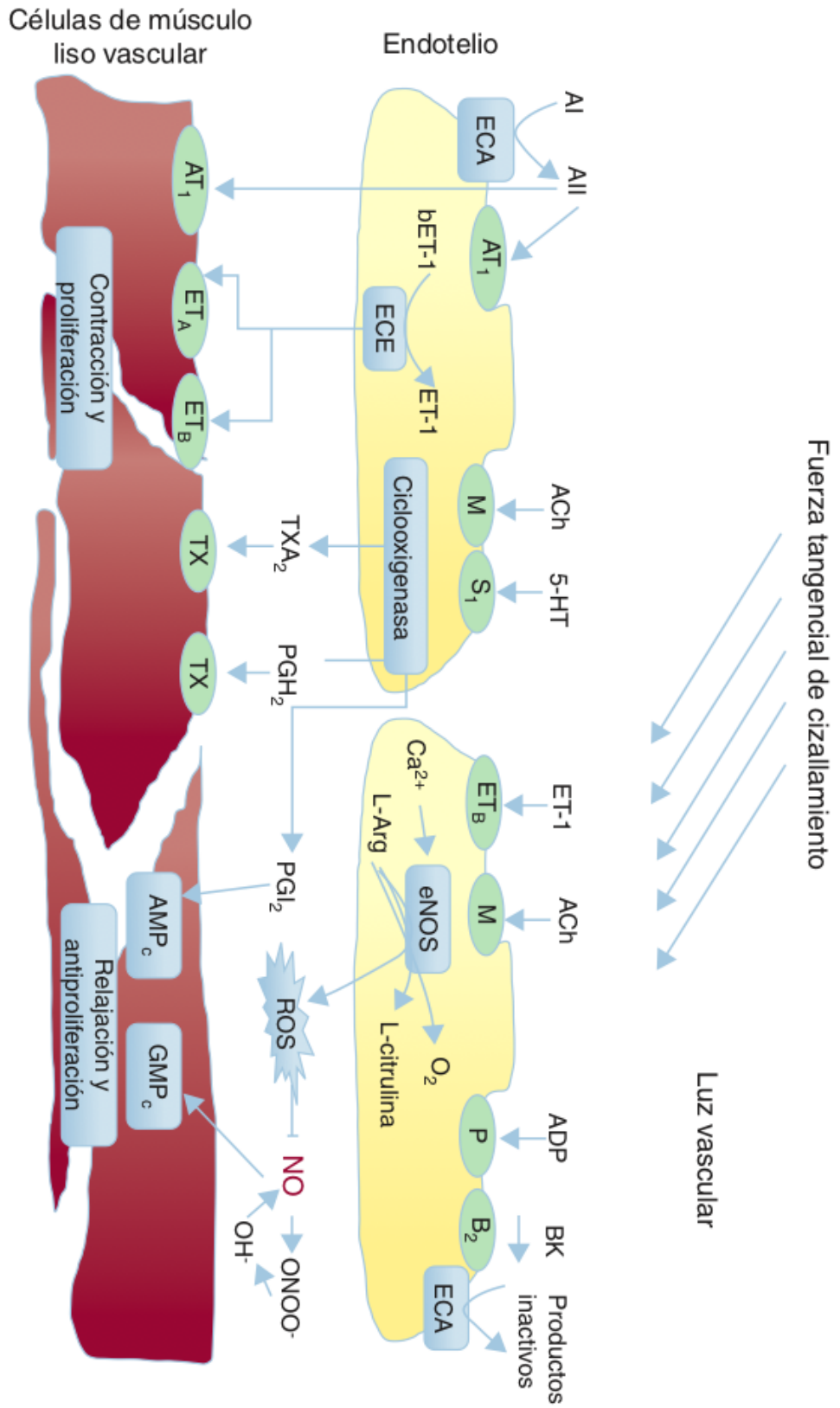


Figura 9. Estructura y función del endotelio. Tomado de Arrebola y cols. [156].

SUSTANCIAS LIBERADAS POR EL ENDOTELIO	
PROATEROGÉNICAS	ANTIATEROGÉNICAS
VASOCONSTRICTORAS Angiotensina II Endotelina Tromboxano Serotonina Trombina PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO LISO PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) Endotelina Angiotensina II MOLECULAS DE ADHESIÓN ELAM VCAM-1 ICAM-1	VASODILADORAS Óxido nítrico Prostaciclina Histamina Bradicinina Serotonina Sustancia P INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO DEL MÚSCULO LISO Óxido nítrico Prostaciclina Bradicinina TGF- β (factor de crecimiento transformador β) FACTORES TROMBOLITICOS t-PA (activador tisular del plasminógeno) PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno tipo I) Trombomodulina TFPI (inhibidor de la vía del factor tisular)

Figura 10. Sustancias liberadas por el endotelio.

2.3.2. Técnicas para medir la vasodilatación mediada por el endotelio.

Se conoce como ‘vasodilatación dependiente del endotelio’ aquella mediada por el NO generado por la oxido nítrico sintasa endotelial (EC:1.14.13.39) (eNOS). La disminución de su biodisponibilidad constituye el primer fenómeno de disfunción endotelial [158]. La liberación constitutiva de NO por el endotelio tiene como principal función el mantenimiento del tono del músculo liso de la pared del vaso, que puede provocarse experimentalmente mediante estímulos físicos o fenómenos químicos. Aunque uno de los fármacos con dicho efecto es la acetilcolina (Ach), dado que requiere administración parenteral intraarterial, su uso en investigación clínica hoy en día es escaso. Como estímulo físico se ha utilizado la variación en la tensión de cizallamiento provocada por el incremento transitorio del flujo sanguíneo, generalmente tras un periodo de isquemia local controlada y que da lugar a la hiperemia reactiva postisquemia (PORH). En este fenómeno, descrito por primera vez en 1933 por Schretzenmayr, se ha basado el desarrollo de técnicas no invasivas para medir la reactividad vascular dependiente del endotelio tras la aplicación de un periodo de isquemia. Celermayer fue pionero en proponer la medición de la dilatación mediada por flujo para evaluar

de forma no invasiva la función endotelial [159]. Otro de los estímulos físicos que se han utilizado ha sido la generación de cambios controlados de temperatura en la superficie cutánea.

Técnicas para medir la capacidad vasodilatadora coronaria. Aunque la medición de la función endotelial coronaria continua constituyendo el patrón de referencia, su complejidad y requerimientos técnicos hacen que su uso extensivo no sea posible. La primera evidencia de la existencia de disfunción endotelial en los vasos ateroscleróticos se obtuvo a mediados de los años 80, cuando se utilizó la infusión intracoronaria de Ach para inducir la vasodilatación de las arterias coronarias [160]. Sin embargo, al poco tiempo se desarrollaron técnicas menos invasivas para evaluar la disfunción endotelial arterias periféricas. Dichos métodos difieren según el vaso seleccionado para evaluar la función endotelial, la técnica mediante la cual se mide la vasodilatación y el estímulo que provoca dicha vasodilatación. A continuación pasaremos a describir algunas de las más utilizadas.

Coronariografía. La función endotelial coronaria se puede medir mediante cateterismo cardíaco. Tras la introducción de un catéter arterial bien femoral o radial, se administra contraste intravenoso. Si se aplica adecuadamente puede proporcionar información muy valiosa del lecho vascular coronario. En la mayoría de los protocolos se incluye la infusión intraarterial de Ach y nitroglicerina para evaluar la función endotelial dependiente e independiente del endotelio respectivamente. Las arterias coronarias con endotelio intacto responden a la infusión de Ach con una dilatación de los vasos epicárdicos y de la microcirculación, resultando en un incremento del flujo sanguíneo coronario. No obstante si la superficie endotelial está dañada o incluso interrumpida, la Ach producirá una vasoconstricción paradójica secundaria a la estimulación de los receptores muscarínicos de las células musculares lisas vasculares, con el consiguiente descenso en el flujo coronario [160]. De manera similar a otras técnicas, la respuesta a la administración intraarterial de Ach proporciona información pronóstica im-

portante. Sin embargo, dada la naturaleza invasiva y el alto coste de la técnica, hace que no se pueda utilizar de manera extensiva en la práctica clínica ni en estudios de investigación.

Ecocardiografía de estrés con dipiridamol. La microcirculación coronaria se puede medir también de manera indirecta mediante ecocardiografía de estrés con administración de dipiridamol. La disfunción coronaria microvascular observada se puede clasificar en cuatro tipos. Tipo A: Disfunción microvascular coronaria en ausencia de enfermedad arterial coronaria y enfermedad miocárdica; tipo B: disfunción microvascular coronaria en el contexto de miocardiopatía; tipo C: disfunción microvascular coronaria en presencia de enfermedad obstructiva de arterias epicárdicas; tipo D: disfunción microvascular coronaria yatrogénica [161].

Recientemente se ha descrito que la reserva de flujo coronario evaluada con esta técnica (definida como el cociente entre la velocidad de flujo diastólico pico durante la hiperemia y dicho pico en situación normal) es una medida sensible que permite detectar estenosis epicárdica y deterioro de la microcirculación coronaria. Es más, diversos estudios han mostrado que los pacientes con hipertensión arterial pueden tener la reserva de flujo coronario disminuida a pesar de tener coronarias angiográficamente normales [162]. Aun así, esta técnica tampoco es la más adecuada para la valoración de la función endotelial en ensayos clínicos, dada la destreza en el manejo de la ecocardiografía cardiaca que se requiere.

Técnicas para medir la capacidad vasodilatadora periférica.

Dilatación mediada por flujo medida por ecografía de la arteria braquial. Este método mide el diámetro de la arteria braquial, en reposo y tras el incremento en la presión de cizallamiento arterial inducida por la isquemia que provoca el inflado de un manguito de presión, ocasionando una hiperemia reactiva y la vasodilatación de la arteria braquial, fundamentalmente debido a

la liberación de NO del endotelio [163]. La dilatación mediada por flujo (FMD) se expresa en porcentaje de cambio del diámetro de la arteria con respecto al diámetro arterial basal. Celermajer y cols. fueron los primeros en medir esta respuesta *in vivo* en la arteria braquial o radial [159]. Posteriormente Joannides y cols. demostraron que se trataba de un fenómeno dependiente del NO, abriendo por tanto una puerta al estudio de la función endotelial [164]. Además ha sido validada, al comprobar que los valores de vasodilatación arterial obtenidos mediante este procedimiento guardan relación con la capacidad vasodilatadora de la circulación coronaria medida a través de la infusión intrararterial de Ach [165]. En los últimos años se ha comprobado que valores reducidos de FMD guardan relación con la presencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales, reflejando el grado de respuesta terapéutica y el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares futuros [166]. Por estos motivos, desde principio de los años 90, la ecografía doppler se considera la técnica no invasiva de referencia para la evaluar la vasoreactividad arterial periférica. Sin embargo, el alto grado de especialización del evaluador y el coste de los equipos han sido dos limitaciones que han dificultado su implementación en la práctica clínica.

Pletismografía de oclusión venosa (VOP). En estos años se han hecho esfuerzos para desarrollar técnicas más sencillas y rápidas para medir la capacidad vasodilatadora del endotelio [167]. La pletismografía mide cambios de volumen en respuesta a variaciones del flujo sanguíneo. La VOP es el método más antiguo de investigación del flujo sanguíneo en humanos [168]. El principio fundamental de la VOP es la medida del flujo sanguíneo de un tejido, generalmente músculo, a través del cambio en el volumen tisular derivado del inflado y desinflado de un manguito de presión proximal al mismo tejido. El manguito se infla a una presión que ocluya el retorno venoso pero permita el flujo arterial. La tasa de cambio de volumen será, por tanto, proporcional a la tasa de flujo arterial. El método más usado para medir la VOP fue diseñado en 1975 por Hokanson, si bien posteriormente se han ido introduciendo modificaciones.

Requiere de un medidor automático calibrado de mercurio en silastic que se coloca a modo de anillas a lo largo de la extremidad explorada. A medida que el diámetro de la extremidad en estudio se expande y contrae, se produce un cambio en la longitud de la columna de mercurio.

Existe una modificación de esta técnica que permite el estudio de la función endotelial en el brazo. A pesar de que está limitada por su naturaleza semi invasiva, la pletismografía venosa del brazo ofrece la ventaja de poder administrar de manera intraarterial moléculas, hormonas o fármacos como Ach o nitroglicerina, para cuantificar la vasodilatación dependiente e independiente del endotelio respectivamente [169]. El brazo contralateral generalmente se utiliza como control, para comprobar que la sustancia administrada no ejerce ningún efecto sistémico. También es posible administrar otras sustancias agonistas y antagonistas, e incluso nuevos fármacos en dosis muy pequeñas con escasa repercusión sistémica, en la arteria braquial [164]. El flujo sanguíneo antebraquial (FBF) se calcula como la tasa de incremento en la circunferencia del antebrazo y se expresa en $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} 100\text{mL}^{-1}$ de volumen del antebrazo. La administración de Ach induce un incremento del FBF cuya magnitud proporciona un índice de la función vasomotora endotelial de la resistencia de arteriolas musculares periféricas, mientras que la administración de L-NMMA, un inhibidor de NO sintasa, disminuye el FBF poniendo en evidencia la liberación basal de NO en este nivel.

Tonometría arterial periférica (PAT). La medida de la respuesta vasodilatadora periférica mediante la tonometría arterial periférica (PAT) digital está adquiriendo importancia para evaluar la función vascular, debido a su sencillez. A pesar de que la señal de la PAT es modulada por factores medioambientales, locales y sistémicos, también se afecta por la biodisponibilidad del NO y, por tanto, depende del estado funcional del endotelio. Tras provocar una hiperemia en el vaso explorado, se incrementa la amplitud del pulso digital y, así, la amplitud de la señal de la PAT, respuesta que depende en parte de la síntesis del NO [170]. La pletismografía digital detecta cambios pulsátiles en el

volumen arterial. Un descenso en el volumen sanguíneo arterial en el pulpejo del dedo causa un descenso en la columna pulsátil arterial, disminuyendo la señal de medida y viceversa. De forma similar a como se medía la FMD, un manguito de presión arterial se coloca en un brazo, mientras que el otro brazo sirve de control interno. Tras medir los cambios del volumen sanguíneo basal, se infla el manguito a una presión por encima de la sistólica y se desinfla tras 5 minutos para inducir una hiperemia reactiva en el brazo. El índice calculado entre el brazo con la hiperemia reactiva y el brazo control representa una medida de la función endotelial. No obstante el aumento de la amplitud del pulso tras la hiperemia reactiva es una respuesta compleja a la isquemia. Puede reflejar cambios en el flujo, así como en la dilatación microvascular y solo depende en parte del NO [170]. Existen estudios que demuestran que el deterioro de la función endotelial periférica evaluada en el dedo se correlaciona con la microcirculación coronaria en pacientes con aterosclerosis temprana [171]. En un estudio transversal de 1957 pacientes de la cohorte de Framingham se asoció la disfunción vascular digital con factores de RCV tradicionales [172].

Análisis de la onda de pulso (PWA). La morfología de la onda de presión arterial contiene información importante, acerca de la rigidez de las grandes arterias y la cantidad de onda reflejada dentro del sistema arterial [173]. La reflexión de la onda tiene lugar en sitios donde la impedancia cambia, como en las ramificaciones arteriales. Se cuantifica determinando el índice de aumento (AIx), que representa la diferencia entre el primer y el segundo pico sistólico [174]. A pesar de que la impedancia de las arterias largas y elásticas es relativamente constante, la impedancia de las pequeñas arterias y arteriolas es mucho más dinámica y depende en gran parte del tono del músculo liso y del tamaño del vaso. Por tanto, cambios en el tono de pequeñas arterias afectan al reflejo de la onda, de modo que la vasodilatación reduce el AIx, mientras que la vasoconstricción lo aumenta [174].

Como se ha venido reiterando, uno de los principales factores que regulan

el tono vascular es el NO derivado del endotelio. Se sabe que el NO influye en el reflejo de la onda y por tanto en la morfología de la onda arterial. El gliceril trinitrato (GTN), un donante de NO exógeno, reduce el reflejo de la onda a dosis bajas, antes que cualquier otro efecto medible, en la resistencia o presión media, sugiriendo que las pequeñas arterias son mas sensibles al GTN que los vasos con mayor resistencia. De forma contraria, la inhibición de la producción endógena de NO con LG monometil-L-Arginina, aumenta el reflejo de la onda [175].

Es importante destacar que la rigidez de la aorta, expresada como velocidad de onda de pulso arterial aórtica, es un firme predictor de eventos cardiovasculares futuros y de mortalidad, especialmente en los pacientes con mayor riesgo basal, hechos demostrados recientemente en un metaanálisis con 15000 sujetos [176].

Hiperemia térmica local. La hiperemia térmica local mide el incremento sostenido del flujo sanguíneo cutáneo, cuando se provoca un aumento de la temperatura cutánea [177], llegando a valores máximos cuando se alcanzan 42-44 °C [178]. La vasodilatación térmica máxima refleja la máxima capacidad vasodilatadora de los vasos [178], con un pico inicial de flujo sanguíneo cutáneo durante los primeros 10 minutos seguido de un periodo de *plateau* tras 20-30 minutos del calentamiento. La fase inicial rápida, mediada por la inervación sensitiva local [179], está modulada por un reflejo axonal dependiente del CGRP (*calcitonin gene related peptide* o péptido relacionado con el gen de la calcitonina) y la sustancia P [178]. En contraposición, la fase de *plateau* está mediada en gran parte por el NO [179].

Iontoforesis con acetilcolina. La iontoforesis se basa en la capacidad de un fármaco ionizado disuelto para migrar a través de la piel cuando se le aplica una corriente de baja intensidad [180]. La cantidad del fármaco depositado dependerá de la magnitud y la duración de la corriente aplicada y de la permeabilidad de la barrera cutánea. Cuando se combina con la flujometría

doppler, este método permite la detección de alteraciones en el flujo cutáneo en respuesta a la administración controlada de un fármaco vasoactivo aplicado en la superficie de la piel [181]. La iontoforesis con Ach origina una respuesta vasodilatadora caracterizada por un pico precoz seguido de un periodo de menor intensidad pero de mayor duración. Se utiliza también nitroprusiato sódico para generar una vasodilatación independiente del endotelio [182].

Flujometría Laser Doppler (LDF). Se basa en el fenómeno Doppler descrito por el matemático austriaco Johann Christian Doppler (1803–1853). Cuando se dirige un haz de luz láser sobre la superficie cutánea, una fracción penetra a través de ella e interacciona con las células en movimiento, principalmente eritrocitos, que circulan por las arteriolas terminales, asas capilares y vénulas postcapilares, en un volumen tisular aproximado de 1-1,5 mL. Debido al efecto Doppler, los fotones de la luz láser reflejados en esas células sufren un pequeño cambio en su frecuencia que será proporcional a la velocidad de movimiento de las mismas. La luz reflejada, mezcla de frecuencias cambiadas y no cambiadas, se transmite mediante una fibra óptica flexible a un fotodiodo del láser Doppler. Posteriormente es amplificada, analizada para determinar la cantidad de cambio en la frecuencia y transformada en una señal analógica. La utilización del láser Doppler permite una medición continua, no invasiva y en tiempo real del flujo sanguíneo en la piel de una determinada región. El registro de la señal se realiza mediante el acoplamiento de un ordenador equipado con un *software* de adquisición específico [183] y los valores obtenidos se expresan como unidades de perfusión arbitrarias. Se pueden grabar varias señales diferentes pero las que más se utilizan son la perfusión microvascular (flux), que representa el producto entre el número de células sanguíneas en el volumen del tejido muestra y, la velocidad media de las mismas. El registro de dicha medida en un periodo de tiempo y en diferentes circunstancias permite identificar varios parámetros como son la PORH max, la PORH pico o el PORH % de cambio. La reproducibilidad de estos parámetros inter e intra sujetos es buena, ya que

presenta un coeficiente de variación menor del 10 % [184].

Como hemos apuntado previamente, la flujometría Doppler permite la evaluación del flujo sanguíneo cutáneo microvascular a lo largo del tiempo y las alteraciones que ocasiona un determinado estímulo. La disfunción endotelial es un proceso sistémico que puede ser medido en vasos de diferentes localizaciones [165]. Dado que el lecho vascular periférico representa un acceso fácil, ha sido elegido por múltiples autores para la evaluación de la función endotelial en personas con diferentes factores de RCV como DM tipo 2 [185], hipercolesterolemia [186] obesidad [187] y otros parámetros, como la presión arterial sistólica, la presión de pulso o la glucemia plasmática [188]. De igual manera, se ha demostrado que los resultados obtenidos al medir la función endotelial microvascular reflejan el estado de arterias de mayor calibre y por tanto los resultados son extrapolables [189] a lo que está ocurriendo en otras arterias como por ejemplo las coronarias [190].

La mayor ventaja que ofrece el láser Doppler es que presenta una alta sensibilidad para la detección y cuantificación de los cambios en el flujo cutáneo en respuesta a un determinado estímulo. El mecanismo exacto implicado en la respuesta postoclusiva no ha sido dilucidado por completo pero se conoce que el NO juega un papel fundamental en la vasodilatación postisquémica y ante el aumento de tensión de la pared, de forma que la medición de la función endotelial también supone un reflejo de los procesos *in vivo* que influyen en la biodisponibilidad del NO. Además, se ha propuesto su uso para la monitorización de la eficacia terapéutica en la práctica clínica [191].

Sin embargo, presenta varias fuentes de variabilidad que creemos importante señalar. Por un lado, en los trabajos publicados se aprecian diferencias metodológicas en relación a los tiempos de isquemia, que oscilan entre 1 y 5 minutos, obteniendo por tanto respuestas diferentes y difíciles de comparar [192]. Por otro lado, existen discrepancias en los puntos elegidos para las mediciones. Sin embargo, se ha visto, que cuando se estandariza el punto de registro, la reproducibilidad interensayo medida por laser es similar a otras técnicas no invasivas

como con hiperemia térmica e iontoforesis con Ach, presentando un mínimo coeficiente de variación comparada con la FMD de la arteria braquial [190, 193].

En resumen, la facilidad de uso al ser un método sencillo, no técnico dependiente, no invasivo y con buena reproducibilidad de los registros obtenidos, han convertido al láser Doppler en la técnica más usada en los estudios clínicos de microcirculación.

Otros métodos para medir la función endotelial: marcadores solubles.

También se puede evaluar la función endotelial cuantificando marcadores biológicos solubles en plasma. Estos marcadores pueden ser moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 o E-selectina, productos que aumentan durante la disfunción endotelial, como PCR, factor de von Willebrand o trombomodulina, y derivados o precursores de la células endoteliales circulantes (progenitores y micropartículas) [194]. Las moléculas de adhesión son muy importantes en la respuesta inmune innata y adaptativa, jugando un papel fundamental en la migración transendotelial de leucocitos en la zona de inflamación, que da lugar al inicio del daño macroscópicamente evaluable [195].

Se ha observado que durante el periodo postprandial se produce un deterioro de la función endotelial normal [36, 196, 197]. El aumento en las moléculas de adhesión endotelial, debido al incremento del estrés oxidativo, terminará provocando la disfunción del endotelio que lleva al desarrollo de arteriosclerosis. Estos fenómenos que se observan especialmente tras la ingesta de grasas saturadas, pueden limitarse parcialmente con la ingesta concomitante de diversas fuentes de antioxidantes naturales [198] (**Figura 11**).

2.3.3. Óxido nítrico y función endotelial.

La acción vasodilatadora del NO está mediada intracelularmente por el aumento de la concentración de cGMP y de reducción de calcio, que sigue a la estimulación de la guanilato ciclasa [199]. El NO es un radical libre del nitrógeno tremendamente inestable. Poseer un número impar de electrones, le con-

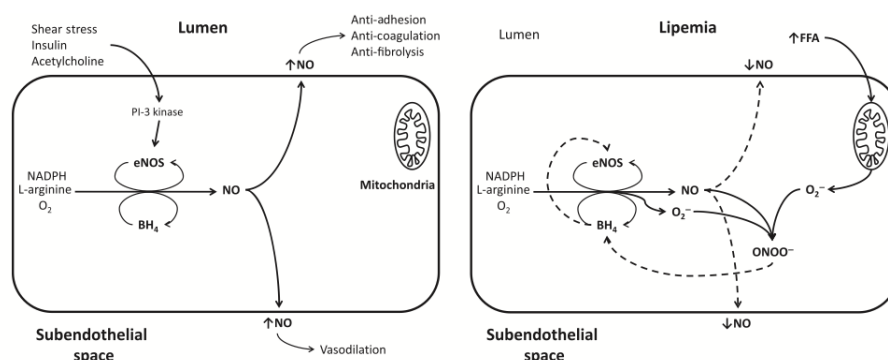


Figura 11. Producción de NO en la célula endotelial en condiciones normales (izquierda) y en el estado de lipemia postprandial que conduce a la disfunción endotelial (derecha). Tomado de Wallace y cols. (2010) [198].

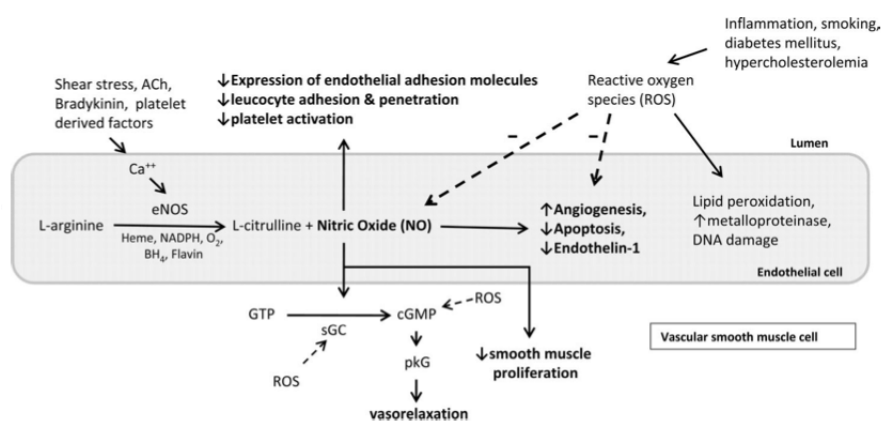


Figura 12. Formación y mecanismos de acción del NO. Tomado de Pathvardhan [200].

fiere una extraordinaria reactividad química tras ser producido por la eNOS. Se sintetiza en las propias células endoteliales en respuesta a estímulos fisiológicos como la hipoxia o la tensión de cizallamiento de la pared del vaso a partir de un átomo de nitrógeno del grupo guanidin-terminal de L-arginina en presencia de determinados cofactores [200](**Figura 12**).

Al tratarse de un gas muy reactivo, su vida media es corta, con una duración de entre 5 y 40 segundos. Rápidamente se transforma, al ponerse en contacto con agua y oxígeno, en nitratos y nitritos, [NO(*x*)], que constituyen los productos finales estables de la liberación de óxido nítrico en el organismo (**Figura 13**).

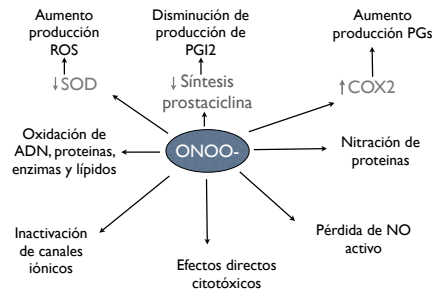


Figura 13. Efectos de los peroxinitritos.

Dado que la proporción relativa de cada uno de ellos es difícil de determinar en una muestra, es la suma de la concentración de estos productos de degradación, más estables que el propio NO, la que se considera como marcador indirecto de la biodisponibilidad de NO. Éste además de transformarse en $\text{NO}(x)$, puede reaccionar

con el anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) en condiciones de elevado estrés oxidativo, originando peroxinitritos ($\text{NOO}\cdot$), que han demostrado tener un efecto tóxico sobre las células y se han relacionado con procesos inflamatorios y ateroscleróticos [201]. Por tanto la biodisponibilidad del NO dependerá tanto de su cinética de formación por la NOS como de la degradación del mismo por las EROs del microambiente vascular [202].

El NO tiene efectos beneficiosos para la salud al ser antiimitótico, antiinflamatorio, antitrombótico y antioxidante. Inhibe además la agregación plaquetaria impidiendo la progresión del fenómeno aterosclerótico [203].

La hipercolesterolemia, la DM tipo 2, la hipertensión arterial o el tabaquismo se han asociado a una menor producción de NO o a un aumento de la degradación de NO [204]. Cualquier estrategia encaminada a incrementar la biodisponibilidad del NO en estos pacientes podría ser beneficiosa para contrarrestar el alto RCV que presentan.

2.3.4. Influencia de la alimentación sobre la función endotelial.

La relación entre dieta y función endotelial se ha evaluado en diversos estudios epidemiológicos. En un trabajo prospectivo del año 2004 llevado a cabo con 732 enfermeras que siguieron dos patrones dietéticos diferentes, uno de ellos caracterizado por una alta ingesta de vegetales, frutas, cereales enteros, pesca-

do y pollo, y el otro, de tipo occidental, caracterizado por un elevado consumo de carne roja, cereales refinados y patatas fritas, observaron que las participantes que siguieron la primera dieta mostraron concentraciones más bajas de E-selectina en comparación con aquellas que consumieron la dieta de tipo occidental [205]. La dieta rica en vegetales se caracterizaba por un bajo consumo de grasas saturadas y ácidos grasos *trans*, acompañado de un alto consumo de frutas y vegetales, alimentos ricos en sustancias antioxidantes. Posteriormente se ha observado que el consumo de frutas y vegetales en pacientes hipertensos conlleva una mejoría de la función endotelial [206]. La mayoría de los trabajos realizados posteriormente se han centrado en analizar los efectos que podrían tener el contenido graso de la dieta sobre la función endotelial. La sobrecarga grasa ejerce un efecto deletéreo sobre la presión arterial y la función endotelial [207] y que la reducción intensiva de los niveles de lípidos plasmáticos se relaciona con una mejoría de dichos parámetros [208]. Algunos de dichos estudios relacionan la ingesta de ciertos tipos de grasas con la disfunción endotelial (**Figura 14**).

En estos últimos años se ha prestado especial atención al efecto que determinados patrones de alimentación podrían ejercer sobre la función endotelial. Las pruebas científicas existentes hasta ahora señalan ciertos alimentos y nutrientes que ejercen un importante papel modulador, tanto en la inflamación, como en el estrés oxidativo que ocasionan disfunción endotelial [209]. De este modo, se ha visto que el consumo de alimentos que contienen ácidos grasos ω -3, [210, 211] ácido fólico [212, 213], vitamina C y E [214, 215], compuestos fenólicos [58, 37] y L-arginina [216, 217] podrían ejercer efectos beneficiosos sobre la reactividad vascular, bien por disminución de la activación endotelial, bien mejorando la dilatación mediada por el flujo, tanto en individuos sanos como en personas con alto RCV [218]. La DMed, de la que se ha hablado extensamente en el apartado anterior, también ha demostrado ejercer efectos beneficiosos sobre la función endotelial [219]. Por otro lado, las dietas ricas en grasas y azúcares producen un deterioro de la misma [205]. En personas sanas, la ingesta de grasas saturadas

Año	Estudio	Intervención	Objetivo	Resultado
1997	Vogel y cols.	Ingesta rica en grasa vs pobre en grasa	Cambio postprandial FMD	Diferencia entre las dos dietas, descenso FMD tras dieta rica en grasas
1999	Djouisse y cols.	Dieta rica en grasas + vino tinto vs dieta rica en grasas+ placebo	Cambio postprandial FMD	No cambio significativo en FMD
1999	Ong y cols.	Alimentación con AGM + CHO vs alto en CHO	Cambio postprandial FMD	Diferencia entre las dos dietas, descenso FMD AGM + CHO.
2000	Ratakari y cols.	Alimentación con AGS vs AGM	Cambio postprandial FMD tras comida rica en grasas	No cambio significativo FMD
2002	Nappo y cols.	Ingesta comida rica en grasas vs alta CHO	Cambios postprandiales en marcadores plasmáticos	Diferencia entre las dos dietas, incremento de ICAM y VCAM a las 4 horas tras ingesta grasa
2003	Steer y cols.	Ingesta grasa alta, vs baja vs mínima	Cambio postprandial FMD con infusión de metacolina	Diferencia entre las tres dietas, descenso FMD tras rica en grasa, no cambio FMD tras pobre en grasas, mejoría FMD tras mínimo consumo grasa.
2005	Selida y cols.	Alimentación baja en grasas vs alta en grasas	Cambio postprandial FMD tras comida rica en grasas	No cambio significativo FMD
2007	Shimabukuru y cols.	Dieta rica en CHO vs dieta rica en grasas vs dieta estándar	Cambio postprandial FMD	Diferencia entre las tres dietas, deterioro FMD tras ingesta grasa
2008	Pacheco y cols.	Acetate de oliva vs acetate de girasol enriquecido con ácido palmítico	Modificación postprandial en sICAM, sVCAM	Diferencia entre las dos dietas, disminución de ICAM y VCAM solo tras la ingesta de aceite de oliva
2008	Fuentes y cols.	Dieta rica AGS vs dieta rica en AGM vs baja en grasas enriquecida con alta linoléico	Función endotelial postprandial medida con laser Doppler	Diferencia entre las tres dietas, incremento de la función endotelial tras ingesta de AGM
2010	Pérez Martínez y cols.	Dieta rica en AGM vs rica en AGS vs rica en CHO suplementada con n-3 vs rica en CHO	Vasodilatación dependiente de endotelio	Diferencia entre tres dietas, mejoría de la vasodilatación tras AGM comparada con AGS y CHO

Figura 14. Relación entre la fuente de energía de la dieta y la disfunción endotelial.

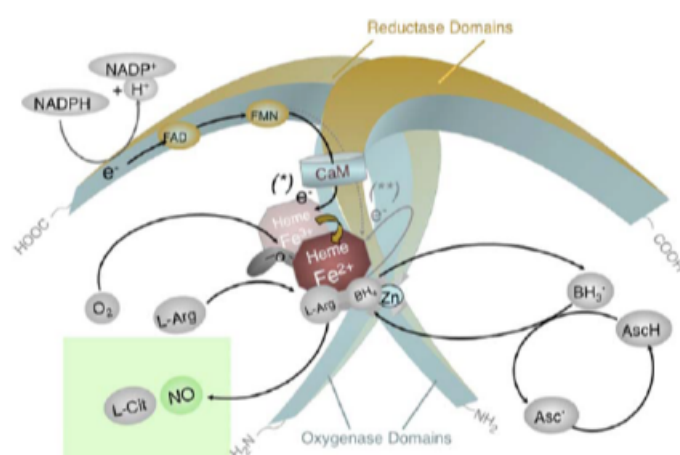


Figura 15. Óxido nítrico sintasa endotelial. Förstermann 2010[64].

provoca mayor alteración de la función endotelial que aquellas grasas propias de la DMed [220, 59, 221]. Algo similar ocurre en pacientes hipercolesterolémicos [58, 222]. El aceite de oliva ha demostrado poseer efectos beneficiosos sobre la función endotelial, tanto en la dilatación mediada por endotelio [58] como en las moléculas de adhesión endotelial [48]. Probablemente parte de este efecto beneficioso se deba a la acción que ejercen sobre el endotelio los compuestos fenólicos contenidos en el aceite de oliva virgen, ya que la mejoría de la respuesta vasodilatadora postisquémica es tanto mejor cuanto mayor es la concentración de estas sustancias en el aceite [37].

2.3.5. Influencia de la variabilidad genética sobre la función endotelial: análisis de polimorfismos genéticos de NOS.

La NOS tiene un papel crucial en mantener una adecuada biodisponibilidad de NO, lo que facilita la homeostasis del tono vascular cuando se producen cambios en las necesidades de flujo sanguíneo local. Esta enzima forma parte de un grupo complejo de proteínas que catalizan la conversión de L-arginina en NO y L-citrulina (**Figura 15**).

Existen al menos tres isoformas de la NOS con funciones y localizaciones diferentes. Con un 50–60 % de homología en la secuencia de aminoácidos (**figura**

	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3
Nombre común	nNOS	iNOS	eNOS
Tipo celular	Neuronas	Macrófagos	Endotelio
Cromosoma	12	17	7
Patrón de expresión	Constitutiva	Inducible	Constitutiva
Localización intracelular	Sarcolema	Soluble	Caveola
Localización	Dominio N-terminal PDZ	No disponible	Miristoilacion N-terminal
Regulación	Calcio calmodulina	Transcripción	Calcio calmodulina Fosforilación
Producción	Alto	Medio	Bajo
Función	Señalización	Toxina	Señalización
Procesos biológicos	Aprendizaje/memoria Neurotransmisión Funciones autonómicas	Inflamación Respuesta inmune	Vasodilatación Proliferación celular Adhesión leucocitaria Trombosis

Figura 16. Isoformas de la NOS.

16) comparten en su estructura dominio N-terminal, un dominio oxigenasa con dominios heme, L-arginina y tetrahidrobiopterina (BH₄), una región central de unión a calmodulina y un dominio reductasa terminal con sitios de unión para nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido (NADPH), flavin adenina dinucleótido (FAD) y flavina mononucleótido (FMN).

Para su acción enzimática requieren la presencia de varios cofactores como NADPH, FAD, FMN y BH₄. Tanto eNOS como nNOS son isoformas constitutivas calcio-dependientes que generan pequeñas cantidades de NO para el mantenimiento de las funciones biológicas. iNOS, por el contrario, es una isoforma calcio independiente implicada en la producción de grandes cantidades de NO durante periodos prolongados.

eNOS se localiza en las caveolas, estructuras funcionales, dinámicas y especializadas que se aprecian como invaginaciones de la membrana plasmática, aunque también como vesículas, racimos citoplasmáticos o estructuras transcelulares. Por lo general tienen forma de letra omega invertida, presentando un diámetro de 50-100nm. Se caracterizan por la presencia de caveolina, una

proteína palmitoilada integrada a la membrana mediante uniones a colesterol y glicosfingolípidos, cuya oligomerización da lugar a la formación de caveolas [223]. Están presentes en diferentes tipos celulares, sobre todo en células endoteliales. Sirven como plataforma de señalización celular y regulación de la cinética de transporte de vesículas a través de la membrana plasmática. Juegan un papel fundamental en la regulación de la función endotelial, ya que múltiples rutas de señalización relevantes, relacionadas con la patogenia de diferentes factores de RCV, convergen en las caveolas, regulando así la actividad de la eNOS. Se sabe que la interacción directa entre eNOS y Cav-1 (la caveolina mayoritaria en las caveolas endoteliales), más concretamente con su dominio SD, inhibe la actividad de la enzima [224, 225]. En modelos de ratón deficientes en APO-E y *knock-out* para el gen que codifica la proteína Cav-1 (CAV1) se ha comprobado que la pérdida de Cav-1 disminuye ciertas moléculas proaterogénicas como CD36 y VCAM-1 [226]. Por tanto, las alteraciones en las caveolas endoteliales podrían contribuir al deterioro de la función endotelial [227].

Por otro lado, también se ha comprobado que animales de experimentación deficientes en eNOS desarrollan hipertensión arterial y disfunción endotelial [228] reversibles al transferir dicho gen al animal, quedando de manifiesto el importante papel de la eNOS en el mantenimiento de la homeostasis endotelial [229]. La activación de eNOS como respuesta a la presión de cizallamiento puede estar mediada por dos mecanismos diferentes. Un mecanismo se activa vía calcio dependiente, como respuesta rápida a estímulos sobre el endotelio y otra, a largo plazo, mediada por la fosforilación de un residuo de tirosina, menos influenciada por las fluctuaciones de concentración de calcio intracelular [230, 231]. El otro mecanismo de activación de la eNOS depende de la fosforilación de un residuo de serina. Cuando la célula endotelial se expone al estrés de cizallamiento, se produce la fosforilación del residuo S1177 de eNOS mediado por AKT1 [232] y otras kinasas como protein kinasa A (PKA) y AMPK [233].

El gen que codifica la eNOS se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 (35-36). Son varios los polimorfismos que se han identificado asociados a esta

región. De ellos, el más estudiado es el Glu298Asp (G894T, rs1799983) caracterizado por un cambio en la posición 894 de una guanina por una timina en el exon 7, que se traduce en un cambio del aminoácido glutámico a aspartato en el codón 298. Éste es el único polimorfismo del gen que conlleva un cambio en la secuencia aminoacídica, que si bien no supone alteración de su conformación, sí parece influir en su función al facilitar que ciertas proteasas ocasionen un *cleavage* intracelular de la proteína [234]. La sustitución crea una unión débil Asp-Pro que la hace especialmente susceptible en este punto a la fragmentación proteica mediante hidólisis ácida. Estos resultados no se han podido replicar en posteriores estudios y algunos autores consideran que dicho fenómeno se trata de un artefacto de laboratorio y no de una realidad biológica [235].

La presencia de este polimorfismo se ha relacionado con el desarrollo de enfermedad coronaria, infarto de miocardio, resistencia insulínica, lípidos plasmáticos [236, 237] y DM tipo 2 [238]. Un metaanálisis reciente también lo ha asociado con el desarrollo de hipertensión arterial esencial [239] (**Figura 17**).

Año	Autor	Población	Resultados
2001	Lembo G. y cols.	375 pacientes hipertensos con/sin placa aterosclerótica	Homocigosis para el alelo T es un factor de riesgo independiente para arteriosclerosis carotídea.
2001	Lesson CPM y cols.	248 voluntarios sanos.	Homocigosis para el alelo T se relaciona con una menor FMD en hombres fumadores y en el grupo entero con concentraciones elevadas de n-3FA.
2007	Tamamoto H y cols.	337 pacientes diabéticos	Portadores del alelo T tienen mayor incidencia de CI.
2008	Imamura A y cols.	110 participantes sanos	Portadores del alelo T tenían concentraciones más altas de LDLc y más bajas de HDLc y vasodilatación dependiente del endotelio.
2008	Lin NT y cols.	120 pacientes con CVD vs 78 controles sanos	El polimorfismo Glu298Asp es un factor de riesgo CYD en una población de Taiwán.
2008	Sawada T. Y cols.	1694 voluntarios sanos	Alelo T está débilmente relacionado con HTA, pero incrementa el riesgo de HTA cuando se asocia a concentraciones elevadas de lípidos.
2010	Isordia Salas I y cols.	180 voluntarios < 45 años con SCACEST y 180 controles sanos	Alelo T es un factor de riesgo independiente para SCACEST en una población mejicana.
2010	Velloso MW y cols.	100 pacientes con IC y 103 controles sanos	Alelo T se asocia a hipertensión en pacientes con IC.
2010	Salimi S y cols.	241 pacientes con CI y 261 controles sanos	Alelo T es un factor de riesgo independiente para CI.
2011	Elhul y cols.	108 pacientes con infarto lacunar aterotrombótico vs 193 controles sanos.	El alelo T se relacionó con peor pronóstico.
2011	Li J y cols.	510 hipertensos vs 510 normotensos	El alelo T se relacionó con la presencia de HTA.
2011	Rahimi y cols.	207 pacientes con CI vs 92 controles	El alelo T se relacionó con aumento de riesgo de CI en esa población.

Figura 17. Estudios que han relacionado la presencia del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) con la enfermedad cardiovascular.

2.4. Análisis de alto rendimiento y métodos computacionales en Nutrigenómica

Clásicamente, en biología molecular se ha utilizado la estrategia de reducir la complejidad de los sistemas biológicos analizando de forma aislada alguna de sus partes y viendo qué factores modifican su estado cuando un número limitado de variables son alteradas de forma controlada en el laboratorio. Este método ha sido válido para dar respuesta a enfermedades monogénicas, por lo general poco frecuentes, ocasionadas por la ausencia o disfunción de una proteína derivada de una mutación en el gen que la codifica. Sin embargo, esta aproximación, que tantos descubrimientos ha permitido en el área de la genética clásica, no ha sido suficientemente útil para abordar el estudio de enfermedades como el cáncer, la DM o el Alzheimer, cuyo desarrollo está condicionado por la alteración de múltiples genes que codifican proteínas que interaccionan en redes y cuya regulación resulta más compleja. Esta nueva visión ha venido favorecida por el mejor conocimiento que se tiene de los mecanismos de regulación de la expresión génica y el enorme desarrollo que han tenido las plataformas tecnológicas de alto rendimiento desde finales de los años 90, conocidas como *microarrays*, y que permiten el análisis simultáneo de cientos de miles de reacciones con una sola muestra biológica. Estas plataformas, utilizadas en el campo de investigación de la genética hacen posible, por ejemplo, el análisis masivo de polimorfismos (SNPs y CNVs), la cuantificación de la expresión génica, el estudio de la expresión diferencial de isoformas de ARNm en diferentes tejidos o el análisis del grado de metilación de las zonas reguladoras génicas.

2.4.1. *Microarrays* de expresión génica.

En 1995 Schena publica en la revista Science el primer estudio en el que se utiliza una plataforma de *microarray* para monitorizar la expresión de varios genes en paralelo de *Arabidopsis Thaliana* [240]. Posteriormente fueron apareciendo más publicaciones que utilizaban *microarrays* para medir de forma global

aquellos cambios de expresión génica bajo diversas condiciones celulares, identificando genes expresados anormalmente en muestras de cáncer en humanos [241]. Desde entonces, el uso de *microarrays* se ha ido extendiendo progresivamente, de forma que en la actualidad son múltiples las aplicaciones que se dan a este tipo de plataformas. De este modo, se pueden utilizar para predecir el pronóstico de determinadas enfermedades [242], clasificar muestras en grupos basándose en sus patrones de expresión [243], detectar variaciones de secuencias entre individuos de la misma especie [244] o estudiar cómo los genes se expresan en diferentes condiciones [245].

La enorme cantidad de información y la rapidez en obtenerla facilitarían el proceso de traslación de resultados a la práctica clínica, permitiendo desarrollar, en menor plazo de tiempo, tanto estrategias preventivas y de diagnóstico precoz en subgrupos de población de alto riesgo, como el diseño de esquemas terapéuticos de forma individualizada [246]. De hecho, su uso en el campo de la Farmacogenómica ha facilitado el descubrimiento de nuevos fármacos y dianas terapéuticas, así como la identificación, de forma precoz, de posibles efectos secundarios derivados de los mismos.

A continuación describiremos los aspectos metodológicos más relevantes relacionados con el uso de *microarrays* de expresión génica.

Diseño y metodología. Un *microarray* de expresión génica se puede definir como una superficie inerte de varios milímetros de área sobre la que se han fijado de forma matricial miles de sondas que están identificadas con aquellos genes cuya expresión se quiere cuantificar mediante la hibridación con el ARN de la muestra biológica en cuestión. El grado de hibridación por complementariedad entre la sonda y el ARN se pone de manifiesto mediante una señal de fluorescencia que se mide por análisis de imagen, indicando el nivel de expresión del gen correspondiente a la sonda en la muestra problema.

Tipos de *microarrays* de expresión génica: Existen fundamentalmente dos tipos de *microarrays* de expresión génica: los *microarrays* de dos colores

(*spotted microarrays*) y los *arrays* de oligonucleótidos. Los primeros se fabrican mediante una técnica llamada fotolitografía en la que una secuencia nucleotídica de cadena sencilla se sintetiza directamente *in situ* sobre placas de vidrio. Las secuencias de oligonucleótidos generalmente tienen 25-60 pares de bases. Los más frecuentes de este tipo son los *arrays* de *Affimetryx GeneChips®*, en los que cada gen está representado por un conjunto de secuencias cortas que lo caracterizan. El segundo tipo son los *microarrays* de cADN, que usan secuencias de ácidos nucleicos largas, de cientos a miles de pares de bases, a modo de sonda. Los ácidos nucleicos se producen mediante la clonación de sus secuencias a partir de bases de datos y se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos *arrays* son los más utilizados para comparar la diferencia en la expresión de genes de dos muestras diferentes de ARN.

Procesamiento de la muestra biológica: Un paso crucial es el aislamiento de ARN de las células o tejidos que queremos estudiar. Dado que los patrones de expresión pueden cambiar, en función de la temperatura o de determinados reactivos de conservación, es fundamental que el material sea rápidamente congelado y que las siguientes etapas de la extracción de ARN sean llevadas a cabo de forma cuidadosa y rápida [247]. En la mayoría de los protocolos se requieren entre 25 y 100 μg de ARN total, que no es tan fácil de conseguir si hacemos experimentos con células o tejidos humanos, por lo que se han desarrollado métodos para aumentar la sensibilidad y reducir la cantidad de ARN necesarios. Una de estas estrategias es la amplificación por transcripción *in vitro*, con la que de 1 μg de ARN se obtienen 50 μg de cARN marcado. Si ésta estrategia se combina con la síntesis de cADN, se aumenta la amplificación aún más. Tras obtener las muestras de cADN, se marcan con un colorante fluorescente generalmente con tintas Cy-3/Cy-5 para cada miembro del par de muestras que se va a hibridar en cada *array*. El uso de diferentes tintas permite que la hibridación del ARN de dos poblaciones celulares diferentes emita luz con diferentes longitud de onda, haciendo posible que dos muestras se puedan

mezclar e hibridar a la vez (**Figura 18**).

Una vez marcadas, se dejan hibridar, en un proceso que dura varias horas, en unas condiciones específicas de temperatura y movimiento. La hibridación es la reacción de afinidad en la que se unen las muestras de cADN marcadas con sus complementarias inmovilizadas en la superficie del *array*. A continuación se lleva a cabo el lavado de los *arrays* para eliminar las interacciones inespecíficas de la muestra con el material inmovilizado y la superficie del mismo. Finalmente, se realiza la lectura mediante un escáner que capta la señal emitida por cada muestra, permitiendo identificar la razón de intensidades en cada punto entre ambos canales de fluorescencia. Con un *software* de adquisición, la imagen se captura en un formato de 16 bits y los datos de intensidad bruta, ruido de fondo y relación de señales son transformados a un formato numérico que sea posible tratar estadísticamente.

Análisis de los resultados. Los experimentos con *microarrays* producen datos de expresión génica de miles de genes. Se obtienen largas listas de medidas de intensidad de puntos y cocientes de intensidad al comparar las muestras problema. El desafío consiste por tanto, en tamizar esa ingente cantidad de información para encontrar resultados significativos. Se necesitan herramientas de computación y técnicas estadísticas robustas para analizar e interpretar los datos, diferenciando la señal real del ruido de fondo encontrado en ellos.

Los tipos de análisis que se pueden realizar y la calidad de los resultados vendrán determinados por el diseño experimental del estudio, por lo que es necesario que el planteamiento del mismo sea meditado antes de comenzar a recoger las muestras biológicas de los pacientes. El uso de estas plataformas supone un elevado coste, por lo que el diseño debe tener en cuenta la manera de minimizarlo, controlando los posibles sesgos biológicos y técnicos y definiendo con claridad el objetivo principal del estudio.

Se sabe que diferentes cADNs incorporan el marcador fluorescente con una eficiencia distinta durante la preparación de las muestras y que además se hibri-

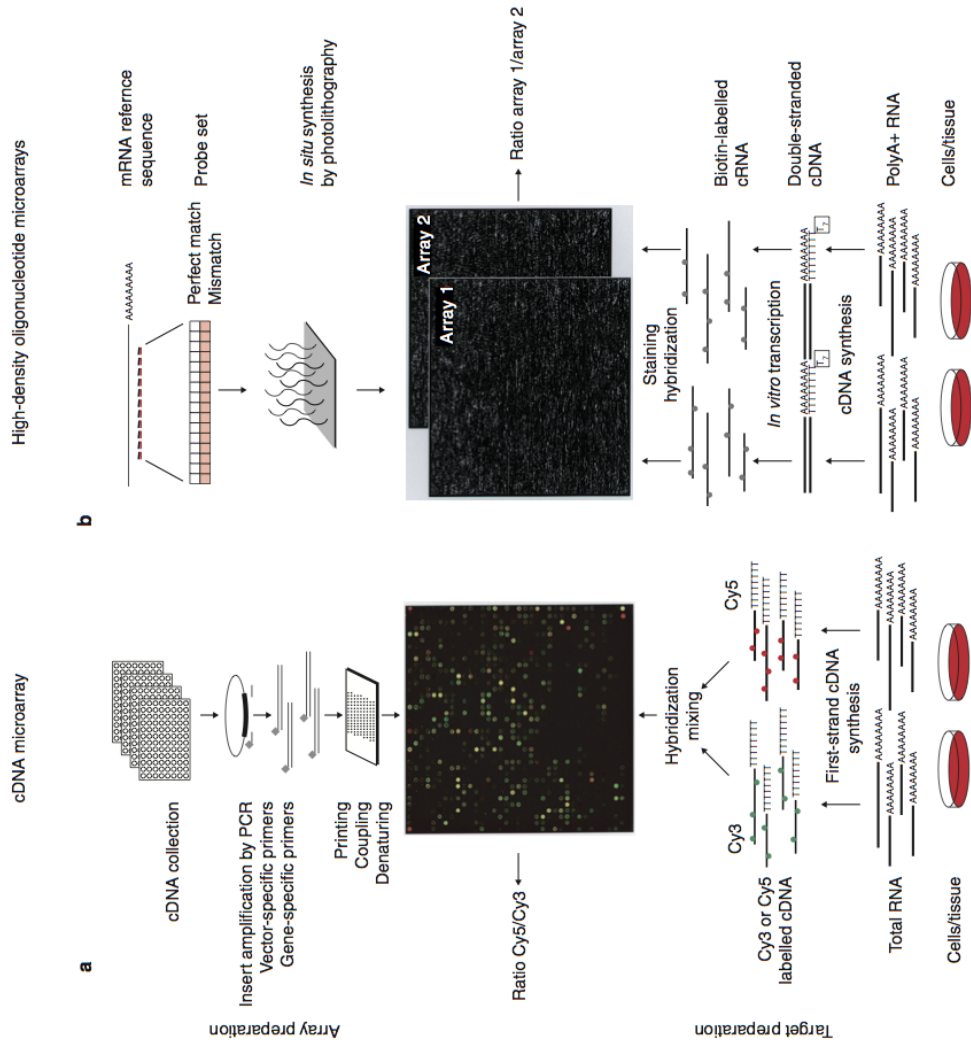


Figura 18. Procesamiento de las muestras para la utilización de *microarrays*.

dan con sus sondas complementarias de la placa con diferentes tasas. Además, en los *arrays* de cADN no se sabe exactamente qué cantidad de ADN hay inmovilizado en cada punto. Por ello, muchos autores recomiendan el marcado recíproco con intercambio de tintas (*dye swap*) para minimizar estos posibles errores técnicos.

La realización de réplicas es otro método para intentar disminuir estos errores que ha reducido de forma importante los falsos positivos, pero que puede resultar limitado por el elevado coste que supone aumentar el número de placas y por la disponibilidad de muestras. Las réplicas pueden ser bien biológicas, es decir, el número de muestras obtenidas para el experimento, o bien técnicas, que son cada una de las copias que se hacen de las muestras biológicas. Lo ideal es trabajar maximizando el número de réplicas biológicas, pero como se comentó previamente, a veces no se dispone de material suficiente y hay que recurrir a las réplicas técnicas, o mejor, a la combinación de ambas. La variabilidad, como vemos, será de naturaleza biológica, intrínseca a todos los organismos e influida por factores tanto genéticos como ambientales, y técnica, que debemos evitar en la medida de lo posible.

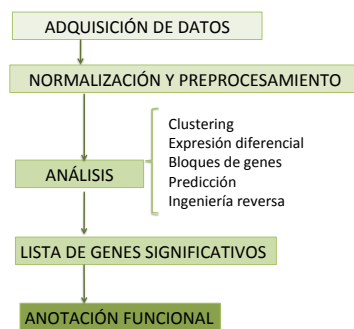


Figura 19. Flujo de trabajo en el análisis de *microarrays*.

La verificación de los datos posteriormente con otra técnica puede ayudar a evitar esta variabilidad. La tecnología los *microarrays* no deja de ser semicuantitativa y ha de ser verificada mediante técnicas cuantitativas como la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). El inconveniente de los estudios con *microarrays* es que son capaces de generar grandes listas de genes con expresión alterada, pero proporciona pocas pistas sobre cuál de esos cambios es suficientemente importante desde el punto de vista

de los genes. La verificación de los datos posteriormente con otra técnica puede ayudar a evitar esta variabilidad. La tecnología los *microarrays* no deja de ser semicuantitativa y ha de ser verificada mediante técnicas cuantitativas como la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). El inconveniente de los estudios con *microarrays* es que son capaces de generar grandes listas de genes con expresión alterada, pero proporciona pocas pistas sobre cuál de esos cambios es suficientemente importante desde el punto de vista

biológico como para condicionar un fenotipo determinado. Por el contrario tiene la ventaja de proporcionar una imagen general de patrones de expresión más que identificando genes de manera individual.

El flujo de trabajo más frecuente para analizar los datos obtenidos con *microarrays* de expresión génica es: adquisición de datos, preprocesamiento y normalización, expresión génica diferencial y minería de datos (**Figura 19**).

Adquisición de datos, preprocesamiento y normalización: Las imágenes escaneadas se convierten en lecturas numéricas de los niveles de fluorescencia con un determinado *software*. Estos valores deberían reflejar los niveles de expresión de los genes, pero no es exactamente así, ya que los valores crudos de fluorescencia pueden contener errores sistemáticos (errores en la obtención, procesamiento y marcaje de la muestra, deficiente hibridación, fallo de lectura, defecto del producto manufacturado) que es necesario eliminar [248]. Por ello se han desarrollado métodos para normalizar dichos datos.

Estos métodos varían según el tipo de *array*, aunque generalmente están basados en la asunción de que la mayoría de los genes no ven alterada su expresión en cualquier estado de la célula. Si la normalización se hace correctamente no debe alterar el contenido de los datos sino que simplemente corrige las desviaciones que surgen durante el proceso de escaneado. Los *arrays* a veces utilizan controles externos negativos, también llamados '*spikes*' (material exógeno de otras especies mezclado con la muestra antes del marcaje de la misma) o controles internos positivos como los genes 'guardianes' (*housekeeping genes*), que en teoría presentan siempre una expresión constante e independiente de cualquier tipo de muestra. Los valores de intensidad de los controles, por tanto, tendrían que mantenerse constantes y podríamos normalizar los datos con referencia a dichos puntos.

Otra alternativa para eliminar los errores sistemáticos es realizar el análisis *lowess* (*locally weighted linear regression*) como método de normalización del efecto dependiente de la intensidad de los valores del $\log_2(\text{ratio})$. La preponde-

rancia relativa de un marcado sobre el otro a veces cambia con la intensidad de las mediciones. Por eso se ajusta el valor la expresión de los canales M en función de la media del logaritmo de la intensidad de los canales A, pudiendo representarse mediante la grafica (plot) MA (**Figura 20**). Este tipo de normalización se basa en que la mayoría de los genes no se encuentran expresados de manera diferencial [249]. Este plot cociente/intensidad puede revelar artefactos en las medidas de intensidad. El análisis *lowess* detecta errores sistemáticos y los corrige llevando a cabo una regresión lineal, suavizando los datos para diagramas de dispersión [248].

Existen plataformas libres con interfaces que facilitan soluciones para el pre-procesamiento de los datos de los *arrays* como GEPAS ³.

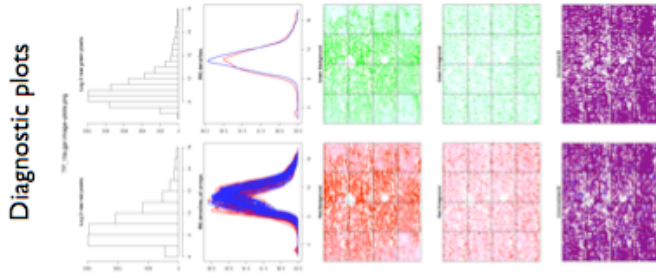
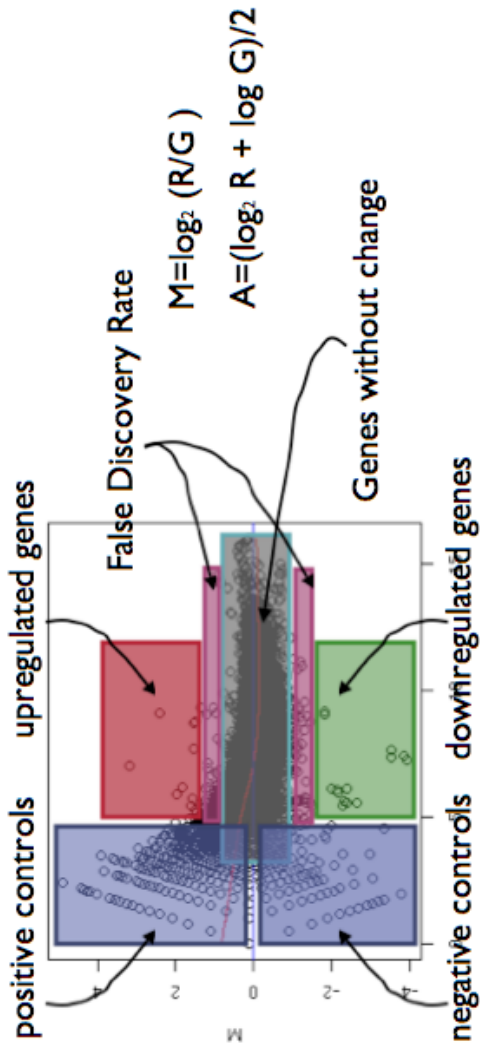
Expresión diferencial: El análisis de expresión diferencial ha sido ampliamente utilizado para seleccionar genes que se comportan de manera diferente en una determinada situación, proporcionando un listado de genes candidatos para posteriores estudios. Para ello se utilizan estadísticos clásicos que evalúan cada gen de manera independiente, como la prueba de la t de Student, t si se analizan dos condiciones, o el análisis de las varianzas (ANOVA) para más de tres muestras, utilizando como valor significativo $p \leq 0,05$ o *false discovery rate* (FDR) $\leq 0,05$, procedimiento que excluye aquellos genes cuya expresión diferencial se encuentre fuera de los límites establecidos *a priori*. El valor de la *p* representa la probabilidad de que existan diferencias de expresión en las clases predefinidas. El FDR actualmente es el estadístico más relevante en los estudios de genómica. Hace referencia a la tasa de error de los genes seleccionados como discriminantes. Corrige el valor de *p* en función del porcentaje de falsas predicciones de cada gen en cada una de las clases predefinidas.

Minería de datos: La minería de datos permite el descubrimiento de nuevo conocimiento utilizando métodos matemáticos y estadísticos avanzados utilizando sistemas computacionales y grandes fuentes de información. Algunos

³<http://www.gepas.org/>

gráficas: normalization

MA plots intra array normalization



inter array normalization

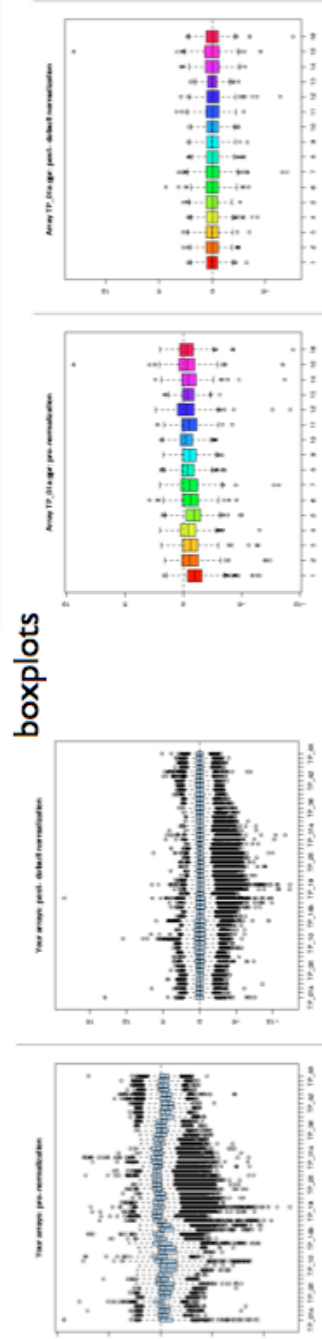


Figura 20. Normalización de arrays.

de los métodos que permiten esta tarea son el *clustering* o agrupamiento, el análisis por bloques de genes, la búsqueda de predictores y la ingeniería reversa. En muchos casos, la fuente de datos con la que se trabaja es la lista de genes expresados diferencialmente que se obtuvo en el paso anterior.

Los métodos de *clustering* son ideales para generar hipótesis que relacionan un conjunto de genes con un fenotipo. Se utilizan también para la búsqueda de biomarcadores ya que se buscan los genes que más cambian en dos condiciones diferentes. Se han utilizado muchos métodos para agrupar los datos procedentes de *microarrays*, incluyendo la inspección visual. Sin embargo, es mejor aplicar métodos estadísticos robustos y fiables como el agrupamiento supervisado (jerarquizado o no) y no supervisado.

El análisis por bloques agrupa los genes según diferentes patrones, basados en conocimiento biológico previo, ya sea información acerca de rutas metabólicas o de patrones expresión publicada en experimentos previos, según su localización cromosómica, su implicación en la misma ruta metabólica, la regulación de los mismos factores de transcripción, etc. Tras ordenar los genes en una lista según su expresión diferencial, se crean conjuntos de genes según los patrones previamente descritos y se intenta explicar si los genes de dichos conjuntos se encuentran distribuidos de manera aleatoria en la lista o están agrupados en una zona determinada de ella, descubriendo así patrones de expresión génica biológicamente importantes [250]. Las listas de genes que se utilizan se extraen habitualmente de bases de datos públicas como GO (*Gene Ontology*), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome*) o BioCarta [251]. Un servicio web generado recientemente en nuestro país para la obtención de conjuntos de genes es WhichGenes⁴. Un método de análisis de bloques es GSEA⁵.

El análisis de predictores identifica de forma supervisada a qué clase pertenece un gen a partir de una muestra conocida y con todos los objetos clasificados. Su uso es complejo y puede presentar múltiples fuentes de error. Requiere grandes tamaños muestrales y validaciones posteriores para evitar el sesgo en las

⁴<http://www.whichgenes.org/>

⁵<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>

predicciones. Están fundamentados en algoritmos computacionales basados en redes neuronales entrenadas para reconocer y categorizar patrones complejos. El reconocimiento de patrones se alcanza ajustando parámetros de la red mediante un procedimiento de aprendizaje con la experiencia. Se pueden introducir datos como los obtenidos de *microarrays* de cADN resultando agrupados en un número predeterminado de categorías.

La ingeniería reversa es un método de análisis en el que se crea una red de interacciones entre genes que permite inferir nuevas funciones que hasta ese momento eran desconocidas. Si el agrupamiento del genoma completo en perfiles de expresión génica ha proporcionado un paso inicial hacia el conocimiento de redes celulares, la organización de estos perfiles en información funcional es bastante más compleja. La ingeniería reversa ha llevado a una nueva clase de métodos que intentan producir de una manera fidedigna representaciones de redes celulares a modo de grafos, donde los nodos representan los genes y las líneas entre ellos representan las interacciones (proteína-proteína o bien gen-proteína)[252].

Análisis funcional: Con independencia del abordaje realizado, al final obtenemos listas que nos dan información acerca del papel que juegan esos genes en un determinado fenómeno, fenotipo o mecanismo biológico. En este sentido, las técnicas de análisis de rutas (*Pathway Analysis*) proporcionan una manera de extraer información de esas largas listas de genes o proteínas obtenidas de los experimentos de alto rendimiento. Existen varios tipos de abordaje:

Enriquecimiento: Evalúa estadísticamente la fracción de genes de una determinada ruta que se encuentran en el set de genes diferencialmente expresados, basándose en términos de Ontología Genética (*Gene Ontology*). La idea del análisis de enriquecimiento consiste en que si un proceso biológico es anormal en un determinado estudio, los genes que forman parte de él tienen más probabilidad de ser seleccionados como grupo relevante en los estudios de alto rendimiento. Se basan en test hipergeométricos. Se pueden crear directamente gráficos acíclicos,

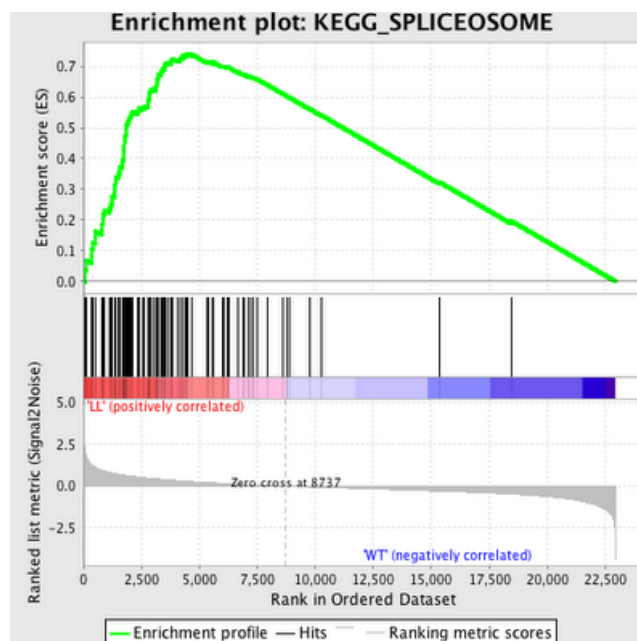


Figura 21. Puntuación de clase funcional

basados en nodos con códigos de diferentes colores basados en la significación estadística de los términos más representados en nuestra lista de genes.

Puntuación de clase funcional: Una de las mayores limitaciones del abordaje anterior es que se basa en asunciones previas de lo que es y no es significativo con estadísticos como el FDR o la tasa de cambio, con la consiguiente pérdida de información de los genes situados en dichos límites, que biológicamente pueden tener tanto o más significado. Además tampoco valora la fuerza de asociación entre los genes y la función biológica en estudio. Los métodos de análisis de rutas o clase funcional utilizan todos los genes así como sus asociaciones estadísticas y llevan a cabo una puntuación de enriquecimiento para grupos de genes (basados en conocimiento funcional previo como GO o rutas KEGG). Gene Set Enrichment Analysis es uno de los abordajes más utilizados en esta categoría. Este da información del ES (enrichment score) o puntuación de enriquecimiento que representa el grado en el que un gen está sobrerrepresentado en el final o en el principio de una lista de genes (**Figura 21**).

Métodos basados en la topología: Los métodos citados previamente, en su

análisis no tienen en cuenta cómo los genes interaccionan unos con otros (activación, inhibición etc.) ni dónde lo hacen (núcleo, citoplasma). Los métodos basados en la topología, tienen en cuenta toda esa información extra que ofrecen las bases de datos para usarlos estadísticas de análisis de rutas.

2.4.2. *Microarrays* de expresión génica en investigación nutricional.

Aunque el campo en el que inicialmente se comenzaron a realizar estudios con *microarrays* fue el de la Oncología, son cada vez más los estudios en Nutrición que utilizan estas plataformas, ya que como se ha comentado con anterioridad, permiten obtener gran cantidad de información acerca del comportamiento de los genes de forma simultánea y el interés por las interacciones genes-nutrición es cada vez más creciente.

En un principio se realizaron estudios basados en animales de experimentación y en cultivos celulares. Se ha demostrado una modulación de la expresión génica del metabolismo lipídico en hepatocitos de ratas en función de la dieta administrada [253] y más concretamente con el aceite de oliva [80]. De hecho en hepatocitos de ratas deficientes en APO E, el consumo de aceite suplementado con fracción insaponificable demostró un efecto modulador sobre la expresión génica subrayando el papel beneficioso de esta fracción del aceite [81]. En células miocárdicas de ratas se ha observado que la dieta puede modular la expresión génica, por ejemplo, administrando ácidos grasos diferentes según el tamaño de sus cadenas y su grado de saturación. Se ha comprobado que el perfil de expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo es mayor tras la administración de AGS comparado con los insaturados, poniendo de manifiesto el papel cardioprotector de éste último tipo de ácido graso [254]. En cultivos celulares humanos de células musculares lisas de arteria coronaria, se ha visto que TG procedentes del aceite de oliva modulaban la expresión génica hacia un perfil menos aterogénico comparado con TG de mantequillas o aceites de semillas [255].

También se han realizado experimentos de intervención dietética en huma-

nos utilizando PMBCs, determinando que el consumo sostenido de una dieta suplementada con AG poliinsaturados produce un cambio en la expresión génica hacia un perfil más antiinflamatorio y menos proaterogénico [256]. En PMBCs de personas obesas sometidas a una dieta baja en calorías se observó que disminuía la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo y la inflamación en comparación con la situación basal [257].

El aceite de oliva ha demostrado, tanto en estudios clásicos como en estudios genómicos, ser capaz de modificar el perfil de expresión de algunos genes cuyos productos proteicos participan en los mecanismos celulares implicados en la defensa antioxidante [79], el metabolismo lipídico o en la patogénesis de la arteriosclerosis. Sin embargo, aún no está claro si dicho efecto regulador de la expresión génica estaría mediado sólo por el ácido oleico o si también los componentes minoritarios que contiene el aceite de oliva virgen podrían estar participando indirectamente a través de su efecto antioxidante o por acción directa sobre diferentes factores de transcripción nuclear.

2.4.3. Métodos predictivos en el estudio de la regulación génica.

Mecanismos de regulación de la expresión génica por microRNAs (miRNAs) y factores de transcripción (TF). Tanto los miRNAs y los TFs son elementos reguladores de la expresión génica. Los miRNAs son secuencias de ARN que se unen a zonas complementarias existentes en las regiones 3'-UTR de los ARNm maduros, generalmente con el objetivo de silenciar la traducción de un amplio número de genes [258]. Se trata de moléculas cortas de ácido ribonucleico de cadena simple, altamente conservadas en organismos eucariotas y consideradas componentes ancestrales evolutivos de regulación genética [259, 260] con gran homología entre especies. De hecho, más de un tercio de los miRNAs de *C. elegans* tienen gran homología con los miRNAs humanos [261]. Se describieron por primera vez en 2001 por tres autores de manera simultánea [262, 263, 264] a partir de las investigaciones que Lee venía haciendo desde el año 1993 en torno al gen *lin-4*, que regula el desarrollo larvario del gusano *C.*

elegans. Este autor observó que *lin-4* no codificaba ninguna proteína sino que producía dos pequeños fragmentos de ARN que mostraban complementariedad con múltiples sitios en la región 3'UTR del gen *lin-14*.

El genoma humano puede codificar información sobre unos 1000 miRNAs que regulan aproximadamente el 60% de los genes [265]. De este modo, cada miRNA regularía cientos de ARN mensajeros (ARNm) a través del reconocimiento y unión a secuencias genómicas específicas de las regiones no codificantes (intergénica, intrones, 3'-UTR), controlando la expresión génica post-transcripcionalmente, al regular la traslación del ARNm o su estabilidad en el citoplasma, de modo coordinado [266].

Los TFs son otros elementos fundamentales en el control de la expresión de genes. Se trata de proteínas que se unen a secuencias específicas del ADN controlando la transcripción del ADN a ARN. Son indispensables para activar el inicio de la transcripción, junto a la ARN polimerasa, ayudando al reconocimiento de la región promotora. Actúan a través del reconocimiento y unión a secuencias genómicas específicas en regiones no codificantes (región promotora, 5'-UTR, intrones). Este no es su único mecanismo de acción, ya que tiene capacidad de unirse a otros TFs, directamente a la ARN polimerasa o incorporarse directamente al complejo de iniciación de la transcripción en presencia de otras proteínas distintas.

Los TFs se pueden clasificar en virtud de su mecanismo de acción, de su función reguladora o de su secuencia específica y su configuración tridimensional. Así, según su mecanismo de acción, distinguimos: TFs generales, *upstream* y específicos. Los TFs generales se requieren para el mecanismo de inicio de la síntesis del ARN en todos los promotores [267]. Se unen a la ARN polimerasa formando un complejo determinando así el sitio de iniciación. Este tipo de factores junto con la ARN polimerasa constituyen el aparato basal de transcripción. Son necesarios para todos los genes de una clase. Los *TFs upstream* se unen al ADN en alguna zona corriente arriba del punto de inicio de la transcripción. Su actividad no está regulada, son ubicuos y actúan sobre cualquier promotor

que contenga el sitio de unión al ADN. Por último, los TFs específicos se unen a varios elementos reguladores de la región promotora, bien activando o bien reprimiendo la transcripción del gen.

En cuanto a su función, se clasifican en constitutivos, que son los que están presentes en todas las células en todo momento, e inducibles, que requieren activación para su funcionamiento. Hay una gran variedad de TFs de este tipo, pues se requiere su acción para regular un incremento en la expresión o en la represión de determinados genes en numerosas ocasiones.

Herramientas computacionales para la predicción de dianas para miRNAs y sitios de unión para FT (TFBS).

miRNAs. Se estima que más de la mitad de genes codificantes de proteínas en mamíferos están regulados por miRNAs y que la mayoría de los ARNm humanos presentan sitios de unión para miRNAs [268, 269]. A día de hoy, existen unos 1000 miRNAs documentados (miRBase versión 16) [270]. Las reglas por las que los miRNAs se unen a los transcritos no han sido completamente aclaradas, ya que las interacciones miRNA-mARN validadas experimentalmente [271] constituyen solo una pequeña parte de las que posiblemente existen *in vivo*, debido a la complejidad que conlleva la detección experimental a gran escala de dianas para dichas moléculas reguladoras. Esta situación ha conducido al desarrollo de gran variedad de estrategias para predecir potenciales dianas de miRNAs [272, 273]. La mayor parte de estos métodos se basan en el grado de complementariedad con el miRNA en cuestión, seguido de un filtrado en el que se eliminan aquellos sitios que parecen estar conservados en múltiples especies. Los algoritmos más utilizados con sus principales características están resumidos en la **figura 22** [274].

Los criterios de predicción se basan fundamentalmente en los siguientes puntos: complementariedad completa miR-gen diana, conservación interespecies, número de sitios de unión para el mismo miR en un 3'UTR determinado, energía libre del par miR-gen diana, accesibilidad del sitio de unión y estructura

Algoritmo	Características		Resultados		Valoración	
	Parámetros que contribuyen al score final	Conservación entre especies	S	P	Ventajas	Inconvenientes
miRanda	Complementariedad y energía libre de unión	Utiliza filtro de conservación	49%	29%	Beneficioso para predecir sitios con unión imperfecta dentro de la región seed	Baja precisión, muchos falsos positivos
TargetScan	Complementariedad local del contenido AU y posición 3', seed match	Puntuación para cada resultado	21%	51%	Varios parámetros incluidos en el scoring: la puntuación final se correlaciona con downregulación de proteínas	Se omiten sitios con seed pairing pobres
TargetScans	Seed match	Solo se consideran los sitios conservadores	48%	49%	Herramienta simple para la búsqueda de sitios conservados con emparejamiento estricto	Infraestima miRNAs con múltiples sitios de unión
PicTar	Energía de unión, complementariedad y conservación	Se requiere emparejamiento en los sitios conservados	48%	49%	Se favorecen los miRNAs con múltiples alineamientos	No predice sitios no conservadores
DIANA-microT	Energía libre de unión y complementariedad	Se utiliza un conjunto de datos de UTRs conservados entre humanos y ratones	10%	48%	Posibilidad de usar secuencias propias de miRNAs como salida	Omite miRNAs con múltiples sitios de unión
PITA	Energía de accesibilidad al sitio de unión	Utiliza nivel de corte definido	-	26%	Se considera la estructura secundaria de 3'UTR para la interacción	Baja eficiencia comparado con otros algoritmos
Rns22	Patrón de reconocimiento y energía de plegamiento	No incluido	-	24%	Permite identificar sitios de unión para miRNAs aun desconocidos	Baja eficiencia comparado con otros algoritmos

Figura 22. Resumen de algoritmos de predicción de sitios de unión a miRNAs y sus principales diferencias.

secundaria miRNA- gen diana.

El algoritmo miRanda [275] se basa en una comparación de complementariedad de los miRNAs con regiones 3'UTR. Incorpora interacciones miRNA-mARN de diferente naturaleza. Se seleccionan miRNAs con múltiples sitios de unión en la región 3'UTR, lo que contribuye al aumento de la especificidad pero infraestima miRNAs con un único, pero perfecto, sitio de unión. Tiene en cuenta las relaciones evolutivas de las interacciones de una manera más global, centrándose en la conservación de las secuencias de miRNAs y en la presencia de un sitio de unión homólogo del miRNA al ARNm [276].

TFBS. El estudio de la regulación transcripcional es un hecho clave para la comprensión de los mecanismos implicados en la traducción de la señales externas e internas en patrones de expresión génica específicos para favorecer el desarrollo, relación y diferenciación celular. La regulación transcripcional se logra gracias a la actividad coordinada de proteínas reguladores específicas (factores de transcripción) que reconocen elementos reguladores de unión al ADN (sitios de unión), pequeños fragmentos de ADN localizados en la regiones promotora y 5'-UTR. Dichos elementos reguladores se conocen en inglés como TFBS. A medida que se van teniendo más de datos secuencias y de expresión, el conocimiento de la regulación de genes se basa más en la suma de un abordaje experimental y computacional. Existen varios programas que utilizan la información contenida en bases de datos que con información de TFs y sus TFBS en genes diana [277]. Por ejemplo MAPPER⁶ permite la identificación, visualización y selección de TFBS potenciales en la región promotora y otras regiones de genes humanos utilizando las bases de datos JASPAR⁷ y TRANSFAC⁸ utilizando para la búsqueda, modelos ocultos de Markov [278].

⁶<http://genome.ufl.edu/mapper/mapper-main>

⁷<http://jaspar.cgb.ki.se/>

⁸<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/databases/transpath/search.cgi>

Hipótesis

3. Hipótesis

Los pacientes con SMet presentan mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que la población normal. La existencia de un estado de inflamación crónica de bajo grado condiciona que aparezca precozmente disfunción en el endotelio de sus arterias, incluso años antes de que se pueda demostrar la existencia de placas de ateroma o de que dichas lesiones tengan traducción clínica. Diversos estudios han documentado que la ingesta de aceite de oliva virgen podría mejorar dicha disfunción gracias a los efectos antioxidante, antitrombótico y antiinflamatorio que muchas de las sustancias contenidas en su fracción minoritaria han demostrado, especialmente los compuestos fenólicos. Aunque se ha considerado que la capacidad antioxidante de dichos micronutrientes explicaría muchos de los beneficios observados, no se conoce bien si éstos podrían estar mediados por mecanismos más específicos a nivel celular.

Al diseñar el presente trabajo, planteamos como hipótesis que ciertos genes pudieran estar implicados en la mejoría de la función endotelial observada al consumir aceite de oliva virgen, considerando que la relación entre genes y aceite de oliva, pudiera ser bidireccional. Así, por un lado, determinados polimorfismos genéticos podrían estar condicionando cierta variabilidad en el beneficio observado y, por otro, dichos compuestos podrían, a su vez, estar modificando el patrón de expresión de genes cuyas proteínas participan en los fenómenos biológicos que llevan a la disfunción del endotelio.

Objetivos

4. Objetivos

1. Objetivo principal: Analizar si el polimorfismo Glu298Asp de NOS3 (rs1799983) condiciona diferencias en la respuesta vasodilatadora endotelial tras la ingesta de tres tipos de aceite de oliva que tienen diferente contenido en compuestos fenólicos.
2. Objetivos secundarios:
 - 2.1.-Estudiar si los cambios en la respuesta vasodilatadora endotelial se asocian a variaciones en la concentración de eNOS y de NO(x) y si éstas vienen determinadas por la diferente composición en compuestos fenólicos y/o el genotipo de NOS3 Glu298Asp (rs1799983).
 - 2.2.-Evaluar, mediante plataformas de análisis de alto rendimiento, si existen diferencias de expresión génica tras la ingesta del aceite con alto contenido en compuestos fenólicos en comparación el aceite de baja concentración en dichas sustancias.
 - 2.2.-Investigar, a través del uso de herramientas de Biología Computacional, elementos reguladores (miRNAs, TFs) potencialmente involucrados en los cambios de expresión génica observados tras la ingesta de los aceites con diferente concentración en compuestos fenólicos.

Diseño y Metodología

5. Diseño y metodología

5.1. Criterios de inclusión y exclusión.

Población estudiada.

La población procedía de las Consultas Externas de la Unidad de Lipidos y Arteriosclerosis de la Unidad Clínica de Medicina Interna del Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba).

Tamaño de la población.

El objetivo principal del estudio fue detectar diferencias en la vasodilatación dependiente del endotelio tras la ingesta de 3 aceites que solo se diferenciaban en su concentración en compuestos fenólicos. Por eso se consideró como variable principal la diferencia en la respuesta vasodilatadora medida por láser Doppler. El cálculo del tamaño muestral se realizó a partir de los resultados de trabajos descritos en la bibliografía. Para este estudio, que tiene un diseño aleatorio, secuencial y cruzado, resultaban necesarios $n=52$ pacientes para poder detectar, con un poder estadístico de $(1-\beta)=0,90$, una diferencia mínima esperada del 26 % y un error $\alpha=0,05$ entre las intervenciones alimentarias, tomando una desviación estandar de 45. En el cálculo del tamaño poblacional se tuvieron en cuenta unas pérdidas estimadas del 10 %, por lo que la población calculada de estudio final fue de $n=60$ pacientes.

Proceso de selección.

A los candidatos se les realizó una entrevista clínica recogiendo información sobre el estilo de vida (consumo de tabaco, bebidas con alcohol, té o café y tipo de alimentación habitual), antecedentes familiares (sobre todo de enfermedad cardiovascular precoz) y antecedentes personales sobre consumo de medicamentos, suplementos nutricionales o vitamínicos. Asimismo se llevó a cabo una exploración física general recogiendo las medidas antropométricas y constantes vitales listadas a continuación.

Medidas antropométricas y constantes vitales:

- Peso.
- Talla.
- Perímetro de cintura.
- Perímetro de cadera.
- Presión arterial sistólica y diastólica.

Se procedió a la extracción de una muestra de sangre para analizar hemograma y bioquímica plasmática general, así como una muestra de orina para la determinación de proteinuria de 24 horas. A partir de los datos obtenidos, se estableció si el paciente era candidato a participar en el estudio en función de los siguientes criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- Edad comprendida entre los 18 y 70 años.
- Al menos 3 de los siguientes criterios:
 - Índice de masa corporal $\geq 30 \text{ Kg.m}^2$ o perímetro de cintura $> 88\text{cm}$ (mujeres) ó $>102 \text{ cm}$ (hombres).
 - Glucemia plasmática en ayunas $> 100 \text{ mg.dL}^{-1}$
 - Concentraciones plasmáticas en ayunas de colesterol HDL $< 40 \text{ mg.dL}^{-1}$ (hombres) ó $< 50 \text{ mg.dL}^{-1}$ (mujeres).
 - Concentraciones plasmáticas de TG $> 150 \text{ mg.dL}^{-1}\text{mg/dL}$.
 - Cifras de presión arterial sistólica y/o diastólica mayores a 130 y 85 mmHg respectivamente.

Criterios de exclusión:

- Embarazo o periodo de lactancia.
- Consumo habitual de tabaco, complejos vitamínicos o más de 30 gramos de alcohol al día.
- Antecedentes o diagnóstico actual de DM tipo 2.
- Antecedente en los últimos 12 meses de cáncer.
- Diagnóstico de enfermedad crónica de tipo inflamatoria (hepática, renal o tiroidea) y/o toma continuada de fármacos inmunosupresores, antiagregantes, antihipertensivos o antiinflamatorios.
- Antecedente personal de enfermedad cardiovascular (infarto de miocardio, ángor, arteriopatía periférica) o cerebrovascular (infarto cerebral, accidente isquémico transitorio).
- Antecedente de enfermedad psiquiátrica grave (depresión mayor o esquizofrenia).
- Haber participado en los últimos 6 meses en algún programa de reducción de peso.

5.2. Intervención alimentaria.**Tipos de aceites.**

A partir de un aceite de oliva virgen extra (CANOLIVA[®] Antonio Cano e Hijos[™], Córdoba, España) se obtuvieron tres tipos de aceite con diferente concentración en compuestos fenólicos pero similares en el resto de componentes químicos, HPOO, MPOO, LPOO. Para obtener un aceite con baja concentración de compuestos fenólicos se procedió a la extracción física de dichos compuestos a partir del aceite de oliva virgen extra mediante lavado con agua bidestilada en diferentes embudos. La mezcla del agua con el aceite se agitó durante 3 minutos y se dejó reposar para facilitar el proceso de separación. Se deshechó la fase acuosa

y se repitió el proceso 7 veces a temperatura ambiente y con protección para la luz a fin de evitar la oxidación de éstos compuestos. Se obtuvo así un aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos (70 ppm) ya que mediante este método de extracción es la mínima cantidad residual que puede permanecer en el aceite. El aceite con contenido medio de compuestos fenólicos se obtuvo al mezclar a partes iguales los dos aceites previos (HPOO y LPOO). Se determinaron las concentraciones de micronutrientes más importantes, tales como tocoferoles y ácidos grasos. Para cuantificar la concentración de tocoferol en los aceites de oliva se llevó a cabo la separación de sus distintos isómeros mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con el cromatógrafo Perkin-Elmer (Perkin Elmer, SGE Scientific, Australia) y su detección por fluorescencia con el detector de diodos de batería Beckman modelo 186 (Beckman™, Palo Alto, CA, USA) utilizando el método IUPAC 2432 (IUPAC, 1992). La composición en ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gas en un sistema automático Perkin-Elmer (SGE Scientific, Australia) de acuerdo con la regulación europea 2568/91 (CE, 1991), utilizando el ácido cafeico como control interno. La concentración de polifenoles presente en cada aceite se cuantificó mediante HPLC (Varian® ProStar, Palo Alto, CA, USA).

Diseño del estudio.

Estudio que compara tres intervenciones alimentarias en humanos, utilizando un diseño aleatorizado, secuencial y cruzado. Las intervenciones consistieron en la administración de tres desayunos preparados con tres tipos de aceite de oliva cuya composición química sólo difería en el contenido de compuestos fenólicos (un aceite con alto, otro con medio y otro con bajo contenido). Los desayunos se administraron en tres días diferentes, separados por una semana de lavado.

Los participantes fueron asignados de forma aleatoria a recibir un desayuno cada día de la intervención que consistió en 40 mL de cada uno de los tres tipos de aceite de oliva virgen junto a 60 gramos de pan de harina blanca de forma secuencial y cruzada siguiendo el esquema que se detalla en la **Figura 23**.

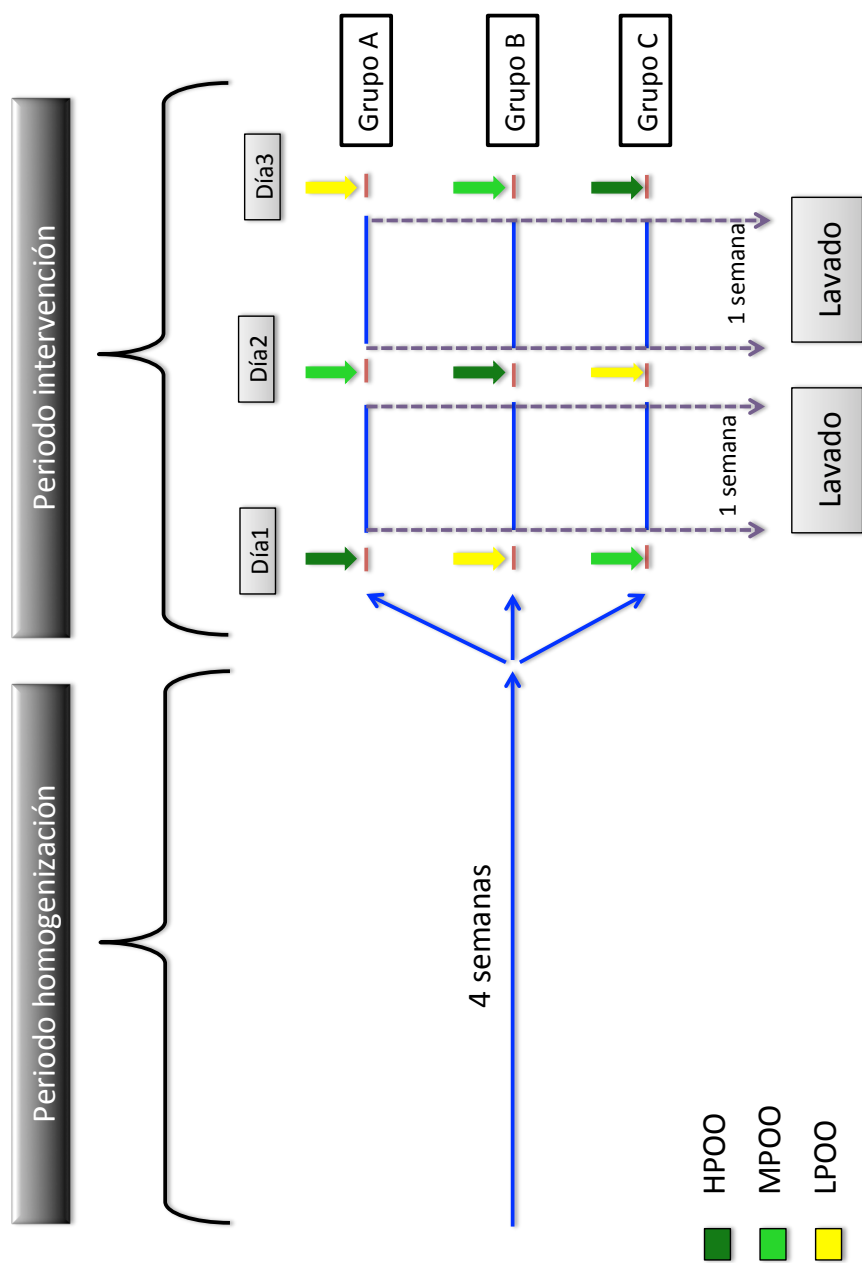


Figura 23. Diseño de la intervención.

Durante la realización del estudio se indicó a los participantes que siguieran una dieta de homogeneización rica en hidratos de carbono (CHO) basada en 20 menús, y la indicación de no tomar complementos vitamínicos ni potenciales fuentes de compuestos fenólicos (soja, chocolate, aceite de oliva virgen extra, té, café, vino, etc). De esta manera se pretendía controlar la variabilidad atribuible a las diferencias existentes entre los participantes debidas a los patrones de alimentación que tuvieran antes de entrar en el estudio. Este tipo de dieta CHO fue consumida desde 4 semanas antes del primer desayuno hasta finalizar el estudio. 24 horas antes de acudir al hospital para recibir cada desayuno, se les indicó que evitasen realizar ejercicio físico intenso.

En la mañana de la intervención sólo se les permitió la ingesta de agua *ad libitum*. Con el fin de conocer el grado de adherencia a las dietas CHO y al resto de recomendaciones alimentarias, se realizaron encuestas alimentarias semicuantitativas al inicio del estudio y los días de intervención, así como recordatorios de 24 horas de forma telefónica a las 2 y 4 semanas. Se realizaron extracciones de sangre venosa a los 0, 30, 60, 120 y 240 minutos de la ingesta de cada desayuno. Se midió la función endotelial microvascular mediante láser Doppler antes y 120 y 240 minutos tras cada desayuno (**Figura 22**).

Obtención de muestras biológicas.

Se obtuvieron en cada tiempo 20 mL de sangre venosa, empleando agujas *Venoject*[®] (Terumo[™]), tubos conteniendo 1 mg.dL⁻¹ de EDTA y tubos con citrato sódico al 3,8% (Vacutainer[™]). A continuación se depositaron en un recipiente con hielo y protegidos de la luz intentando evitar así su exposición a la luz, aire y temperatura ambiente. El plasma se obtuvo mediante centrifugación a baja velocidad a 1500 G durante 15 min a 4°C de temperatura dentro de la primera hora tras la extracción sanguínea. Las muestras de sangre se almacenaron posteriormente alicuotadas en un congelador a -80°C hasta su análisis. Se procedió de la misma manera en cada uno de los tiempos de extracción.

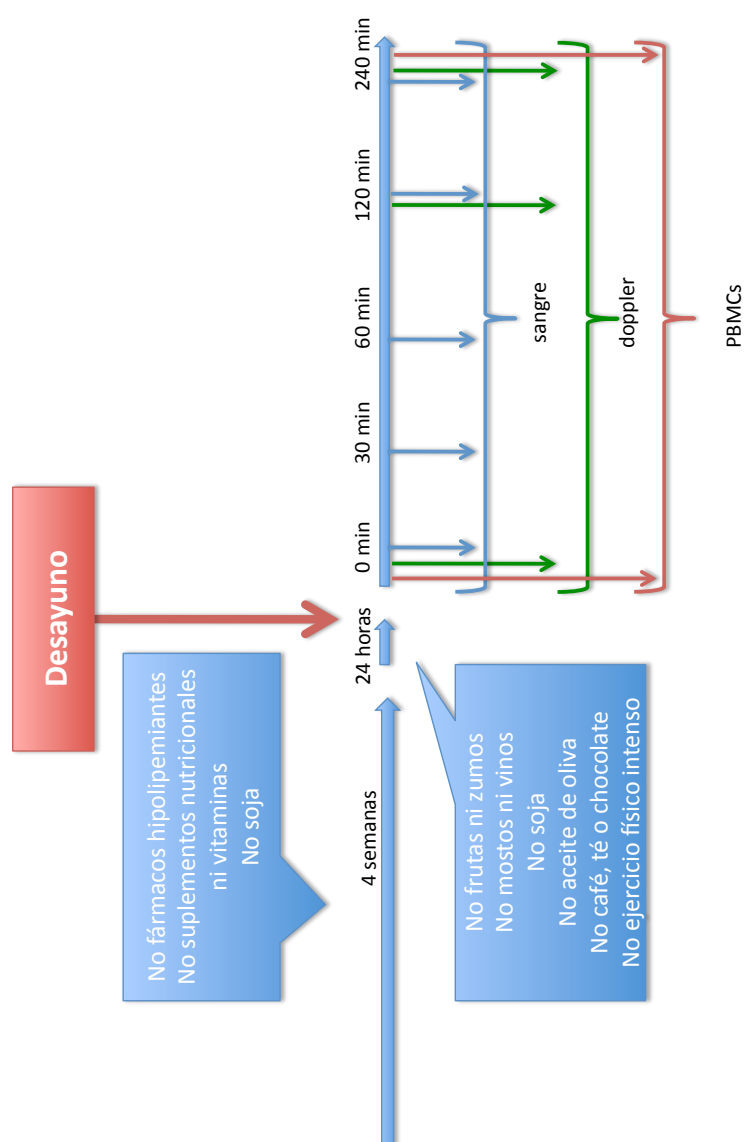


Figura 24. Esquema de trabajo del día de la intervención.

5.3. Concentración postprandial de marcadores inflamatorios, del metabolismo glucídico y lipídico.

Parámetros inflamatorios.

Se determinó la concentración de PCR de alta sensibilidad en plasma, por muestra y por duplicado, mediante turbidimetría con un analizador *DDPP-800 Hitachi*[®] (Roche[™], Basilea, Suiza) así como la IL6, cuyas concentraciones plasmáticas se determinaron en ayunas y 240 minutos tras el desayuno, por muestra y por duplicado, mediante ELISA utilizando el Kit comercial *Quantikine Human IL-6 Immunoassay* (R&D Systems GMBH, Wiesbaden-Nordenstadt, Alemania).

Marcadores del metabolismo lipídico.

Lipemia postprandial: Al finalizar el estudio se analizaron las concentraciones de CT, HDL-c, TG y apolipoproteína A-I (APO A-I) y B (APO B) en un autoanalizador modular *DDPPII Hitachi*[®] (Roche[™], Basilea, Suiza), utilizando reactivos de la casa comercial Boehringer-Mannheim (Mannheim, Alemania), por muestra y por duplicado. Las determinaciones de CT y TG se realizaron mediante test enzimáticos colorimétricos, con los métodos CHOP-PAP [279] y GPO-PAP [280], utilizando un calibrador universal (Roche[™], Basilea, Suiza) y controles ciegos (Vitro[™]). Para la determinación de HDL-c se utilizó un método enzimático colorimétrico tras precipitación con polietilenglicol 6000 (*Peg-6000*) [281]. La cuantificación de APO A-I y APO B se realizó por inmunoturbidimetría automatizada en el equipo Array-Beckman[®] (Barcelona, España), con controles y calibradores de la misma casa comercial [282]. El valor del colesterol en lipoproteínas de baja densidad (LDL-c) fue calculado mediante la fórmula de Friedewald usando los valores de CT, HDL-c y TG [283].

Ácidos grasos libres no esterificados (NEFAs): Se realizó la determinación de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados en ayunas

y tras 30, 60, 120 y 240 minutos de la ingesta de los diferentes tipos de aceite, por muestra y por duplicado, mediante ensayo colorimétrico enzimático (Roche Diagnostics™, Penzberg, Alemania).

Parámetros del metabolismo glucídico.

Glucosa: Se analizaron las concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas y tras 30, 60, 120 y 240 minutos de la ingesta de los diferentes tipos de aceite de oliva, por muestra y por duplicado mediante el analizador *Hitachi 917* por el método de la glucosa oxidasa (GOD-PAP; Boehringer™, Mannheim, Alemania).

Insulina: Se determinaron las concentraciones plasmáticas de insulina en ayunas y tras 30, 60, 120 y 240 minutos de la ingesta de los diferentes tipos de aceite de oliva, también por muestra y por duplicado, mediante inmunoensayo de micropartículas (Abbott Diagnostics™, Matsudo-shi, Japón).

5.4. Análisis del genotipo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) sobre la vasodilatación mediada por el endotelio.

Parámetros de función endotelial.

Para el estudio de la función endotelial se utilizó el Láser Doppler lineal Periflux 5000® (Perimed S.A.™, Stockholm Sweden). El protocolo para la medición del flujo sanguíneo capilar comenzó por colocar al sujeto en posición de decúbito supino, relajado en una habitación a temperatura estable de entre 20-25°C. Se situó la sonda del láser en la cara palmar de la segunda falange del segundo dedo de la mano derecha y un manguito compresor (HG Erkameter 300™, Erka, Bad Tolz, Germany) colocado 5 centímetros por encima del codo derecho. Se esperó 1 minuto para relajar al participante y a continuación se realizó una lectura basal del flujo sanguíneo durante 1 minuto (t_0). Seguidamente se insufló el esfigmomanómetro hasta alcanzar una presión de 200-220 mm Hg, comprobando que se mantenía estable en el cero, la línea de registro. Se mantuvo en este modo

durante 4 minutos tras los cuales se deshinchó el manguito y se registró el flujo postisquemia durante 1 minuto más (td).

De cada registro se analizaron varios parámetros: porcentaje de cambio del área bajo la curva (iABC), hiperemia reactiva post isquemia (PORH) pico, PORH basal y PORH máxima (**Figura 23**). Se obtuvieron tres registros por paciente y día; uno en situación basal antes de la intervención, a los 120 minutos del desayuno y finalmente a las 4 horas. Los registros obtenidos fueron transmitidos y almacenados en el programa informático *PeriSoft*[®] para Windows.

Los parámetros que se calcularon fueron: el incremento del area bajo la curva (iABC) del flujo tras la isquemia mediante la siguiente fórmula:

$$iABC = [(ABC_{td} - ABC_{t_0}) * 100 / ABC_{t_0}]$$

y la PORH pico según la siguiente fórmula:

$$PORHPico = PORHBasal + PORHMaximo$$

Además se consideraron para el análisis la PORH maxima y PORH pico.

Concentración plasmática de eNOS.

La concentración plasmática de eNOS se determinó mediante ensayo colorimétrico conforme a las instrucciones del fabricante con el *Nitric Oxide Synthase Assay Kit, Colorimetric* (Calbiochem[®], La Jolla, California, EE.UU).

Concentración plasmática de NO_(x).

La concentración de NO_(x) en plasma es un indicador indirecto de la bio-disponibilidad de óxido nítrico. Para su determinacion fue necesario purificar las muestras con filtros *Microcon YM-10*[®] (Micon Bioseparations, Millipore[™], Billerica, MA, USA). Tras equilibrar cada filtro con agua ultrapura, se cargaron con 200 µL de plasma EDTA de cada muestra y se centrifugaron a 12.000 rpm

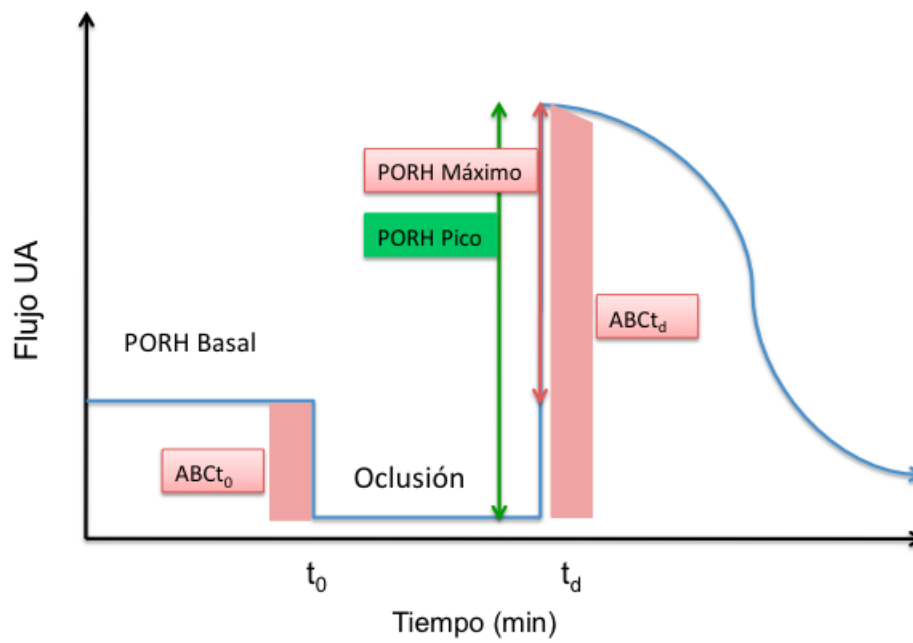


Figura 25. Esquema del registro láser Doppler de flujometría.

durante 20 min con la centrifuga *Microfuge 11*[®] (Beckman[™], Palo Alto, CA, USA). Posteriormente se ensayaron, por muestra y por duplicado, 80 μL de este filtrado con el kit comercial *Nitrate/nitrite Colorimetric Assay LDH method Kit*[®] (Cayman Chemicals[™], Ann Arbor, USA).

Genotipado del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983).

Aislamiento del ADN: El ADN se extrajo a partir de 10 mL de sangre recogida en tubos de EDTA ($1\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$) como anticoagulante. Posteriormente se centrifugaron (2500 rpm, 20°C, 15 min) en una centrifuga *Beckmam modelo J-6* (Beckmam[™] Coulter España S.A, España) para separar la capa de leucocitos. Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad para evitar la contaminación. La extracción de ADN genómico se hizo a través del kit *QiAamp*[®] *DNA Blood Mini Kit* (Qiagen[™], Hilden, Alemania). Se obtuvo un rendimiento de 3-6 μg de DNA/200 μL de sangre total con una pureza aproximada de 1,8 en la relación de absorbancia 260nm/280nm. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría UV/V con *NanoDrop 1000* (Termo TM Scientific[™], Boston, EEUU). Además se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 % para verificar la calidad del DNA.

Genotipado del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) mediante

PCR-RFLP: De cada paciente se obtuvo el genotipo del polimorfismo NOS3 Glu298Asp mediante RFLP utilizando para la PCR 300ng de ADN genómico, 0,5 μL de Taq polimerasa *BIOTAQ*[™] 5 U. μL^{-1} (Bioline, London, Reino Unido), 2 μL de *PCR Buffer* 10X sin Mg^{2+} (Bioline, London, Reino Unido), 1,6 μL de MgCl_2 25 mM (Bioline, London, Reino Unido), 1,6 μL de dNTPs 2 mM (Bioline, London, Reino Unido) y 1 μL (15 pmol. μL^{-1}) de cada cebador (*Fw*: 5'- CCC TGT CCT GCT CCC T -3' y *Rev*: 5'- CTC AAA CGC TAC AGG G-3') todo ello en un volumen final de 20 μL de H_2O . La PCR se realizó con el termociclador *Stratagene Mx3005* (Agilent[™], Stratagene Products Division, La Jolla, CA, USA) de modo que, con cada muestra, el ADN fue desnaturalizado a

94°C durante 5 min, seguido de 40 ciclos consistentes cada uno de una primera fase de desnaturalización (94°C, 35 sg), otra de alineamiento (59°C, 35 sg) y finalmente una de elongación (72°C, 40 sg), con una extensión final de 7 min a 72°C. A continuación, 10 µL del producto obtenido de la PCR fueron sometidos a digestión con 5U de la enzima de restricción *Mbo I* (Fermentas™, Madison, WI, EEUU) en un volumen final de 30 µL, durante 16h a 37°C. Los productos obtenidos fueron separados mediante electroforesis no desnaturalizante de agarosa al 2,5%. Se visualizaron en el transiluminador ultravioleta *Gel Printer Plus* (Tecnología para Diagnóstico e Investigación S.A.™, Madrid, España). Las bandas observadas correspondían a los genotipos GG (206 pb), GT (119 pb) y TT (87 pb).

5.5. Análisis de la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica.

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

Se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de muestras de 30 mL de sangre periférica recogidas en tubos con EDTA (1 mg.dL⁻¹.) como anticoagulante, extraídas 4 horas después de la ingesta del desayuno basado en aceite de oliva (alto y bajo contenido). Posteriormente se centrifugaron (2500 rpm, 20°C, 15 min) en una centrífuga Beckman modelo J-6 (Beckman™, Coulter España S.A, España). La capa leucocitaria se diluyó en proporción 1:2 en PBS y las células se separaron en 5 mL de gradiente de Ficoll (solución de aislamiento de linfocitos, Rafer, Zaragoza, España) mediante centrifugación a 2000 x g durante 30 min. Las PBMCs se recogieron y se lavaron por duplicado con PBS frío.

Extracción de ARN, cuantificación y calidad del ARN total.

Se extrajo el ácido ribonucleico (ARN) total de las células mononucleares utilizando el reactivo *TRI* (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) y posteriormen-

te se limpió mediante el kit de limpieza *RNeasy Mini Elute* (Qiagen™, Hilden, Germany). El ARN total obtenido se cuantificó usando un espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 v3.5.2* (Nanodrop Technology®), Cambridge, UK). La integridad de dicho ARN se evaluó mediante migración en gel de agarosa 1,6% TBE 1x, considerandose apto para la hibridación de los arrays si las muestras presentaban bandas intactas correspondientes a las subunidades 18S y 28S del ARN ribosómico.

Obtención, amplificación y marcado del ADNc.

Las muestras de ARN se marcaron usando el kit comercial de amplificación de *ARN SuperScript Indirect RNA Amplification System™* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) conforme a las instrucciones del fabricante. De manera resumida, se retrotranscribió 1 µg del ARN total con la *SuperScript™ III Reverse Transcriptase* para posteriormente sintetizar una segunda cadena complementaria con el uso de ADN polimerasa I y de ADN ligasa. Se llevó a cabo un solo paso la amplificación y el marcaje mediante ARN polimerasa T7 con los fluoróforos *Alexa Fluor® 555* y *Alexa Fluor® 647* (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). La tasa de incorporación del marcador se evaluó con el espectrofotómetro *Nanodrop® ND-1000 v3.5.2* (Nanodrop Technology®), Cambridge, UK) considerando un marcaje adecuado si dicha incorporación se encontraba entre 8 y 12 pmol.µL⁻¹.

Diseño del estudio.

Se generaron perfiles de expresión génica utilizando la plataforma de *ADNc microarray Whole Human Genome Oligo Microarray G4112A* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Cada microarray contiene 45.220 sondas o pruebas para explorar 30.886 transcritos humanos. Se utilizaron dos réplicas técnicas con sus correspondientes intercambio de tintas (*dye-swap*) resultando, de este modo, cuatro réplicas por cada muestra biológica. En cada uno de los *arrays* se comparó el ARN de PBMCs obtenido tras la toma de aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos con el ARN de PBMCs

obtenido después de la ingesta de aceite de oliva virgen con bajo contenido en dichos micronutrientes tal y como se detalla en el siguiente esquema (**Figura 24**).

Hibridación y lectura de la señal de los arrays.

La hibridación se realizó utilizando el kit *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent™, Santa Clara, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello se mezclaron 825 ng de cada muestra de ARN amplificado y marcado con reactivo bloqueante y tampón de fragmentación, siendo todo incubado 30 minutos a 60°C. El proceso de hibridación se llevó a cabo a 65°C durante 17 h en un sistema de rotación continua dentro de la cámara de hibridación de acuerdo con el manual de Agilent. Posteriormente los *arrays* se desmontaron para ser lavados con las soluciones I y II según las instrucciones del fabricante, para posteriormente ser secados con una pistola de nitrógeno antes de su lectura con un escáner *GenePix 4000B* (Axon Instruments, Union City, USA). Los datos crudos de lectura se obtuvieron con el *software Agilent Feature Extraction Software (v9.5)* (Agilent™, Santa Clara, CA, USA)

Normalización y análisis de expresión diferencial.

Las señales ajustadas de fondo (*BGSubSignal*) se calcularon con el programa *Agilent Feature Extraction Software (v9.5)* y se filtraron con el *Flag IsWellAboveBG*. El cociente del \log_2 de la señal centrada (rojo/verde) se normalizó dentro del *array* y entre los *arrays* mediante el uso del ajuste tipo *lowess* de los modelos lineales creados para cada gen con el uso del paquete *Limma*⁹ del entorno de programación y análisis estadístico *R (GNU)*, teniendo en cuenta que se trata de un diseño que tiene dos réplicas técnicas con sus respectivas réplicas con intercambios de tinta.

Se analizó la expresión diferencial de los genes contenidos en cada *array* comparando el aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos con el de

⁹<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>

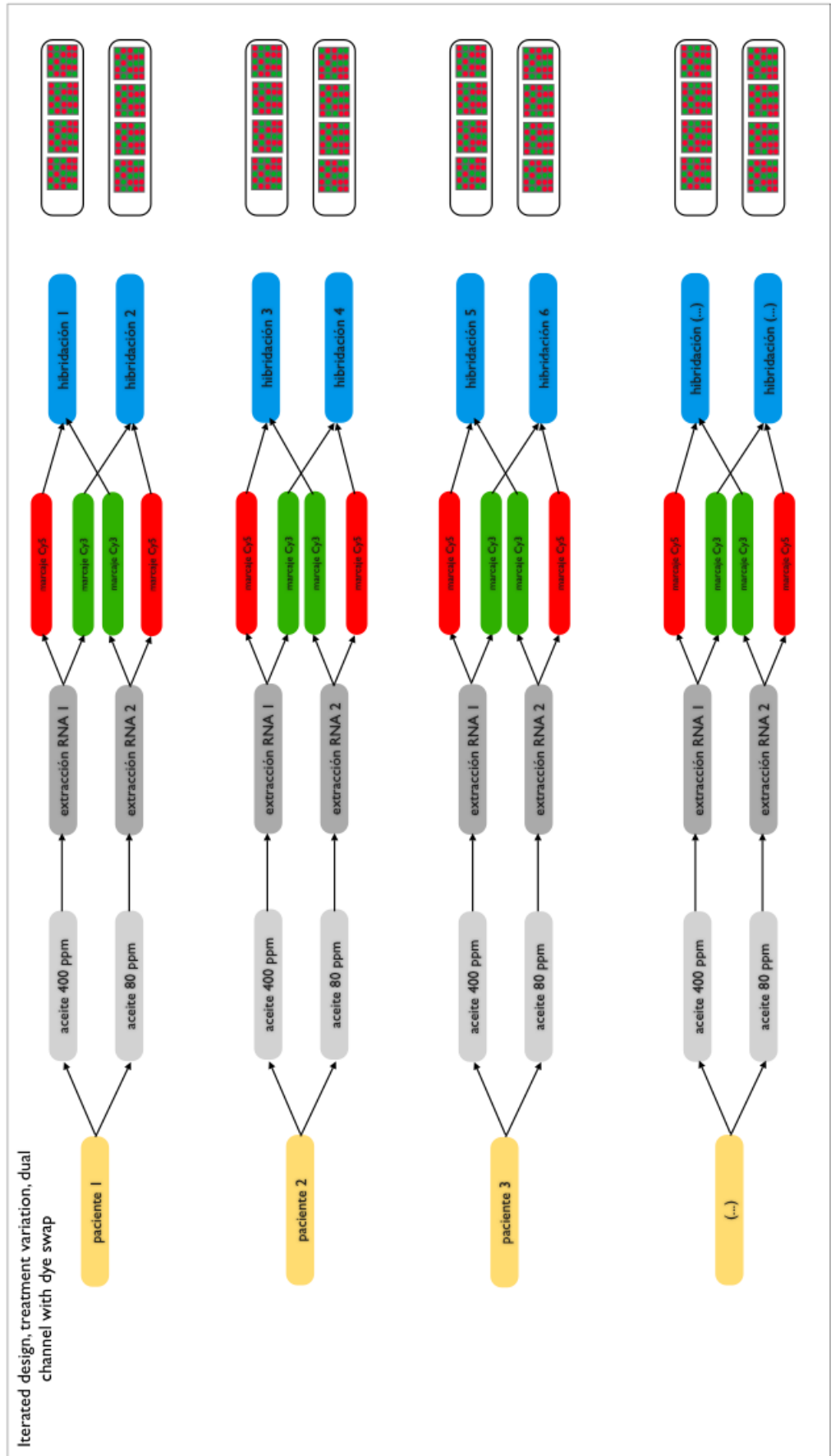


Figura 26. Diseño del experimento con microarrays.

alto contenido en dichos compuestos a las 4 horas de la ingesta del mismo. Se utilizó para dicho análisis el paquete *MARRAY*,¹⁰ del entorno de programación y análisis estadístico *R (GNU)*. Para considerar un gen como diferencialmente expresado, se utilizaron criterios de filtrado combinando el valor de M (\log_2 ratio de la señal) mayor de 0,5 (sobrexpresado) o menor de -0,5 (reprimido) (*fold change* 1,4 y -1,4 respectivamente) y la significación estadística (p) de $\leq 0,01$ del modelo lineal ajustado para cada gen. Los resultados se ajustaron por el efecto del cruce de tintas y por la FDR utilizando el método de Benjamini y Hochberg [284].

Validación de los resultados mediante qRT-PCR.

Se procedió a la amplificación mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) de los ARN de los genes expresados diferencialmente. Para ello se seleccionaron los 4 genes con mayor valor absoluto de Fc. Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador *Stratagene Mx3005* (Agilent Technologies™ Stratagene Products Division, La Jolla, CA, USA) usando el kit comercial *iQ SYBR Green Supermix* (Bio Rad™ Laboratories, Hercules, CA, USA) en un volumen final de 20 μ L con 10 pmol de cada cebador. Cada reacción se llevó a cabo con 1 μ L de una dilución 1:5 (v/v) de la primera hebra de ADNc, sintetizada usando 1 μ g de ARN total con el kit comercial *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio Rad™ Laboratories, Hercules, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción se sometió a incubación a 96°C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de 30 sg a 96°C, 30 sg a 62°C, 20 sg a 72°C y 10 sg a 80°C, momento en el que la intensidad de fluorescencia se midió para evitar señales de ruido de fondo y de formación de homodímeros de cebadores. Los cebadores utilizados fueron:

ERG1-Up: (5'-CTACGAGCACCTGACCGCAGAG-3')

ERG1-Low: (5'-CCAGGGAAAAGCGGCCAGTATAG-3')

JUN-Up: (5'- GACCTTCTATGACGATGCCCTCAA-3')

JUN-Low: (5'-ACGTCGGGCGAGGTGAGGAGGTC-3')

¹⁰<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/marray.html>

IL1B-Up: (5'-GGGACAGGATATGGAGCAACAAGT-3')

IL1B- Low: (5'-GCTTATCATCTTTCAACACGCAGGA-3')

PTGS2-Up: (5'-ATGAGTTATGTCTTGACATCCAGATCAC-3')

PTGS2-Low: (5'-CAAACATCATGTTTGAGCCCTGG-3')

RPL13-Up: (5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3')

RPL13- Low: (5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA-3')

La especificidad de las amplificaciones mediante PCR se evaluó mediante creación de una curva de hibridación (60-95°C con una velocidad de calentamiento de 0,5°C.sg⁻¹ y la medición continua de intensidad de fluorescencia) y mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1,6 % TBE 1X. Los datos se expresaron como valores relativos respecto a las concentraciones de ARNm del gen constitutivo RPL13a. Las eficiencias de los cebadores fueron: EGR1, 98 %; PTGS2, 101 %; IL1B, 96 %; JUN, 108 %; RPL13a, 95 %.

Análisis funcional de los genes expresados diferencialmente.

Con el fin de investigar relaciones funcionales en el conjunto de genes diferencialmente expresados utilizamos el Software de análisis the *Ingenuity Pathway* (Ingenuity Systems, Redwood City, CA USA) que utiliza una base de datos predefinida que contiene información funcional de más de 10.000 genes humanos. Las relaciones funcionales obtenidas del análisis previo se verificaron con una segunda herramienta, *g:Profiler*, que analiza enriquecimiento en términos de ontología genética, rutas metabólicas y sitios de unión a factores de transcripción de una determinada lista de genes. Además utilizamos la aplicación PathJam con el fin de obtener rutas metabólicas en las que se vieran los genes diferencialmente expresados en nuestro experimento [285].

5.6. Predicción de dianas y análisis de enriquecimiento para sitios de unión de Factores de Transcripción y microRNAs.

Listas de genes.

Se analizaron las regiones reguladoras de genes procedentes de dos listas con un tamaño similar, una con los genes cuyos transcritos mostraron variación en el análisis de expresión diferencial al comparar el aceite de oliva rico en compuestos fenólicos con el de bajo contenido en dichos compuestos y otra obtenida al azar mediante el comando `sample (DB, 100)` ejecutado en R (GPL) sobre el archivo que contenía las 45.220 pruebas representadas en la plataforma empleada previamente. La información adicional sobre cada uno de los genes se obtuvo con el servicio web BioMart ¹¹.

Predicción de sitios de unión de factores de transcripción (TF).

Con modelos ocultos de Markov obtenidos con HMMER3 ¹² a partir de las bases de datos TRANSFAC® ¹³ y JASPAR ¹⁴, se utilizó la aplicación MAPPER [278] para predecir TFBS, anotando en cada caso: el modelo identificado, la posición y región genómica, el valor *score* y el *E-value*. El valor *score* es una puntuación asignada por HMMER para cada comparación y representa el grado de ajuste de la región explorada con el modelo evaluado. El *E-value* es un valor estadístico obtenido de cada análisis con HMMER y corresponde a la probabilidad de que la predicción se deba al azar. Valores altos de *score* y bajos de *E-value* se relacionan con predicciones de mayor grado de verosimilitud.

Las regiones genómicas exploradas en la identificación de TFBS comprendían (**Figura 25**): la zona desde -5000 pb hasta el sitio de inicio de la transcripción (+1); la región 5'-UTR, cuando existía; el primer intrón y el resto de intrones.

¹¹<http://www.biomart.org/>

¹²<http://hmmmer.janelia.org/>

¹³<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>

¹⁴<http://jaspar.cgb.ki.se/>

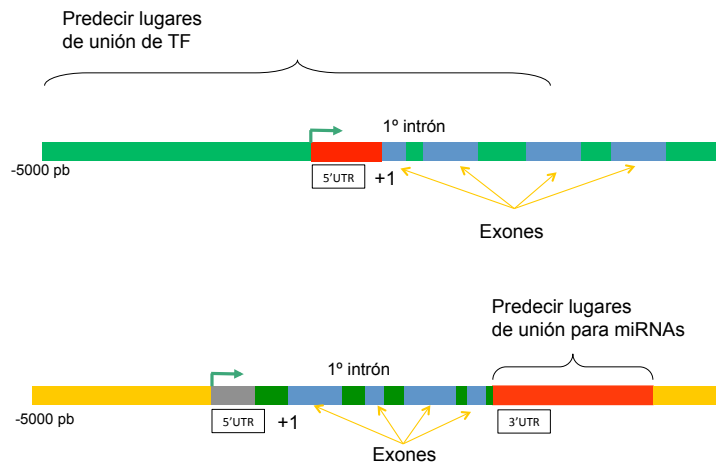


Figura 27. Regiones genómicas exploradas. Los TFBS se exploraron en la zona desde -5000 pb hasta el sitio de inicio de la transcripción (+1), la región 5'-UTR, cuando existía, el primer intrón y el resto de intrones. Los sitios de unión de miRNAs se exploraron en la región 3'-UTR.

Predicción de microRNAs.

Se utilizó el algoritmo TargetScan¹⁵ para la predicción de sitios de unión de miRNAs en la región genómica 3'-UTR (**Figura 25**). Asociados a cada resultado, TargetScan ofrece una puntuación contextualizada del sitio (*Total Context Score*) que considera características de vecindad como son el contenido en AU de las regiones exploradas y la posición de la misma dentro de la secuencia de ARNm [286]. También genera el valor agregado de (P_{CT}) que es un estimador bayesiano de la probabilidad de que dicho sitio esté conservado evolutivamente debido a una presión selectiva. Como las puntuaciones contextuales se calculan en base a información completamente ortogonal al grado de conservación evolutiva del sitio de unión, los valores de *Total Context Score* y (P_{CT}) proporcionan información complementaria sobre la calidad de las predicciones realizadas. Valores de (P_{CT}) agregado >1 y de *Total Context Score* >0 se relacionan con predicciones de mayor grado de verosimilitud. Para aumentar el grado de sig-

¹⁵<http://www.targetscan.org/>

nificación biológica de los miRNAs filtrados con este criterio, se seleccionaron para el análisis de enriquecimiento sólo aquellos para los que se habían predicho sitios de unión en más de 6 genes para cada grupo.

Análisis de enriquecimiento.

Una vez obtenida la relación de predicciones de TFBS y dianas para miRNAs en cada listado de genes, un análisis exacto de Fischer identificó diferencias en las frecuencias de dichas dianas al comparar ambos listados de genes, lo que se interpretaría como mayor o menor frecuencia de aparición de la que se esperaría encontrar por azar. Los factores de transcripción y los miRNAs se clasificaron según la nomenclatura de consenso.

Análisis de coaparición.

Se contabilizaron las ocasiones en que dos o más TFBS diferentes aparecían en una misma secuencia génica, obteniendo los patrones más frecuentes en los que dichos factores se combinaban en el listado 'EVOO list'. Por otro lado, se identificaron las frecuencias con las que uno o más de los miRNAs predichos coaparecían en un mismo resumen bibliográfico junto a términos relacionados con enfermedad cardiovascular, recuperando los términos que aparecían con más frecuencia en el listado 'EVOO' en comparación con la lista *random*.

Red de interacción.

Con Cytoscape 2.8.0¹⁶ se construyó una red de interacción teniendo en cuenta la relación entre los genes y los TF y miRNAs para los que existía un enriquecimiento de sitios de unión en el listado 'EVOO' en comparación con la lista *random*.

¹⁶<http://www.cytoscape.org/>

5.7. Aspectos éticos.

El estudio se ha 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 fue sometido a evaluación por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Reina Sofía. Todos los pacientes fueron informados acerca del estudio y se les solicitó el consentimiento informado escrito antes de entrar en el mismo (**Anexo**).

5.8. Procesamiento general de los datos y análisis estadístico.

Para analizar diferencias estadísticamente significativas entre dos ó más grupos de variables categóricas se utilizó el test de χ^2 y para las variables cuantitativas se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de uno o más factores seguido del test HSD de Tukey para comparaciones múltiples. Previamente se realizaron análisis para ver si dichas variables cumplían las hipótesis de normalidad (mediante gráficas QQ y el Test de normalidad de Shapiro-Wilk), de semejanza de las varianzas u homocedasticidad (mediante el test de Barlett) y de independencia o no colinealidad. Cuando no cumplían estos criterios, se realizó la transformación logarítmica de los datos de la variable. Se calculó el coeficiente de correlación lineal r de Pearson para relacionar las diferentes variables.

Para comprobar si las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo estaban en equilibrio de *Hardy-Weinberg* se realizó un análisis de bondad de ajuste mediante un test de χ^2 con el paquete *HardyWeinberg* implementado para R¹⁷. Los contrastes de hipótesis se realizaron asumiendo un error tipo II de 0,8. Se

¹⁷ [<http://pbil.univ-lyon1.fr/library/genetics/html/HWE.test.html>]

consideraron diferencias estadísticamente significativas, permitiendo rechazar la hipótesis de trabajo, si el valor de p era igual o menor de 0,05 (error tipo I).

Los valores de las diferentes variables se procesaron y analizaron con diversos paquetes de CRAN¹⁸ para R (GNU, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA), un lenguaje y entorno de *software libre* para el análisis estadístico y gráfico¹⁹. Para las búsqueda bibliográfica en MEDLINE se utilizó Entrez de PubMed, los gestores bibliográficos Mendeley, Zotero y Bibdesk v. 1.5.4²⁰ (GNU, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA), para la información relativa a diferentes genes se utilizó BioMart ²¹y el editor de texto L^AT_EX 2.0.0²² (GNU, Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, USA). Se utilizaron además modelos ocultos de Markov obtenidos con HMMER3 ²³ a partir de las bases de datos TRANSFAC[®] ²⁴ y JASPAR ²⁵, la aplicación MAPPER ²⁶ para predecir los sitios de unión de los factores de transcripción. Se utilizó el programa TargetScan ²⁷para la predicción de sitios de unión de miRNAs en la región genómica 3'-UTR.

Utilizando la información existente en *Biomolecular Interaction Network Database (BIND)*²⁸ se confeccionó una red de interacción proteína-proteína (PPI) de 2 niveles, que tenía como núcleo los genes diferencialmente expresados en el análisis previo. Se utilizó Information *Hyperlinked over Proteins (iHOP)*²⁹, en base a referencias bibliográficas, para la extracción automática de nuevas interacciones y de asociación de otras proteínas con nuestra red inicial de PPI. Se utilizó el plugin *NetworkAnalyzer* de la aplicación *Cytoscape 2.8.0*³⁰ para analizar la topología de dicha red e identificar las principales proteínas conectoras

¹⁸<http://cran.es.r-project.org/>

¹⁹<http://www.r-project.org/index.html>

²⁰<http://bibdesk.sourceforge.net/>

²¹<http://www.biomart.org/B>

²²<ftp.lyx.org>

²³<http://hmmmer.janelia.org>

²⁴<http://www.gene-regulation.com/pub/databases>

²⁵<http://jaspar.cgb.ki.se/>

²⁶<http://genome.ufl.edu/mapper/>

²⁷<http://www.targetscan.org/>

²⁸<http://www.bind.ca/>

²⁹<http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>

³⁰<http://www.cytoscape.org/>

(*hubs*). Se utilizó la herramienta gProfiler para el análisis de enriquecimiento de términos GO.³¹

³¹<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>

Resultados

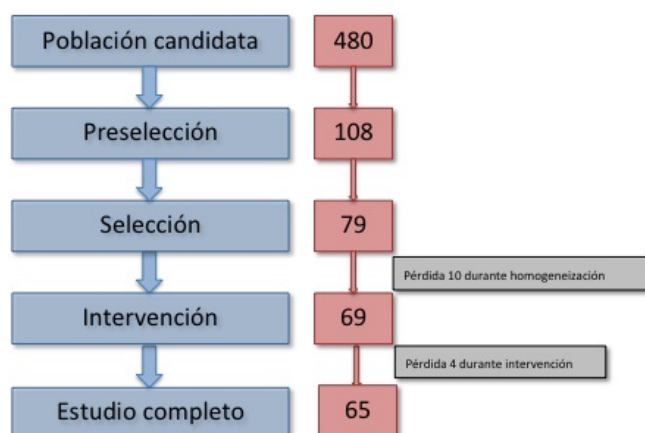


Figura 28. Población de estudio.

6. Resultados

6.1. Características de la población estudiada.

6.1.1. Características demográficas y clínicas

Partiendo de una población de 480 candidatos, 108 individuos cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión. De éstos, 79 aceptaron participar, firmando el consentimiento escrito antes de comenzar el estudio. Diez lo abandonaron durante el periodo de homogeneización. De los 69 que iniciaron la fase de intervención, tan sólo 65 la completaron en su totalidad. Tras evaluar la calidad de los datos obtenidos para el total de parámetros analizados (valores extremos, pérdidas de información), se consideraron para los sucesivos análisis un total de 57 pacientes (**Figura 26**), todos ellos de origen caucásico (22 hombres y 35 mujeres) y una edad media de 56 ± 9 años (36-70). En el momento de la inclusión el peso medio fue de 99 ± 15 Kg y el IMC de $38,7 \pm 4,4$ Kg.m⁻² (**Figura 27**).

6.2. Intervención alimentaria.

El análisis de la concentración de macro y micronutrientes, antes y después del lavado, mostró que los aceites utilizados tan solo diferían en la concentración de compuestos fenólicos (**Figura 28**).

VARIABLE	MEDIA ± DS	RANGO
Edad (años)	56±9	(36-70)
Peso (Kg.)	99 ± 14,9	(69-140)
Altura (cms.)	160±9	(144-180,3)
IMC (kg.m-2)	38,7 ± 4,4	(27,9-49,4)
Perímetro abdominal (cm)	114,2 ± 10,8	(93-137)
Perímetro cadera (cm)	126,8 ± 12,2	(102-151)
Presión arterial sistólica (mmHg)	145 ± 20	(108-206)
Presión arterial diastólica (mmHg)	90,29 ± 12	(63-116)
Glucosa plasmática (mg.dL-1)	104 ± 20	(78-205)
Insulina plasmática (U.dL-1)	16 ± 8	(3-19)
Colesterol total (mg.dL-1)	203 ± 30	(140-285)
Colesterol LDL (mg.dl-1)	121 ± 27	(76-197)
Colesterol HDL (mg.dl-1)	50 ± 12	(32-84)
Triglicéridos (mg.dL-1)	163 ± 83	(54-472)
Apo A1 (mg.dL-1)	140 ± 23	(95-198)
Apo B (mg.dL-1)	98,04 ± 19	(59-141)
Proteína C reactiva(mg/L)	2,84±3,51	(0,2-15,1)

Figura 29. Características basales de la población estudiada.

COMPUESTO	INICIAL	LAVADO
Ac. palmítico %	13,45	13,23
Ac Palmitoleico %	1,17	1,11
Ac Margárico %	0,05	0,08
Ac Margaroleico %	0,11	0,09
Ac Esteárico %	2,33	2,43
Ac Oleico %	78,82	74,81
Ac Linoleico %	6,89	6,66
Ac Linolénico %	0,60	0,6
Ac Aráquico %	0,34	0,42
Ac Araquídico %	0,24	0,24
Ac Behénico %	0,11	0,12
Tocoferoles totales (mg/kg)	202	207
Alfa tocoferol (mg/kg)	187	194
Beta tocoferol (mg/kg)	7	6
Gamma tocoferol (mg/kg)	7	7
Polifenoles totales (ppm)	398	70

Figura 30. Composición de micronutrientes de los aceites.

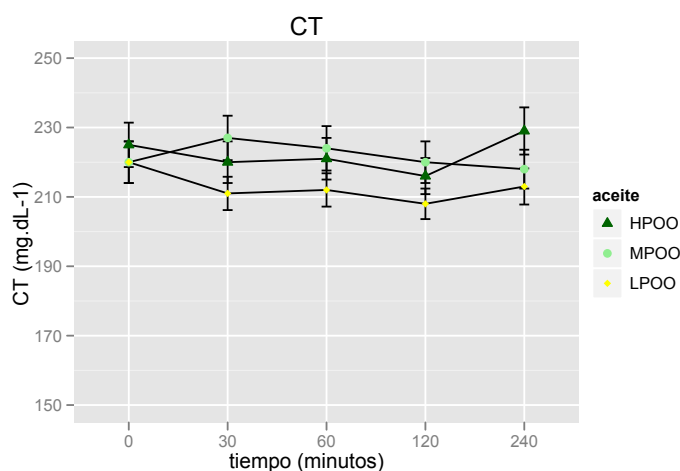


Figura 31. Concentraciones plasmáticas de CT tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,204$; $p_2(\text{tiempo}) = 0,027$; $p_3(\text{aceite}*\text{tiempo}) = 0,082$.

6.3. Efecto del aceite de oliva virgen con diferente contenido en fenoles sobre la respuesta inflamatoria y metabolismo energético postprandial.

Al analizar las concentraciones de PCR, IL-6, HDLc y APO B no se encontraron diferencias significativas en función de la concentración de compuestos fenólicos de los aceites (resultados no mostrados). Las concentraciones del resto de parámetros del metabolismo lipídico se modificaron en el periodo postprandial sin que existieran diferencias según el tipo de aceite consumido (CT, $p=0,027$; LDLc, $p<0,001$; TG, $p<0,001$; APO A-1, $p=0,032$; NEFAs, $p<0,001$) (Figuras 29, 30, 31, 32 y 33). De modo similar, se observaron cambios en las concentraciones de glucosa e insulina, existiendo, para esta última, un efecto de interacción entre el tiempo y el tipo de aceite consumido ($p= 0,039$) (Figuras 34 y 35).

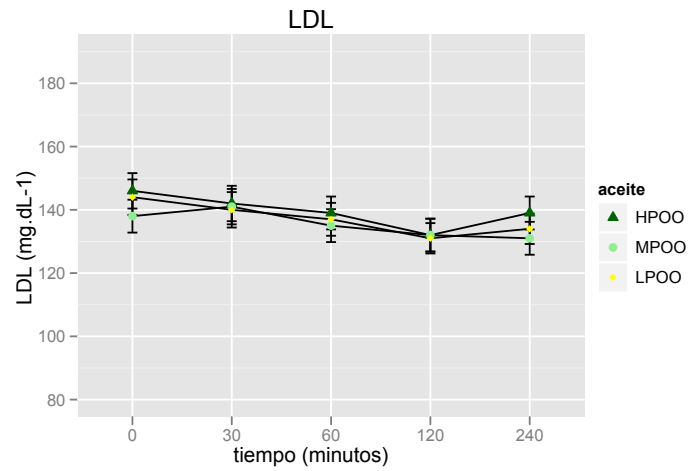


Figura 32. Concentraciones plasmáticas de LDLc tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,824$; $p_2(\text{tiempo}) < 0,001$; $p_3(\text{aceite} \times \text{tiempo}) = 0,241$.

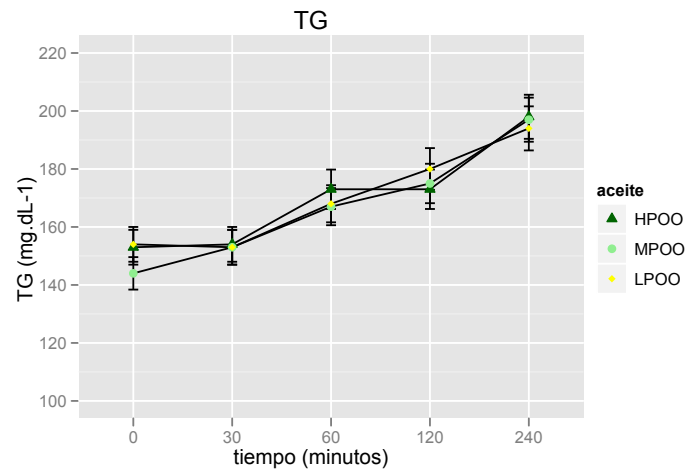


Figura 33. Concentraciones plasmáticas de TG tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,700$; $p_2(\text{tiempo}) < 0,001$; $p_3(\text{aceite} \times \text{tiempo}) = 0,724$.

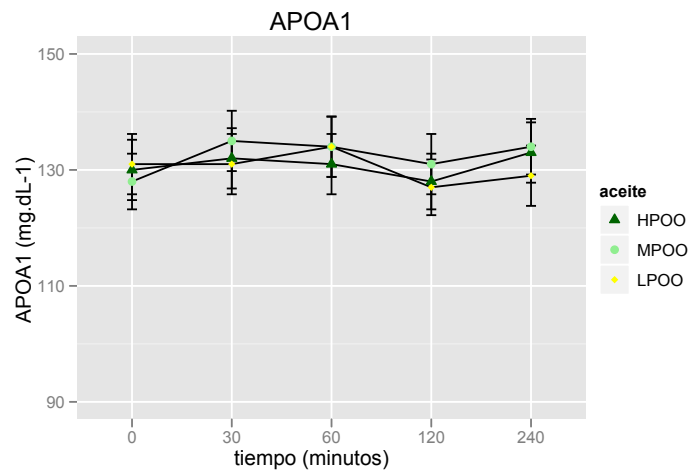


Figura 34. Concentraciones plasmáticas de APO A-1 tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,345$; $p_2(\text{tiempo}) = 0,032$; $p_3(\text{aceite}*\text{tiempo}) = 0,142$.

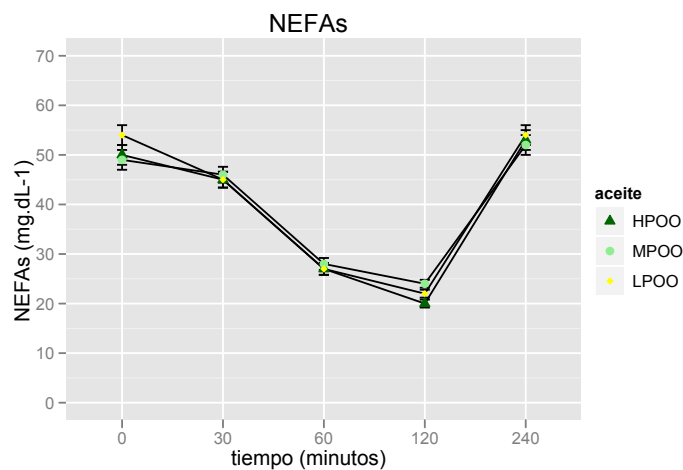


Figura 35. Concentraciones plasmáticas de NEFAs tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,202$; $p_2(\text{tiempo}) < 0,001$; $p_3(\text{aceite}*\text{tiempo}) = 0,165$.

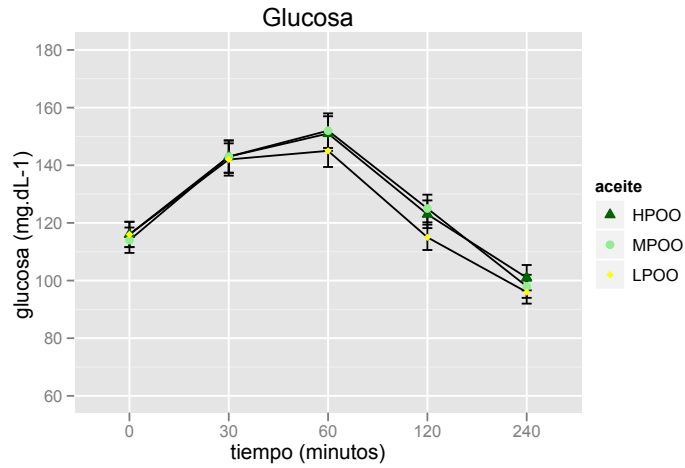


Figura 36. Concentraciones plasmáticas de glucosa tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,126$; $p_2(\text{tiempo}) < 0,001$; $p_3(\text{aceite}*\text{tiempo}) = 0,383$.

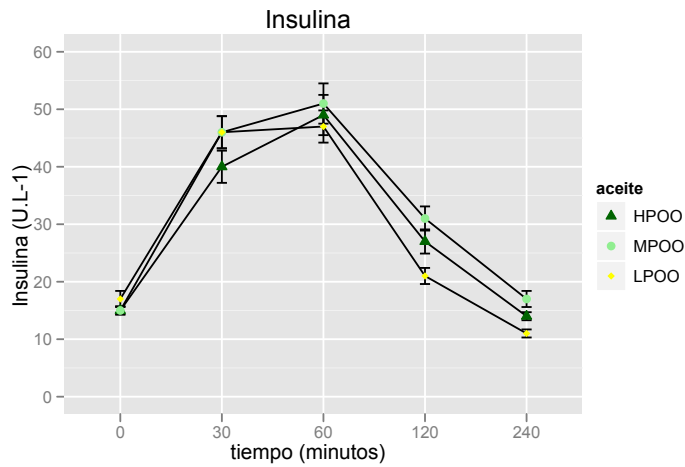


Figura 37. Concentraciones plasmáticas de insulina tras la ingesta de aceite con diferente contenido en compuestos fenólicos (HPOO: alto; MPOO: medio y LPOO: bajo). ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,195$; $p_2(\text{tiempo}) < 0,001$; $p_3(\text{aceite}*\text{tiempo}) = 0,039$.

6.4. Efecto del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) sobre la respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio tras la ingesta de aceite de oliva virgen con diferente contenido en fenoles.

Análisis de la distribución genotípica.

Las frecuencias alélicas (G=0,560; T=0,440) y genotípicas (GG=0,335; GT=0,45; TT=0,215) fueron similares a las encontradas en otras poblaciones caucásicas (HapMap³² y PERGELEN). Estas distribuciones además se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,196$, $p=0,657$, $D=0,826$).

Características basales de los sujetos en función del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983).

Al analizar las características basales de los pacientes agrupados en virtud del grado de portador del alelo T del polimorfismo Glu298Asp de la NOS3 (rs1799983), no se observaron diferencias significativas para los parámetros estudiados (**Figura 36**).

Respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio.

A continuación se detalla el efecto observado del aceite y el polimorfismo sobre cada uno de los parámetros de la respuesta vasodilatadora medida por láser Doppler que fueron analizados.

1.-iABC

Los pacientes con genotipos TT o GT mostraron un menor valor de iABC tras la ingesta de los diferentes aceites ($p=0,002$). Además, el valor de iABC resultó ser mayor cuanto más elevada fue la concentración de compuestos fenólicos en los aceites consumidos ($p=0,004$). Sin embargo, no se apreció interacción entre aceite y genotipo para este parámetro de la respuesta vasodilatadora (**Figura 37**).

³²www.hapmap.org/

VARIABLE	GG	GT/TT	p
Género (h/m)	08:13	14:22	0,085*
Edad (años)	54±8	57±9	0,23
Peso (kg)	101,8±19,8	97,3 ±11,1	0,28
Altura (cm)	159±9	160±8	0,83
IMC (kg/m2)	39,7±4,8	38,1±4,2	0,18
Perímetro abdominal (cm)	116±11	113±10	0,12
Perímetro de cadera (cm)	127±14	127±11	0,31
PAS (mmHg)	149±20	144±20	0,44
PAD (mmHg)	93±12	88 ±11	0,13
Glucosa (mg/dl)	105±19	104±22	0,93
Insulina (mU/L)	13,4±8,4	12,3±9,9	0,49
ColT(mg/dl)	211±37	199±25	0,11
LDLc (mg/dl)	127±33	119±23	0,26
HDLc (mg/dl)	53±12	48±13	0,16
TG (mg/dl)	145±49	174±96	0,19
APOA1 (mg/dl)	148 ± 21	136 ±24	0,98
APOB (mg/dl)	99±24	98±17	0,56
PCR (mg/L)	3,5±4,3	2,5±2,9	0,28

Figura 38. Características basales en función de los distintos alelos del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983). Los valores representados corresponden a las medias \pm desviación estandar; los valores de la p resultan del análisis ANOVA para analizar las diferencias entre grupos de genotipos. * Las diferencias de género se analizaron con el test χ^2 .

2.-PORH max:

Se observó cómo una interacción entre el efecto del genotipo de NOS3 Glu298Asp (rs1799983) y el tipo de aceite consumido explicaba las diferencias observadas en los valores de PORH max ($p=0,039$). Éstos resultaron ser menores en aquellos pacientes con genotipo TT que en los que tenían genotipos GT o GG, siempre que el aceite ingerido tuviera una concentración media o baja en compuestos. Sin embargo, estas diferencias desaparecían cuando el aceite tenía alta concentración en dichas sustancias ($p= 0,002$) (**Figura 38**).

3.-PORH pico:

Tras la ingesta del aceite con alto contenido en compuestos fenólicos la respuesta pico fue mayor en comparación con los otros dos aceites ($p=0,026$), sin observar efecto alguno del genotipo de NOS3 Glu298Asp (rs1799983) sobre dicha respuesta (**Figura 39**).

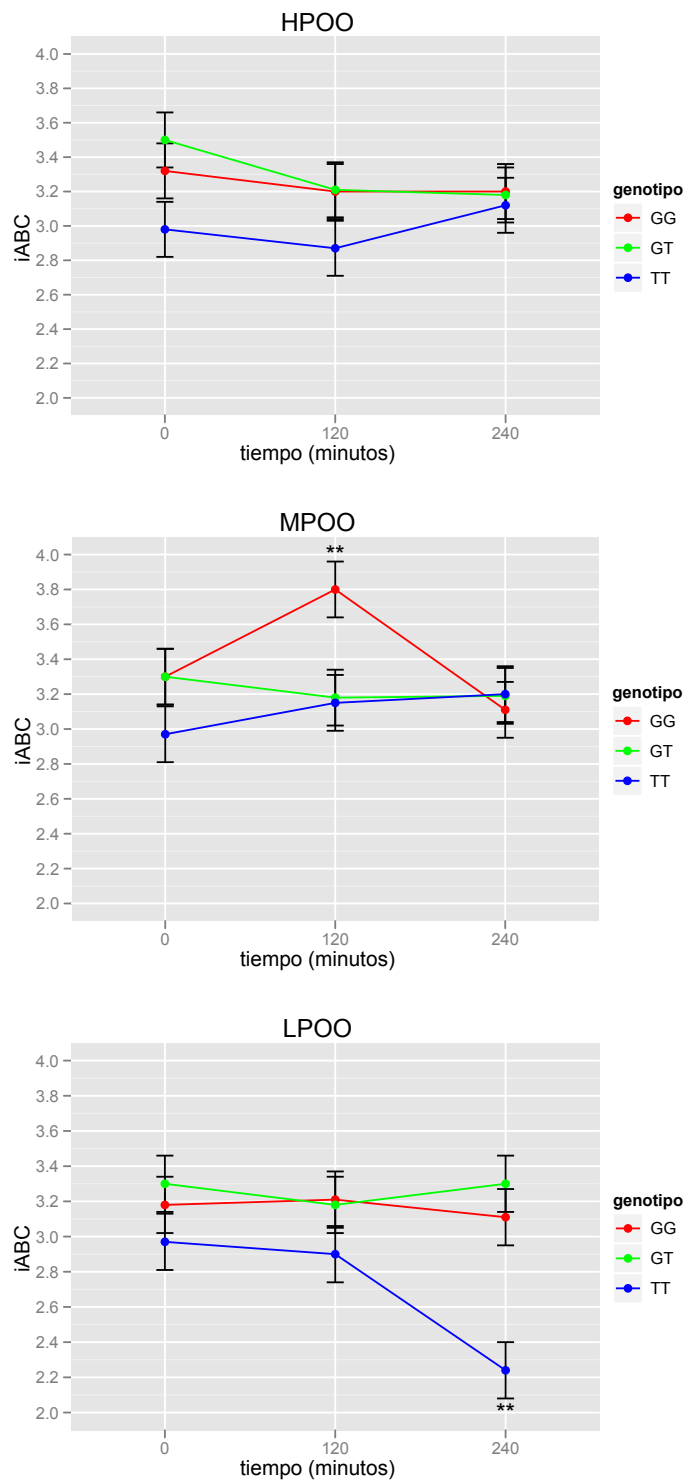


Figura 39. Análisis del iABC tras la ingesta de aceites con diferente contenido fenólico según cada genotipo. ANOVA para medidas repetidas; $p_1(\text{aceite}) = 0,004$; $p_2(\text{genotipo}) = 0,002$; $p_3(\text{aceite*genotipo}) = 0,051$. Análisis *post hoc* (Tuckey) por genotipo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

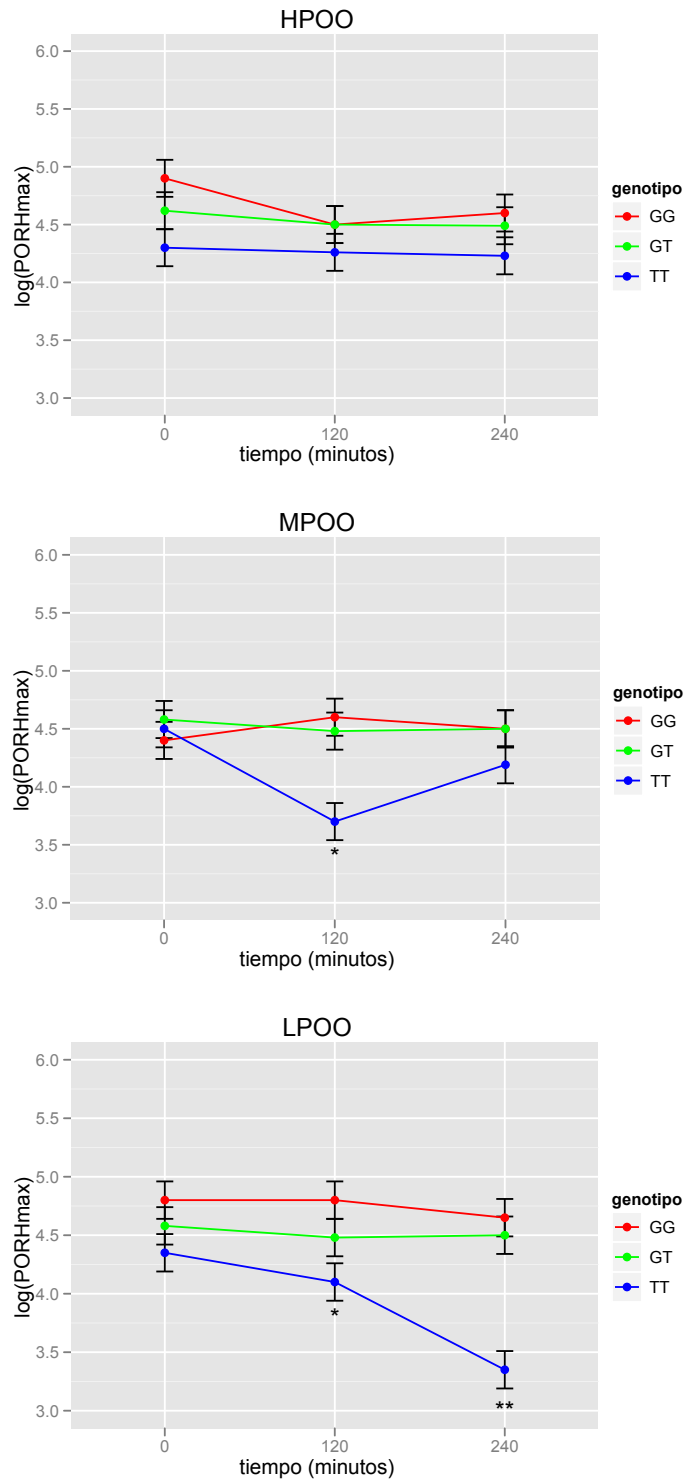


Figura 40. Análisis de la respuesta PORHmáxima tras la ingesta de aceites con diferente contenido fenólico según cada genotipo. ANOVA para medidas repetidas; $p_1(\text{aceite}) = 0,414$; $p_2(\text{genotipo}) = 0,002$; $p_3(\text{aceite*genotipo}) = 0.039$. Análisis *post hoc* (Tuckey) por genotipo * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

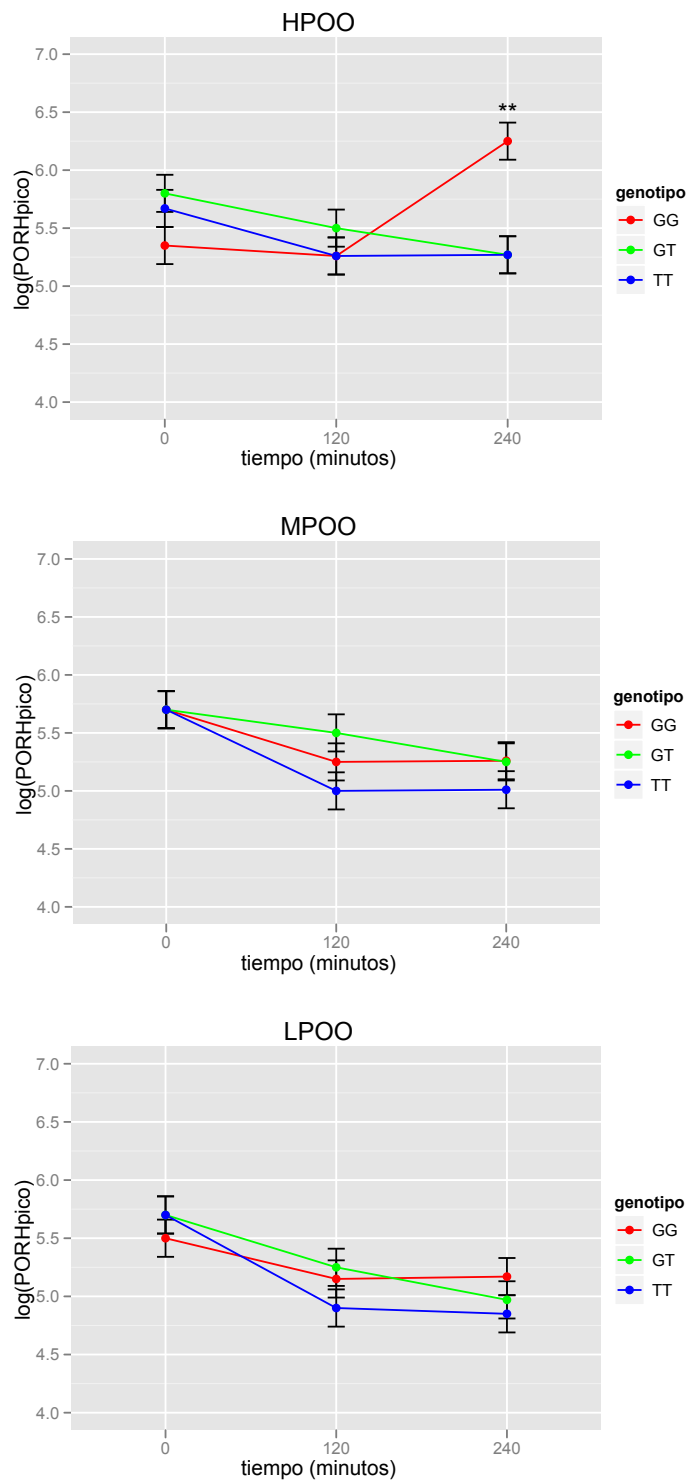


Figura 41. Análisis de la respuesta PORH pico tras la ingesta de aceites con diferente contenido fenólico según cada genotipo. ANOVA para medidas repetidas; $p_1(\text{aceite}) = 0,026$; $p_2(\text{genotipo}) = 0,073$; $p_3(\text{aceite} \times \text{genotipo}) = 0,878$. Análisis *post hoc* (Tuckey) para el genotipo ** $p < 0,001$

Respuesta vasodilatadora, biodisponibilidad de NO y polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983).

1.-Concentración de eNOS: Observamos que los pacientes con genotipo TT tenían concentraciones menores de eNOS que los que tenían genotipo GT o GG ($p=0,032$), sin embargo no encontramos interacción alguna entre el genotipo y los tipos de aceite consumidos (**Figura 40**).

2.-Concentración de NO(x): La concentración basal de NO(x) fue significativamente menor en aquellos enfermos con genotipos TT o GT en comparación con aquellos que presentaban genotipo GG ($p=0,039$). Tras la ingesta de aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos se producía una marcada disminución en la concentración de NO(x) en el periodo postprandial, hecho que no sucedía cuando el aceite ingerido tenía una concentración media o alta de estos compuestos ($p=0,015$). Además, observamos una interacción gen-dieta que resultó estadísticamente significativa ($p=0,042$) (**Figura 41**).

3.-Análisis de correlación: Encontramos una correlación positiva entre la concentración de NO(x) y la PORH máxima tras la ingesta de aceite de oliva con alto ($r=0,379$; $p=0,001$) y medio ($r=0,378$; $p=0,0001$) contenido en compuestos fenólicos, pero no tras la ingesta de aceite con bajo contenido en dichas sustancias ($r=0,060$; $p=0,587$) (**Figura 42**). Al analizar el efecto que el polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) podía tener sobre estas asociaciones, encontramos una correlación positiva entre NO(x) y la PORH máxima en los pacientes con genotipo GG ($r=0,778$; $p<0,001$) y GT ($r=0,318$; $p<0,001$), pero no en aquellos con genotipo TT ($r=0,170$; $p=0,128$) (**Figura 43**).

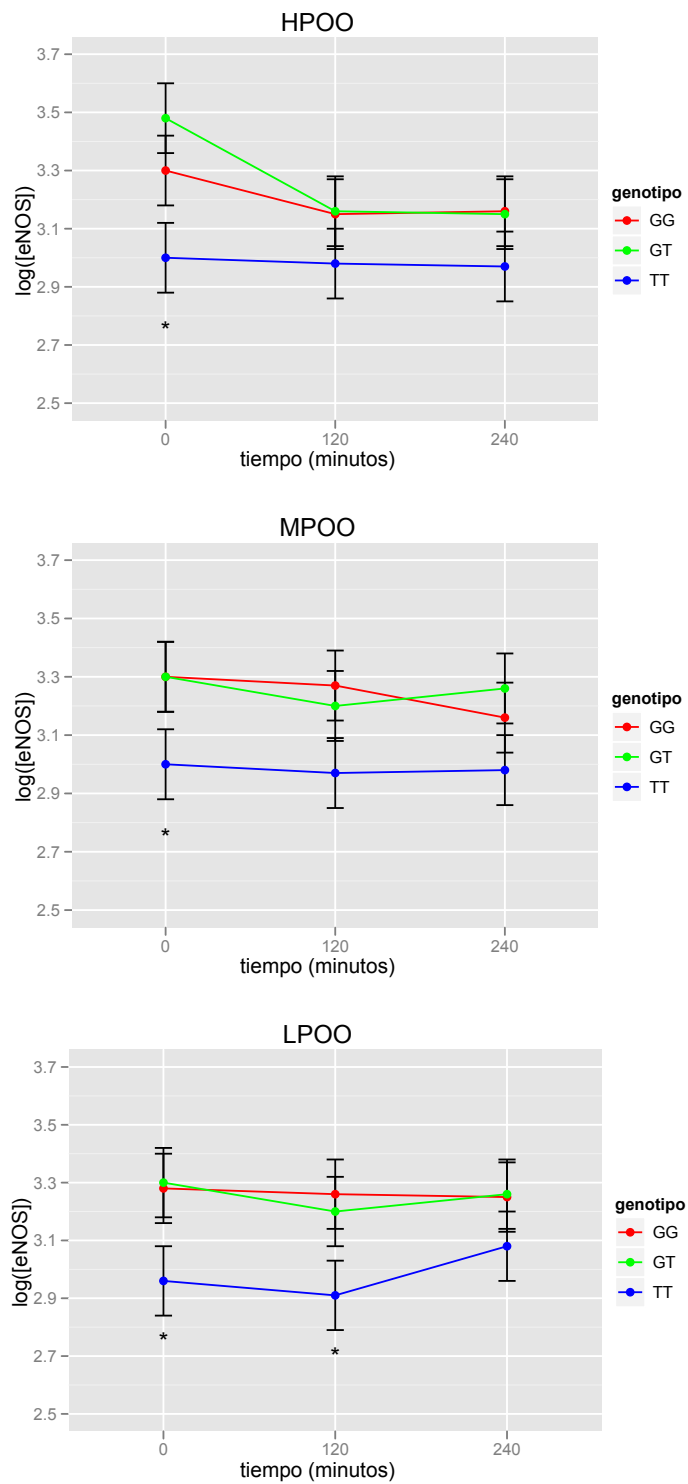


Figura 42. Concentraciones plasmáticas de eNOS tras la ingesta de aceites con diferente concentración en compuestos fenólicos. ANOVA para medidas repetidas; $p_1(\text{aceite}) = 0,932$; $p_2(\text{genotipo}) = 0,032$; $p_3(\text{aceite} \times \text{genotipo}) = 0,242$. Análisis *post hoc* (Tuckey) para el genotipo * $p < 0,005$.

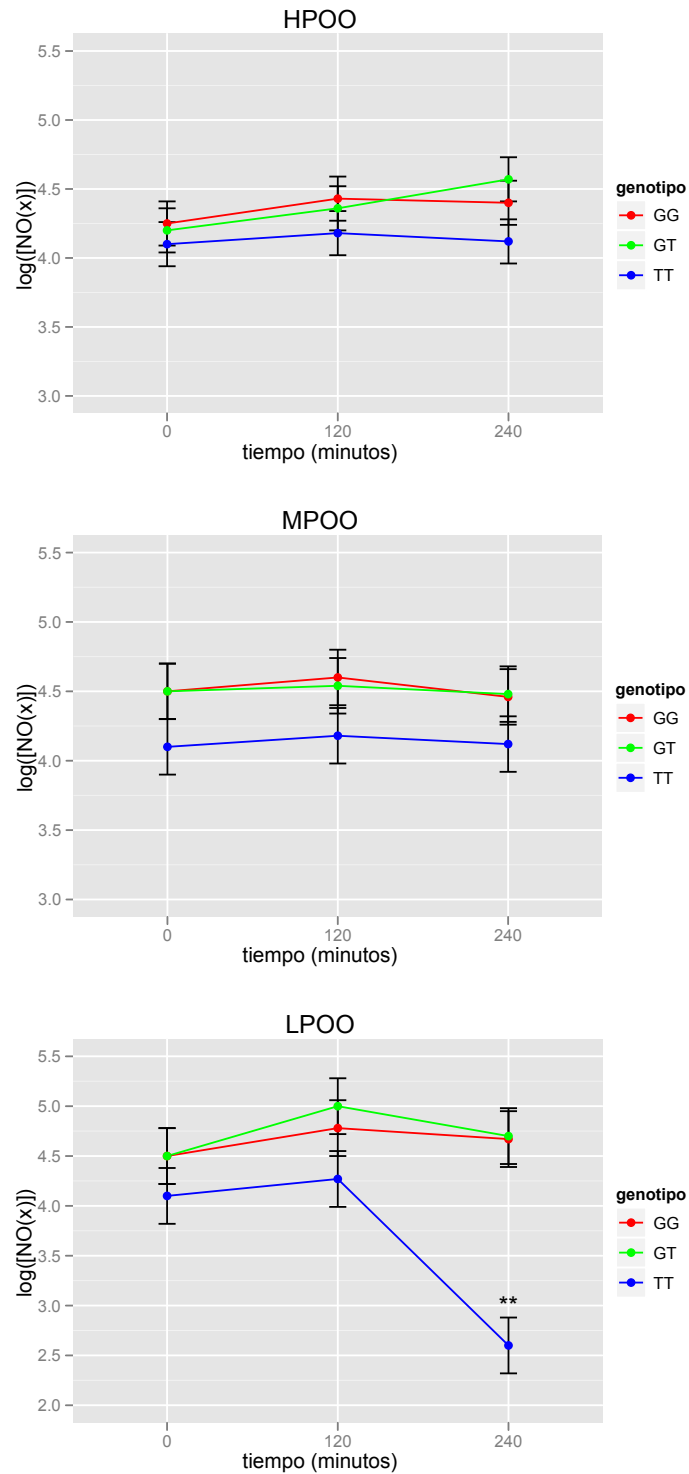


Figura 43. Concentraciones plasmáticas de $\text{NO}(x)$ tras la ingesta de aceites con diferente concentración en compuestos fenólicos. ANOVA para medidas repetidas. $p_1(\text{aceite}) = 0,015$; $p_2(\text{genotipo}) = 0,039$; $p_3(\text{aceite}*\text{genotipo}) = 0,042$. Análisis *post hoc* (Tuckey) para el genotipo * $p < 0,005$.

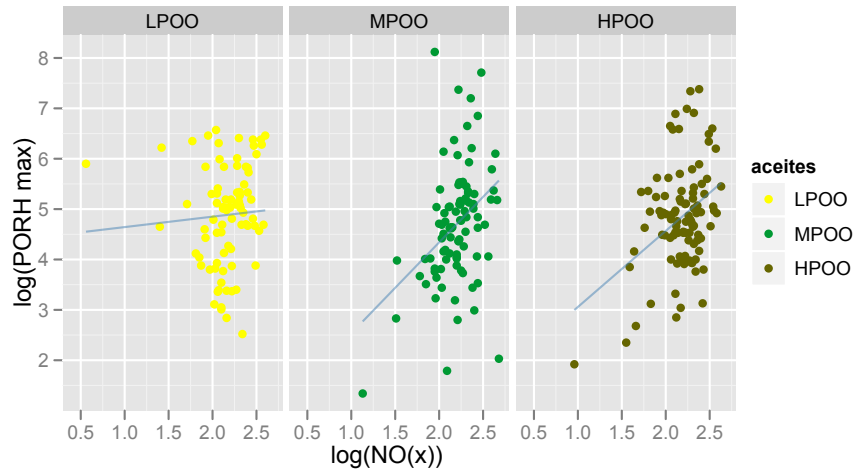


Figura 44. Correlación entre PORH máxima y $\text{NO}(x)$ en función del aceite de oliva consumido. LPOO; $R: 0,006 / p= 0,587$; MPOO; $R: 0,378 / p= 0,001$; HPOO; $R: 0,379 / p= 0,0001$.

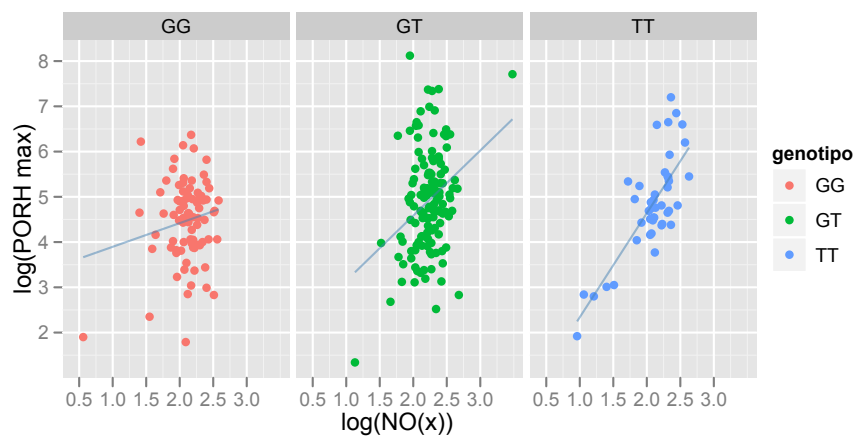


Figura 45. Correlación entre PORH máxima y $\text{NO}(x)$ en función del genotipo NOS3. GG; $R: 0,778 / p < 0,0001$; GT; $R: 0,318 / p= 0,001$; TT; $R: 0,170 / p= 0,128$

6.5. Análisis de expresión génica en células mononucleares de sangre periférica.

Genes expresados diferencialmente

El análisis con *microarrays* mostró un índice de correlación de $>90\%$ de la señal del logaritmo de la intensidad cruda entre las réplicas *inter-array* en todos los casos. El coeficiente medio de variación de los valores del logaritmo de la señal de cada prueba fue menor de 0,1 para las réplicas *intra-array*. Los cambios en la expresión génica se determinaron como \log_2 del ratio de los valores de la intensidad de la señal correspondiente a los transcritos presentes cuatro horas después de la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en polifenoles dividido entre los valores de intensidad de señal correspondiente a los transcritos presentes 4 horas tras la ingesta de aceite con bajo contenido en compuestos fenólicos. Se seleccionaron 15.308 sondas o pruebas de alta calidad con \log_2 ratios entre 1,89 y -1,79. Entre éstas, encontramos 98 genes diferencialmente expresados en PBMCs humanas. Seleccionando el ratio del \log_2 mayor que 0,4 (mayor expresión tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en fenoles, es decir, al menos 1,32 veces más cambio) y \log_2 del ratio menor de -0,4 (menor expresión tras la ingesta de aceite con bajo contenido en fenoles, es decir al menos 1,32 menos cambio) observamos que 19 genes estaban sobreexpresados (**Figura 43**) y 79 genes estaban reprimidos (**Figuras 44,45, 46 y 47**) con una significación estadística para el modelo lineal ajustado por FDR de $p=0,001$. Los resultados se ajustaron por el efecto del *dye-swap* y por FDR. Los genes más reprimidos en pacientes con SMet durante el periodo postprandial tras ingerir aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos fueron: G0S2, EGR2, EGR1, FOSB, IL1B, NR4A2, EGR3, RASGEF1B, CXCL1 y PTGS2 (1,95 a 2,74 veces de cambio) y los más sobreexpresados fueron: CA1, RAP1GAP, GYPB, FN1 and SELENBP1 (1,46 a 1,57 veces de cambio).

Genes sobreexpresados					
Gen	Descripción	valor M	valor p	valor B	prob. B
Receptor de citoquina					
CCR2	quimiocina (C-C motif) receptor 2	0,416	0,003131	0,476	61,69
Transportador					
SLC6A12	familia de transportador soluble 6, miembro 12	0,408	0,000016	8.226	99,97
SLC4A1	familia de transportador soluble 4	0,409	0,000151	4.859	99,23
ABCC13	ATP-binding cassette, sub-familia C	0,443	0,002475	0,797	68,92
Receptor de membrana					
TLR7	toll-like receptor 7	0,407	0,000193	4.534	98,94
GRIA4	receptor de glutamato, AMPA 4	0,434	0,000742	2.596	93,06
Proteína de membrana					
PSAP	prosaposina	0,437	0,002295	0,905	71,2
GYPB	glicoforina B	0,602	0,000707	2.670	93,52
Enzima					
ALDH1A1	aldehído deshidrogenasa familia 1 miembro A1	0,418	0,001177	1.878	86,73
CA1	anhidrasa carbónica I	0,653	0,000227	4.314	98,68
Kinasa					
PDK4	kinasa piruvato deshidrogenasa, isozima 4	0,452	0,002012	1.103	75,08
Peptidasa					
CPVL	carboxipeptidasa tipo-vitelogénica	0,455	0,007297	-0,703	33,11
Unión a metales					
SELENBP1	selenium binding protein 1	0,551	0,000077	5.841	99,71
Unión a proteína					
CSTA	cistatina A	0,434	0,000398	3.505	97,08
FN1	fibronectina 1	0,553	0,008561	-0,838	30,19
Transducción de señal					
RAP1GAP	activador de proteína RAP1 GTPasa	0,61	0,003858	0,237	55,89
Regulador de transcripción					
ANKRD22	dominio de ankirina repetido	0,517	0,000051	6.546	99,86
Genes hipotéticos o genes cuyas funciones no están anotadas					
C8orf13	cromosoma 8 marco abierto de lectura 13	0,443	0,005823	-0,389	40,39
IFIT3	proteína inducida por interferon	0,468	0,000064	6.159	99,79

Figura 46. Genes sobreexpresados tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. El valor M representa el logaritmo del ratio de la expresión diferencial entre el canal rojo y verde ($M = \log_2(R/G)$). El valor B representa el logaritmo de la odds de la expresión génica diferencial y la probabilidad B se obtiene convirtiendo el logaritmo de la odds ratio; probabilidad $B = \left(\frac{B}{1+B}\right)$. (M) mujeres (H)

Genes reprimidos					
Gen	Descripción	valor M	valor p	valor B	prob. B
Citoquinas					
IL1B	interleucina 1, beta	-1.081	0,001880	1.197	76,8
PBEF1	factor estimulador de colonias pre-B 1	-0,785	0,000228	4.304	98,67
IL6	interleucina 6	-0,621	0,000313	3.855	97,93
OSM	oncostatina M	-0,463	0,001050	2.060	88,7
Factores de crecimiento					
EREG	epiregulina	-0,773	0,005911	-0,417	39,71
AREG	amfiregulina	-0,578	0,005898	-0,413	39,81
Ligando de citoquinas					
CXCL1	ligando de quimiocina (C-X-C motif) 1	-0,987	0,000998	2.138	89,45
CCL3L3	ligando de quimiocina(C-C motif) 3 tipo 3	-0,637	0,004575	-0,045	48,87
CCL3	ligando de quimiocina (C-C motif) 3	-0,622	0,005911	-0,417	39,73
CXCL2	ligando de quimiocina (C-X-C motif) 2	-0,604	0,000156	4.802	99,19
CXCL3	ligando de quimiocina (C-X-C motif) 3	-0,559	0,001745	1.295	78,5
Receptor de citoquinas					
CXCR4	receptor de quimiocina (C-X-C motif) 4	-0,611	0,000048	6.632	99,87
Transportador					
SLC16A3	pp10472 mRNA	-0,485	0,001711	1.323	78,96
Receptor de membrana					
CD69	CD69	-0,729	0,000659	2.767	94,08
TAS2R50	receptor de gusto, tipo 2, miembro 50	-0,447	0,000001	12.859	100
Canal ionico					
KCNV2	canal de potasio, subfamilia V, miembro 2	-0,416	0,000003	10.418	100
Receptor acoplado a proteína G					
RGS1	regulador de señalizacion de proteína G	-0,813	0,003182	0.454	61,15

Figura 47. Tabla 1.1 Genes reprimidos tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. El valor M representa el logaritmo del ratio de la expresión diferencial entre el canal rojo y verde ($M = \log_2(R/G)$). El valor B representa el logaritmo de la *odds* de la expresión génica diferencial y la probabilidad B se obtiene convirtiendo el logaritmo de la odds ratio; probabilidad $B = \left(\frac{B}{1+B} \right)$.

Genes reprimidos						
Gen	Descripción	valor M	valor p	valor B	prob. B	
Proteína de membrana						
CD83	CD83	-0,576	0,001611	1.414	80,43	
CNTNAP3	proteína asociada a la contactina 3	-0,532	0,006691	-0,561	36,33	
LMOD1	leiomodina 1	-0,527	0,000000	14.941	100	
TMEM88	proteína transmembrana 88	-0,485	0,000415	3.445	96,91	
Enzima						
PTGS2	prostaglandina-endoperoxido sintasa 2	-0,967	0,001481	1.537	82,31	
SOD2	superóxido dismutasa 2, mitocondrial	-0,776	0,001169	1.889	86,87	
KRT23	keratina 23	-0,512	0,003552	0,296	57,35	
THEM5	superfamilia de la tioesterasa miembro 5	-0,439	0,000020	7.917	99,96	
CA2	anhidrasa carbónica II	-0,414	0,000002	11.458	100	
PLA2G1B	fosfolipasa A2 grupo IB	-0,412	0,000002	11.041	100	
ANXA3	anexina A3	-0,404	0,000069	6.039	99,76	
CYCS	cytochrome c, somatic	-0,448	0,002021	1.094	74,92	
Fosfatasa						
DUSP1	fosfatasa dual	-0,708	0,004750	-0,103	47,44	
PHACTR1	mRNA para proteína KIAA1733	-0,594	0,002019	1.099	75,01	
DUSP2	fosfatasa específica 2	-0,573	0,000056	6.385	99,83	
PPP1R15A	fosfatasa 1 subunidades inhibitoria 15A	-0,519	0,000241	4.217	98,55	
Quinasa						
SGK1	quinasa reguladora de corticoide	-0,609	0,000386	3.550	97,21	
TRIB1	tribbles homólogo 1	-0,456	0,003269	0,41	60,12	
Unión a metales						
PVALB	parvalbumina	-0,494	0,000000	22.989	100	
LIMS3	LIM y senescencia cell antigen-like dominio 3	-0,46	0,000002	10.929	100	
TNNC2	troponina C tipo 2	-0,428	0,000024	7.697	99,95	

Figura 48. Tabla 1.2 Genes reprimidos tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. El valor M representa el logaritmo del ratio de la expresión diferencial entre el canal rojo y verde ($M = \log_2(R/G)$). El valor B representa el logaritmo de la *odds* de la expresión génica diferencial y la probabilidad B se obtiene convirtiendo el logaritmo de la odds ratio; probabilidad $B = \left(\frac{B}{1+B} \right)$.

Genes reprimidos						
Gen	Descripción	valor M	valor p	valor B	prob. B	
Unión a proteína						
PER1	periodo homologo 1	-0,625	0,003362	0,376	59,3	
DIAPH3	diafano homologo 3	-0,532	0,002094	1.111	75,24	
DFNB31	cDNA FLJ31628 fis, clon NT2RI2003344	-0,528	0,000742	2.604	93,11	
NPHS2	nefrosis 2, idiopatico, reistencia a esteroide (podocina)	-0,522	0,000009	8.834	99,99	
APR-2	proteina relacionada con la apoptosis	-0,453	0,000000	14.013	100	
Transductor de señales						
RASGEF1B	cDNA DKFZp686K235	-0,99	0,001441	1.580	82,92	
SDCBP	cDNA FLJ46804 fis, clon TRACH3032570	-0,449	0,003535	0,302	57,48	
TAGAP	activación de célula proteina activadora de GTPasa	-0,403	0,000193	4.533	98,94	
Señalización						
TNFAIP3	factor de necrosis tumoral, proteina inducida alfa 3	-0,644	0,001995	1.114	75,28	
NFKBIA	NFK, light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor α	-0,629	0,002867	0,594	64,42	
SOCS3	supresor de señalización ce citocinas 3	-0,589	0,000100	5.485	99,59	
NFKBIZ	NFK light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor ζ	-0,508	0,000597	2.911	94,84	
Regulador del ciclo celular						
G0S2	cambio G0/G1 tipo 2	-1.455	0,001301	1.732	84,96	
CDKN2A	inhibidor de kinasa ciclin-dependiente kinase 2A	-0,411	0,000000	15.787	100	
Receptor nuclear dependiente de ligando						
NR4A2	receptor nuclear subfamiiay 4, grupo A, miembro 2	-1.078	0,001116	1.965	87,7	
NR4A1	receptor nuclear subfamilia 4, grupo A, miembror 1	-0,58	0,007326	-0,709	32,98	
Reguladores de transcripción						
EGR2	early growth response 2	-1.434	0,000915	2.266	90,61	
EGR1	early growth response 1	-1.393	0,000355	3.665	97,5	
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	-1.309	0,001483	1.535	82,28	

Figura 49. Tabla 1.3 Genes reprimidos tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. El valor M representa el logaritmo del ratio de la expresión diferencial entre el canal rojo y verde ($M = \log_2(R/G)$). El valor B representa el logaritmo de la *odds* de la expresión génica diferencial y la probabilidad B se obtiene convirtiendo el logaritmo de la odds ratio; probabilidad $B = \left(\frac{B}{1+B} \right)$.

Genes reprimidos						
Gen	Descripción	valor M	valor p	valor B	prob. B	
Reguladores de transcripción						
EGR3	early growth response 3	-1.062	0,000844	2.425	91,87	
JUN	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog	-0,823	0,000521	3.106	95,71	
JUNB	proto oncogen jun B	-0,523	0,000327	3.791	97,79	
TRIM29	tripartite motif-containing 29	-0,52	0,000000	15.576	100	
KLF6	factor 6 tipo Kruppe	-0,483	0,005074	-0,198	45,06	
ZFP36	proteina zinc finger 36, tipo C3H	-0,466	0,000761	2.560	92,83	
MXD1	proteina de dimerización MAX 1	-0,454	0,000101	5.474	99,58	
MLXIPL	proteina de interacción con MLX	-0,438	0,000001	12.299	100	
HOXB13	homeobox B13	-0,425	0,000000	15.104	100	
Genes hipotéticos o no anotados						
LOC284454	DNAC DKFZp686D0720	-0,702	0,001905	1.181	76,52	
FLJ22659	DNAC: FLJ22659 fis, clon HSI07953	-0,59	0,003606	0,279	56,92	
LOC389607	gen hipotético apoyado por AK128318	-0,552	0,000010	8.808	99,99	
IER2	early response 2 inmediato	-0,543	0,000071	5.990	99,75	
AY029066	Humanina (HN1), mitocondrial 16S rRNA	-0,54	0,000085	5.705	99,67	
IER3	early response 3 inmediato	-0,535	0,001331	1.690	84,43	
LRRC41	DNAC FLJ13989 fis, clone Y79AA1002083	-0,508	0,000003	10.684	100	
AF351612	UG0651E06 mRNA	-0,497	0,002337	0,878	70,63	
C19orf19	cromosoma 19 orf 19	-0,46	0,000002	10.776	100	
ATXN7L2	ataxina 7-tipo 2	-0,457	0,000000	13.608	100	
KIAA1922	KIAA1922 proteina, mRNA	-0,455	0,000001	11.639	100	
ENKUR	cromosoma 10 orf 63	-0,452	0,000003	10.360	100	
C21orf7	cromosoma 21 orf 7	-0,425	0,000468	3.263	96,31	

Figura 50. Tabla 1.4 Genes reprimidos tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. El valor M representa el logaritmo del ratio de la expresión diferencial entre el canal rojo y verde ($M = \log_2(R/G)$). El valor B representa el logaritmo de la *odds* de la expresión génica diferencial y la probabilidad B se obtiene convirtiendo el logaritmo de la odds ratio; probabilidad $B = \left(\frac{B}{1+B} \right)$.

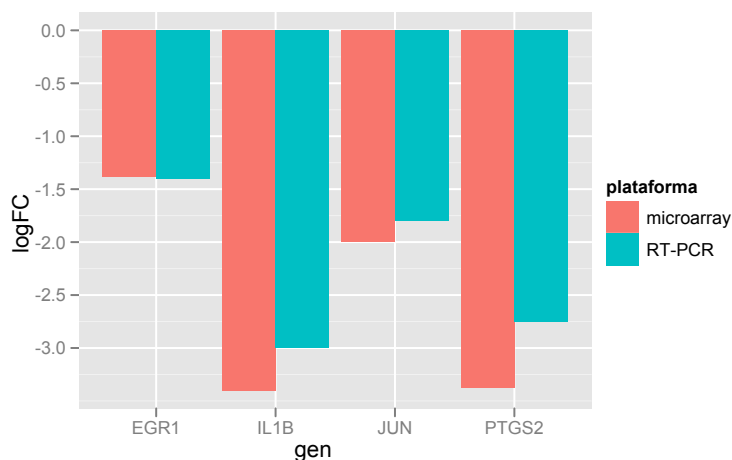


Figura 51. Comparación de los valores de *Fold Change* (FC), obtenidos con *microarrays* y con RT-PCR, tras el consumo de aceite de oliva con alto y bajo contenido en polifenoles. Los valores de la expresión génica se transformaron logarítmicamente antes del análisis estadístico.

Validación de los genes expresados diferencialmente

Las variaciones en la expresión génica, fueron similares al comparar ambos métodos, *microarray* y RT-PCR, existiendo un valor para el coeficiente r de Spearman entre 0,901 y 0,968 con una significación de $p < 0,001$ (**Figura 49**).

Análisis funcional

Con el fin de investigar las relaciones funcionales del conjunto de genes expresados diferencialmente, utilizamos el software de análisis Ingenuity Pathway. De los 98 genes diferencialmente expresados en los pacientes con Síndrome Metabólico, dos transcritos (LOC284454 y AF351612) no mostraron ninguna entrada en la base de datos del software y sólo 81 genes se eligieron finalmente para la red de interacción. 'Trastorno inflamatorio' fue la característica más representada (39 genes, $p=2.11E-19$). De éstos, 35 genes (PTGS2, IL1B, IL6, OSM, CCL3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4, NAMPT, DUSP1, DUSP2, EGR1, EGR2, EGR3, EREG, FOSB, G0S2, JUN, JUNB, NFKBIA, NFKBIZ, NR4A1, NR4A2, PER1, SOCS3, SOD2, TAGAP, TNFAIP3, ZFP36, AREG, CA2, CD69, CD83,

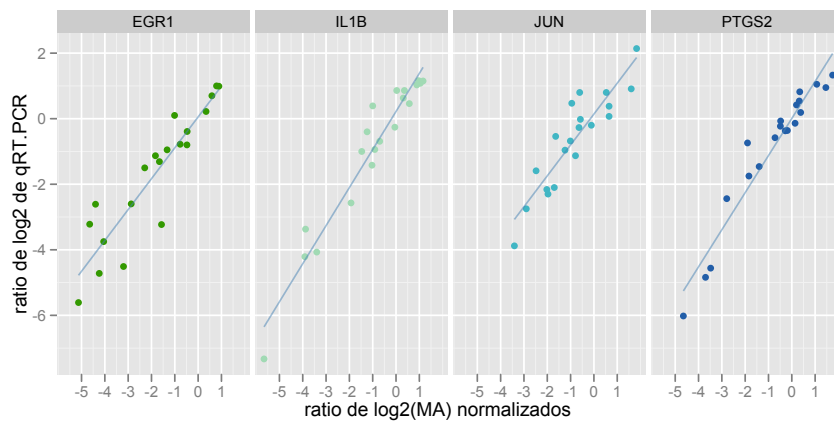


Figura 52. Análisis de correlación entre el log2 del ratio de los valores de expresión génica de los microarrays y los experimentos con qRT-PCR. El ratio de los valores de expresión génica corresponde a la expresión génica tras el consumo de aceite con alto contenido en polifenoles, dividido entre la expresión génica tras el consumo de aceite con bajo contenido de dichas sustancias. Se muestran los valores de la r de Spearman.

CDKN2A) estaban reprimidos tras la ingesta de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos y 4 genes estaban sobreexpresados (CCR2, CA1, CPVL, FN1). Las *gene ontologies* (GO) de 'función celular' más fuertemente asociadas con los genes diferencialmente expresados fueron: 'muerte celular' (41 genes, $p=7.53E-11$); 'migración celular' (24 genes, $p=3.88E-8$); 'división celular' (23 genes, $p=6.29E-8$); 'proliferación celular' (32 genes, $p=9.90E-7$) y 'transcripción' (25 genes, $p=3.55E-05$). La red de análisis arrojó otras 14 subredes diferentes, de las cuales, una se identificó como fundamentalmente enriquecida en genes diferencialmente expresados tras el consumo de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos. Esta subred incluía 26 genes cuyas funciones principales estaban relacionadas con enfermedades inflamatorias con un valor de probabilidad de entre 10 y 54 (Test exacto de Fisher) de interrelación génica al azar. Todas las subredes se fusionaron para obtener una red general (**Figura 51**). Las proteínas interactantes se añadieron utilizando la base de datos del Ingenuity Pathways. Finalmente los genes no conectados o aquellos conectados por dos o más aristas se retiraron excepto los que se habían

expresado de manera diferencial en nuestro estudio.

Realizamos asimismo un análisis funcional con la aplicación PathJam obteniendo diversas rutas metabólicas anotadas en las bases de datos REACTOME³³, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)³⁴ y NCI³⁵ y en las que se encontraban involucrados los genes que encontramos diferencialmente expresados tras la ingesta de HPOO (**Figura 52**).

³³www.reactome.org/

³⁴<http://www.genome.jp/kegg/>

³⁵<http://pid.nci.nih.gov/>

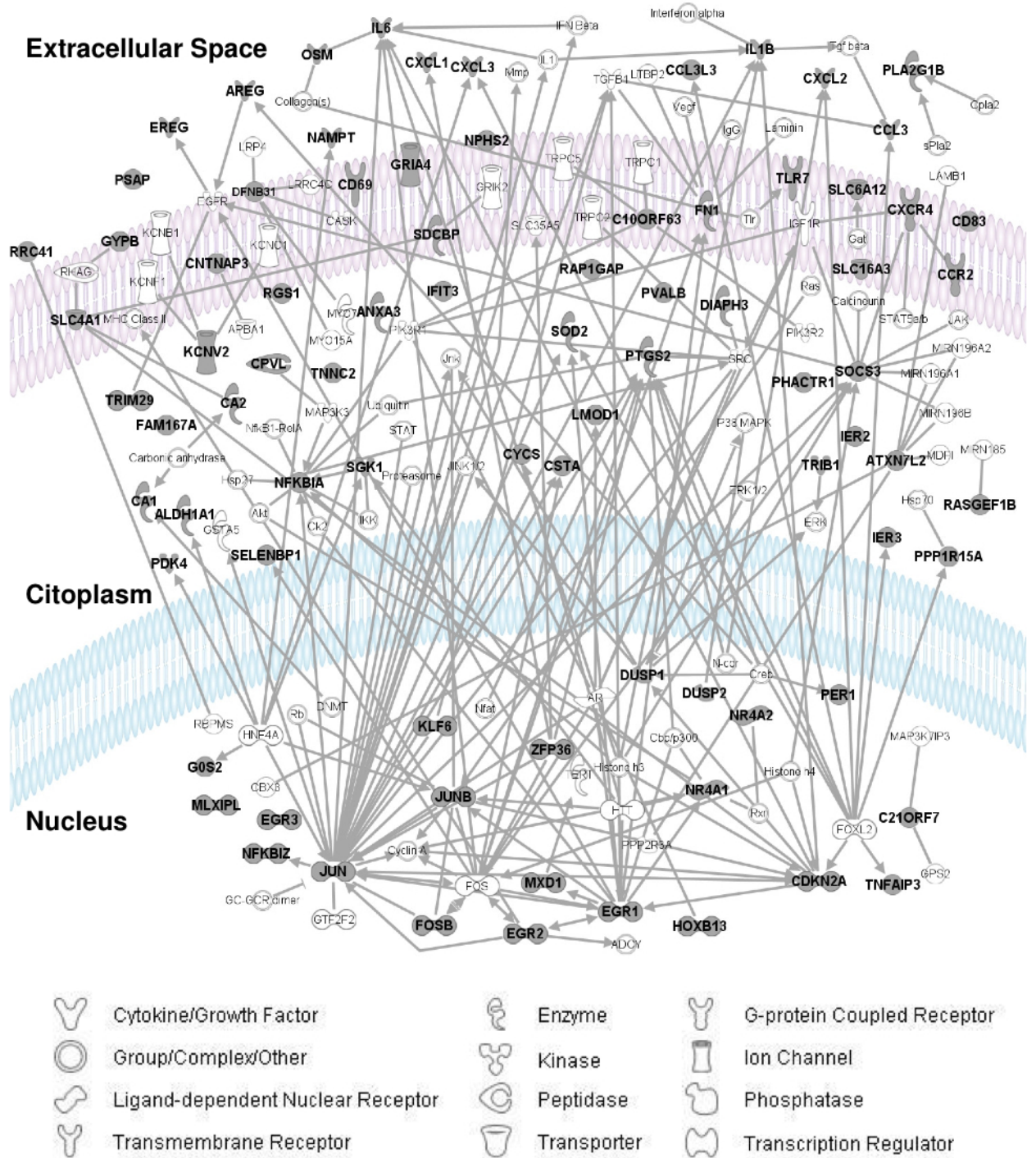


Figura 53. Red de Ingenuity Pathway Analysis. Red de genes modulados por el aceite con alto contenido en polifenoles.

Database	Pathway name	genes	% of genes	p-value	
REACTOME	Chemokine receptors bind chemokines	7/54	12,96	2,13E+09	[CCCL3, CCL3L3, CCR2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4]
KEGG	Cytokine-cytokine receptor interaction	10 / 282	3,55	7,30E+09	[CXCL1, CCL3, CCR2, CXCR4, CCL3L3, IL1B, OSN, CXCL3, CXCL2, IL6]
NCI	Calcineurin-regulated NFAT-dependent transcription	6/50	12,00	7,89E+09	[EGFR1, EGR2, EGR3, JUN, JUNB, PTGS2]
KEGG	NOD-like receptor signaling pathway	6/68	8,82	5,23E+11	[CXCL1, CXCL2, IL1B, IL6, NFKBIA, TNFAIP3]
KEGG	Chemokine signaling pathway	8 / 189	4,23	7,58E+10	[CCL3, CCL3L3, CCR2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4, NFKBIA]
REACTOME	Peptide ligand-binding receptors	7 / 171	4,09	7,06E+11	[CCL3, CCL3L3, CCR2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4]
KEGG	Toll-like receptor signaling pathway	6 / 108	5,56	8,41E+11	[CCL3, IL1B, IL6, JUN, NFKBIA, TLR7]
KEGG	Chagas disease	6 / 109	5,50	8,88E+11	[CCL3, CCL3L3, IL1B, IL6, JUN, NFKBIA]
NCI	Glucocorticoid receptor regulatory network	5/60	8,33	0,001	[EGFR1, IL6, JUN, NR4A1, SGK1]
NCI	ErbB1 downstream signaling	5/61	8,20	0,001	[DIAPH3, DUSP1, EGFR1, JUN, ZFP36]
NCI	IL23-mediated signaling events	4/33	12,12	0,003	[CXCL1, IL1B, IL6, SOCS3]
NCI	ATF-2 transcription factor network	4/52	7,69	0,021	[DUSP1, IL6, JUN, SOCS3]
NCI	Canonical NF-kappaB pathway	2/10	20,00	0,021	[NFKBIA, TNFAIP3]
REACTOME	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	7 / 286	2,45	0,021	[CCL3, CCL3L3, CCR2, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4]
NCI	CD40/CD40L signaling	3/19	15,79	0,031	[JUN, NFKBIA, TNFAIP3]
KEGG	MAPK signaling pathway	6 / 287	2,09	0,031	[DUSP1, DUSP2, IL1B, JUN, NR4A1, PLA2G1B]
NCI	IL6-mediated signaling events	3/29	10,34	0,031	[IL6, JUNB, SOCS3]
KEGG	Pathways in cancer	6 / 332	1,81	0,031	[CDKN2A, CVCS, IL6, JUN, NFKBIA, PTGS2]

Figura 54. Rutas metabólicas que contienen genes expresados diferencialmente tras la ingesta de HPOO.

6.6. Predicción de dianas y análisis de enriquecimiento para sitios de unión para TF y miRNAs

TFBS

Se obtuvieron predicciones de 94.830 sitios de unión a TF en las regiones exploradas de los 98 genes que habían mostrado variación en su expresión tras la ingesta de los aceites de oliva. Estableciendo como filtro un valor de score >1 y de E-value <1 , se seleccionaron como de mayor verosimilitud 834 posiciones de elementos reguladores que correspondían a 89 factores de transcripción. La mayoría de TFs estaban representados en menos de un 30 % de los genes analizados. Tan sólo CAAT-BOX, bZIP911, HFH-1, HMG-IY, LUN-1, MTF-1, MEF-2 y NF- κ B mostraron algún sitio de unión en la región reguladora del 30-90 % de los genes. El análisis de enriquecimiento utilizando como referencia la lista de genes obtenida al azar a partir de los genes representados en la plataforma del microarray, mostró que había más sitios de unión para NF- κ B, FOXQ1 y SRF y menos para PPARG-RXR α y NHLH1 de lo que cabría esperar por azar (**Figuras 53, 54 y 55**).

Con el fin de identificar si las diferencias encontradas dependían de la localización de los elementos reguladores, se analizaron las distribuciones de frecuencias de dichos elementos en función de su posición génica. Se aprecia una clara influencia de la posición en la distribución de frecuencias para FOXQ1, SRF y NF- κ B HFH-1. Por ejemplo, FOXQ1 mostró más diferencias en los sitios de unión predichos en las posiciones de 1 a 3 kbp del sitio de inicio de la transcripción y en intrones, comparado con regiones similares de la lista *random*. SRF mostró las diferencias más grandes en la región de +1 kbp del sitio de inicio de la transcripción y en el primer intrón. Por último los sitios de unión predichos para NF- κ B se localizaban mayoritariamente en una región que iba de +1 kbp *upstream* del sitio de inicio de la transcripción hasta la posición 5'-UTR y el intrón 1, así como en otros intrones comparado con regiones similares de los genes de la lista *random* (**Figura 56**).

	Simbolo del TF	Frec EVOO	Frec random list	Valor p Chi2
1 Superclase: Dominio básico (Basic-helix-loop-helix)				
1.1 Clase: Factores Leucine zipper (bZIP)				
1.1.1 Familia: componentes AP-1(-like ; incluye (c-Fos/c-Jun)				
	c-Jun	4	0	n.s.
	NRL	0	1	n.s.
	CREB-341	0	1	n.s.
	C/EBPalpha	5	4	n.s.
	HLF	1	0	n.s.
1.2 Clase: Factores helix-loop-helix (bHLH)				
	p42Tal-1	9	17	n.s.
	AHR:Arnt	2	0	n.s.
1.3 Clase: Helix-loop-helix / factores leucine zipper (bHLH-ZIP)				
	c-Myc-Max2	1	4	n.s.
2 Superclase: dominios Zinc-coordinating DNA-binding				
2.1 Clase: Receptor de tipo nuclear Cys4 zinc finger				
2.1.1 Familia: Receptores de hormonas esteroideas				
	AR	2	0	n.s.
	ER	0	1	n.s.
2.1.1.2 Familia: Factores tipo receptor de hormona tiroidea				
	COUP-TF1/COUP-ER	14	13	n.s.
	TFI: HNF-4alpha1	2	0	n.s.
	PPARA:RXR-alpha	16	21	n.s.
	PPARG	8	23	0,002
	PPARG-RXRalpha	18	11	n.s.
	HNF-3beta	4	0	n.s.
	RORalpha1	8	4	n.s.
	RORalpha2	9	6	n.s.
	RXR-beta-VDR	0	1	n.s.
2.2 Clase: Diversos Cys4 zinc fingers				
	GATA-4	0	1	n.s.
2.2.1 Familia: Factores-GATA				
2.3 Clase: Dominio Cys2His2 zinc finger				
2.3.1 Familia: Factores ubicuos, incluye TFIIIA, Sp1				
	Sp1	5	17	n.s.
	YY1	1	1	n.s.

Figura 55. Tabla 1.1. Frecuencias para TFBS humanos predichos en las lista de genes EVOO y en la *random list*.

	Símbolo del TF	Frec. EVOO	Frec. random list	Valor p. Chi2
3 Superclase: Helix-turn-helix				
3.1 Clase: Dominio Homeo				
3.1.1 Familia: Solo dominio Homeo; incluye Ubx				
	HNF-1	25	16	n.s.
	HNF-1A	0	1	n.s.
	Pbx1b	1	1	n.s.
3.1.2 Familia: Factores de dominio POU; incluye Oct				
	Oct-1	2	3	n.s.
	POU3F2	2	4	n.s.
	POU6F1	1	0	n.s.
3.3 Clase: Fork head / winged helix				
	HNF-3beta	18	11	n.s.
	FOXO1	35	13	0,001
	FOXO3	22	21	n.s.
3.4 Clase: Factores Heat Shock				
	HSF	0	1	n.s.
3.5 Clase: Clusters de triptófano				
3.5.2 Familia: Ets-type				
	Elk-1	1	0	n.s.
	SAP-1a	1	4	n.s.
	ETV7	0	2	n.s.
3.5.3 Familia: Factores reguladores de interferón				
	IRF-1	1	0	n.s.
	IRF-2	26	19	n.s.
4 Superclase: Factores beta-Scaffold con Contactos Minor Groove				
4.1 Clase: RHR (Región homóloga Rel)				
4.1.1 Familia: Rel/ankyrin; NF-kappaB				
	c-Rel	9	3	n.s.
	NF-kappaB	32	7	0,001
	p50	28	15	n.s.
	p65	26	15	n.s.
4.1.3 Familia: NFAT (Fac Nucleares células T activadas)				
	NF-ATc	0	1	n.s.
4.3 Clase: p53				
	p53	14	23	n.s.

Figura 56. Tabla 1.2. Frecuencias para TFBS humanos predichos en las lista de genes EVOO y en la *random list*.

	Símbolo del TF	Frec EVOO	Frec random list	Valor p Chi2
4 Superclase: Factores beta-Scaffold con Contactos Minor Groove				
4.4 Clase: MADS box				
4.4.1 Familia: Reg. diferenciación; incluye (Mef2)				
	MEF-2A	70	59	n.s.
	MEF2C	2	0	n.s.
	MEF2A	4	4	n.s.
	SRF	22	8	0,032
4.4.2 Familia: Respondedores señales externas, SRF				
4.7 Clase: HMG				
4.7.1 Familia: genes SOX, SRY				
	Sox-9	1	0	n.s.
	SRY-delta	14	8	n.s.
4.7.3 Familia: HMG2-related, SSRP1				
	HMG-IY	37	28	n.s.
4.8 Clase: Factores heteromeric CCAAT				
4.8.1 Familia: Factores heteromeric CCAAT				
	CAAT-BOX	34	16	n.s.
0.6 Otros				
	PAX5	0	3	n.s.
	NFIL3	7	10	n.s.
	RBFOX1	0	1	n.s.
	FOXO1	1	1	n.s.
	FOXP1	0	1	n.s.
	NR6A1	1	1	n.s.
	NHLH1	0	25	0,001
	LHX3	0	1	n.s.
	TOPORS	31	32	n.s.
	NR1H3	1	0	n.s.
	MTF1	1	1	n.s.
	ELF2	0	1	n.s.
	Nkx6-1	2	3	n.s.
	NFE2L2	2	3	n.s.
	Pax6	9	12	n.s.
	PKNOX1	6	8	n.s.
	RREB-1	17	17	n.s.
	Spz1	7	4	n.s.
	ZNF143	19	21	n.s.
	ZBTB6	0	1	n.s.

Figura 57. Tabla 1.3. Frecuencias para TFBS humanos predichos en las lista de genes EVOO y en la *random list*.



Figura 58. Frecuencias de aparición de TFBS en función de su posición genómica comparando la lista de genes EVOO y la *random list*.

microRNAs

Se predijeron 532 sitios de unión para 81 miRNAs diferentes en las regiones 3'-UTR exploradas de los 98 genes que habían mostrado variación en su expresión tras la ingesta de los aceites de oliva. En la *lista random* se identificaron 446 potenciales dianas correspondientes a 77 miRNAs. El grupo de genes cuya expresión se ve modificada por el efecto de los fenoles del aceite de oliva presentaba un enriquecimiento de miRNAs relacionados con fenómenos de inflamación (miR-9, miR-23ab, miR-27ab, miR-223, miR-146), biología vascular (miR-146, miR-214), metabolismo de la glucosa y/o lipídico (miR-9, miR-103, miR-104), DM tipo 2 (miR-29abc) y enfermedad coronaria (miR-1, miR-221, miR-222) respecto a la frecuencia que cabría esperar por azar ($\chi^2=72.321$; $p=0,002$). En la **figura 57** están representados los miRNA que coaparecen con términos relacionados con enfermedad cardiovascular en la literatura y en la **figura 58** los miRNAs para los que no se han encontrado dicha relación al realizar el análisis de *text mining*. En la **figura 59** se representa la red de aquellos genes cuyas proteínas interaccionan y que pueden tener, a través de miRNAs, una regulación común a nivel traduccional. En dicha red se identifican cuatro factores de transcripción (FOSB, JUNB, EGR1 y ZFP36), así como 8 proteínas citosólicas, 1 mitocondrial y 12 miRNAs.

Análisis de enriquecimiento de términos de PubMed relacionados con los miRNAs predichos y enfermedad Cardiovascular					
lista random		lista EVOO		ambas	
miRNAs (n=14)	Términos PubMed	miRNAs (n=22)	Términos PubMed	miRNAs (n=44)	Términos PubMed
miR-132	biología vascular obesidad	miR-1 miR-9 miR-23ab miR-27ab miR-29abc miR-30b miR-103 miR-107 miR-146 miR-214 miR-221 miR-222 miR-223	enfermedad arterial coronaria inflamación inflamación Diabetes tipo 2 inflamación metabolismos glucídico y lipídico metabolismos glucídico y lipídico biología vascular, inflamación, met. lipídico biología vascular enfermedad arterial coronaria enfermedad arterial coronaria inflamación	miR-15 miR-16 miR-17-5p miR-34a miR-124 miR-125 miR-143 miR-150 miR-181	inflamación inflamación enfermedad arterial coronaria biología vascular inflamación Diabetes tipo 2 biología vascular, obesidad biología vascular obesidad
	Enriquecimiento (%)	Enriquecimiento (%)	Enriquecimiento (%)	Enriquecimiento (%)	Enriquecimiento (%)
	1/14 (7.1%)	13/22 (59%)	9/44 (20.5%)		

Figura 59. Análisis de enriquecimiento de términos de PubMed relacionados con los miRNAs predichos y la enfermedad cardiovascular.

miRNAs que no coaparecen con términos relacionados con la ECV en la literatura
<i>random list</i> miR-26ab, miR-40b, miR-96, miR-139-5p, miR-205, miR-212, miR-218, miR-302, miR-375, miR-425, miR-489, miR-1271, miR-1297
<i>lista EVOO</i> miR-19, miR-101, miR-128, miR-144, miR-148, miR-152, miR-206, miR-338, miR-761
<i>ambas</i> miR-15, miR-16, miR-17-5p, miR-34a, miR-124, miR-125, miR-130, miR-143, miR-150, miR-181, miR-519d, let-7/98, miR-7, miR-7ab, miR-20, miR-30a, miR-30a-5p, miR-30b-5p, miR-30cde, miR-34b-5p, miR-34c, miR-34c-5p, miR-93, miR-106, miR-129, miR-129-5p, miR-137, miR-141, miR-182, miR-195, miR-200a, miR-203, miR-204, miR-211, miR-301, miR-351, miR-383, miR-384-5p, miR-424, miR-449, miR-449abc, miR-497, miR-506, miR-699

Figura 60. MiRNAs predichos en cada lista de genes que no coaparecen con términos relacionados con enfermedad cardiovascular en la literatura.

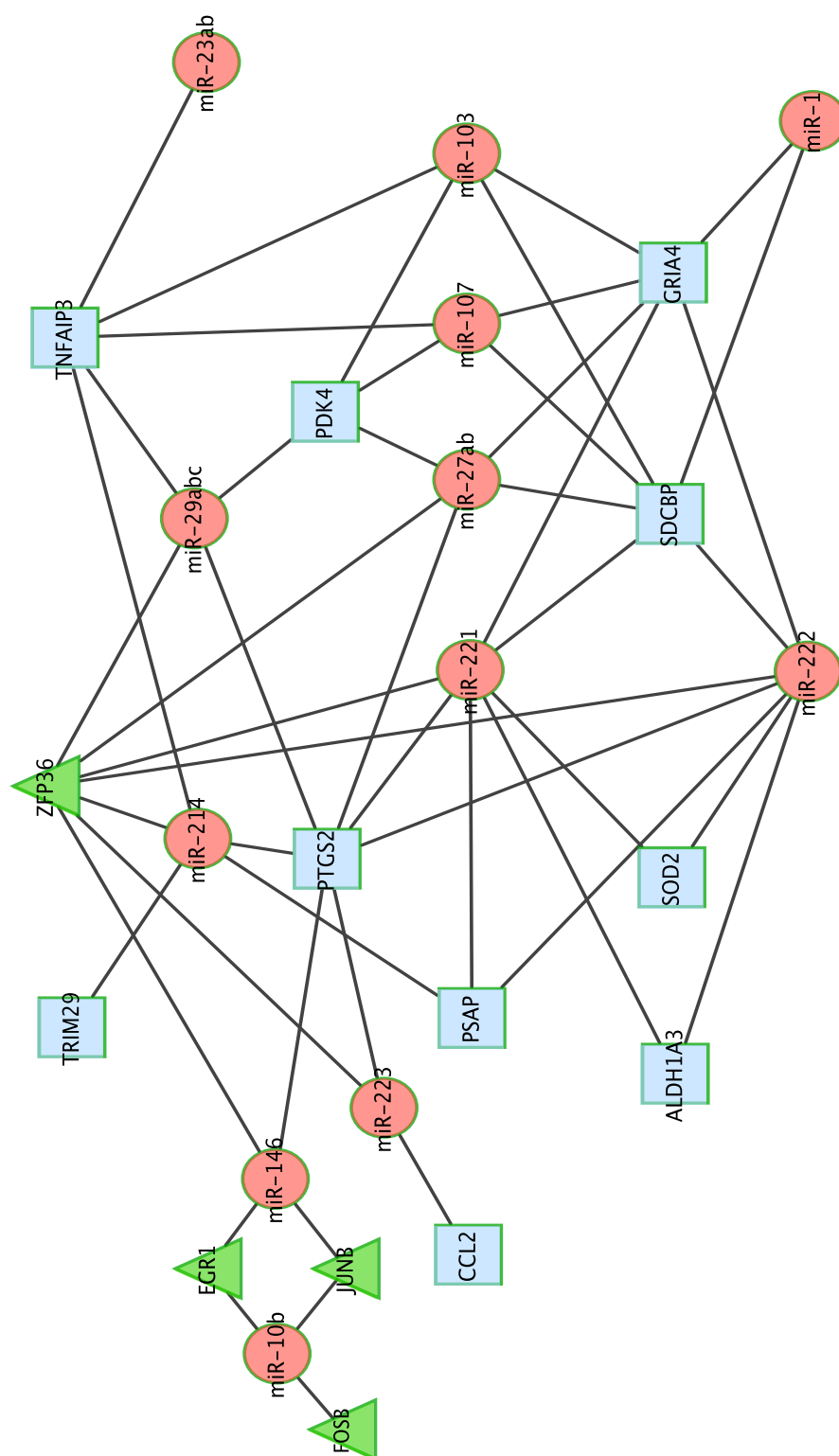


Figura 61. Red de interacción de proteínas (cuadrado azul), factores de transcripción (triángulo verde) y miRNAs (círculo rojo).

Discusión

7. Discusión

Características de la población estudiada y de la intervención alimentaria.

Al analizar las características basales de los participantes en el estudio en relación al polimorfismo Glu298Asp de la NOS3 no encontramos diferencias estadísticamente significativas, por lo que consideramos válidos los resultados para su posterior análisis sin necesidad de ajustar por factores de confusión. Se realizó un ajuste de los aceites consumidos como factor el orden de la intervención, sin que existieran diferencias significativas.

Análisis de la respuesta de marcadores de inflamación, lipídicos y glucídicos.

No encontramos efectos significativos ni del tiempo ni de los diferentes tipos de aceite en cuanto a los marcadores inflamatorios. Los parámetros del metabolismo lipídico se vieron afectados por el tiempo en nuestro estudio en concordancia con su efecto biológico, alcanzando los picos postprandiales, tal y como cabía esperar para cada marcador.

El metabolismo hidrocarbonado también se modificó a lo largo del tiempo alcanzando su pico postprandial a los 60 minutos aproximadamente.

Este hecho nos parece de especial importancia ya que nos permite suponer que los cambios que apreciamos en el trabajo se deben a la diferencia de concentración en compuestos fenólicos del aceite.

Análisis de la vasodilatación mediada por endotelio, de las variaciones en la concentración de NO(x) y eNOS y correlaciones.

Nuestros hallazgos demuestran que los pacientes con SMet que tienen genotipo TT para el polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983) presentan una

función endotelial postprandial menos eficiente, como se evidencia al desarrollar una menor PORHmax, mucho más evidente cuando el aceite utilizado en la preparación del desayuno contenía baja concentración en compuestos fenólicos. En nuestro estudio hemos constatado que existe una interacción entre el genotipo y la concentración de compuestos fenólicos del aceite, ya que una alta concentración de dichas sustancias es capaz de amortiguar el deterioro de la función endotelial que experimentan dichos pacientes. En un intento de aclarar cuáles podían ser los mecanismos biológicos subyacentes a dicha interacción, encontramos que las personas con genotipo TT tenían además, una concentración menor de eNOS y una menor biodisponibilidad de NO. Es posible que este grupo de pacientes presente una respuesta vasodilatadora insuficiente cuando, en condiciones de estrés, sea necesario aumentar la producción de NO mediante el incremento de la actividad de eNOS, pues en su caso la enzima sería disfuncionante. Sin embargo, como hemos visto, podría compensarse esa menor producción de NO con una mayor estabilidad del mismo, al existir en el medio moléculas con alta capacidad antioxidante, como es el caso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva que usamos en nuestro estudio.

El periodo postprandial se ha convertido en un activo campo de investigación en torno a la enfermedad cardiovascular. En la cultura occidental el hombre pasa la mayor parte de su tiempo en situación postprandial, estado que influye de manera directa en el riesgo cardiovascular [287]. En este periodo del día se produce una disfunción endotelial transitoria, fundamentalmente tras la ingesta de comidas con contenido graso. No obstante este fenómeno no es uniforme y puede estar condicionado por variables intrínsecas y extrínsecas, entre las que se encuentran ciertos polimorfismos genéticos y algunas actividades de la vida cotidiana como el ejercicio, el consumo de tabaco o el patrón de alimentación. Nuestro grupo ha publicado previamente que la ingesta de EVOO es capaz de modular la función endotelial postprandial en pacientes hipercolesterolémicos [37].

Hay varios posibles mecanismos subyacentes a este hecho, pero parece ser

que la biodisponibilidad del NO constitutiva es uno de los principales factores determinantes de la respuesta vasodilatadora endotelial. La biodisponibilidad del NO puede verse alterada tanto por una disminución en su producción como por su rápida degradación en un entorno celular de gran estrés oxidativo. Los efectos antioxidantes *in vivo* de los compuestos fenólicos son de sobra conocidos, tal y como hemos venido reiterando hasta ahora [37, 24, 288, 65, 289]. En concordancia con esas evidencias, recientemente se ha publicado, que la administración a ratones de una dieta rica en aceite de oliva incrementa tanto la expresión génica de eNOS en eritrocitos de ratón, como su actividad, por medio de la activación del transporte de L-arginina [290].

Además, ciertas variaciones genéticas de la NOS se han implicado en la función endotelial postprandial. Nuestro grupo ha demostrado recientemente que voluntarios sanos portadores del alelo T del polimorfismo NOS3 Glu298Asp (rs1799983), a los que se les administra una comida rica en AG saturados, muestran una función endotelial postprandial menos eficiente comparada con los voluntarios homocigotos para el alelo G [291]. Otros estudios han relacionado el alelo T con un incremento en el riesgo de vasoespasma coronario en pacientes con cardiopatía isquémica, lo que puede indicar que parte de ese riesgo aumentado esté mediado por alteraciones en la respuesta vasodilatadora fisiológica [292], en línea con nuestros resultados. Sin embargo, son pocos los trabajos relativos a la disfunción endotelial que han investigado los fenómenos biológicos, a través de los que dicho polimorfismo se relaciona con enfermedades cardiovasculares (CI, ictus e hipertensión). Nuestros datos apuntan que algunas de estas diferencias en la función endotelial podrían estar mediadas por la vía del NO, a su vez condicionada por variantes genéticas del polimorfismo NOS3 Glu298Asp. Para intentar demostrar nuestras hipótesis, realizamos determinaciones plasmáticas de eNOS y NO(x), siendo ambas concentraciones menores en el grupo de pacientes con genotipo TT en comparación con aquéllos que mostraban genotipos GT o GG para dicho polimorfismo. Pensamos que podría deberse a una menor concentración constitutiva de eNOS en el grupo de pacientes con el genotipo

TT, hecho que explicaría la menor biodisponibilidad de NO observada tanto en periodo de ayunas como en la fase postprandial. Se sabe que la biodisponibilidad del NO permite mantener tanto el tono basal como la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio, y que su alteración promueve el estrés oxidativo y un ambiente inflamatorio local [293]. En este sentido, al analizar la relación entre las concentraciones de NO(x) y la respuesta vasodilatadora endotelial (medida como PORH max), encontramos una excelente correlación tras la ingesta de aceites con alto y medio contenido en fenoles, que se perdía cuando la concentración de dichas sustancias era baja y los pacientes tenían genotipo TT para el polimorfismo NOS3 Glu298Asp. Por lo que consideramos como hipótesis que, en un ambiente con baja concentración de NO y escasos antioxidantes, otros mecanismos adicionales deben contribuir a la vasodilatación arterial (neuronal, AMPc, calcio o vía de las quinasas).

El mecanismo exacto por el que un simple cambio en un nucleótido puede ocasionar un efecto tan importante sobre la función endotelial está comenzando a desvelarse. Se ha observado en estudios experimentales que la presencia del alelo T condiciona una menor actividad de la eNOS. Al existir T en lugar de G en la posición nucleotídica 894, el gen codifica una proteína que contiene aspartato en lugar de glutamato, lo que conduce a una mayor susceptibilidad a que un fragmento de 100 kDa sea escindido de la proteína, disminuyendo así su actividad enzimática [234]. Intentando buscar otros mecanismos adicionales, que nos ayuden a entender cómo este polimorfismo puede influir en la regulación de la actividad de la eNOS y por tanto, la producción de NO, hay que tener en cuenta el papel que juega la localización intracelular de la eNOS en las caveolas. Se ha descubierto recientemente que los portadores del alelo T tienen un menor enriquecimiento de eNOS acoplada a Cav-1, proteína principal de las caveolas endoteliales y donde se almacena la eNOS inactiva. En situación de estrés, esta enzima se disocia de Cav-1 aproximadamente un 40% menos cuando son portadores del alelo T en comparación con el genotipo GG [294]. De este modo los portadores del alelo T, no solo tendrían una menor reserva de masa

enzimática, sino que además ocurriría una disrupción funcional en momentos determinantes de estrés.

En nuestro estudio hemos combinado dos posibles factores estresantes para el endotelio de los pacientes con SMet: el estado postprandial y la isquemia transitoria. Primero utilizamos aceite de oliva virgen con alto contenido en compuestos fenólicos, como fuente de grasa, creando así un ambiente menos proinflamatorio y prooxidante. Luego testamos esa situación con varias concentraciones de dichos antioxidantes naturales. De acuerdo con nuestra hipótesis, los portadores del alelo T mostraron que una respuesta vasodilatadora endotelial menos eficiente, con menor respuesta PORHmax y menores concentraciones plasmáticas de eNOS y $\text{NO}(x)$. Pero el hallazgo más interesante ha sido comprobar la existencia una interacción gen-dieta, tanto en la PORH max como en los otros marcadores plasmáticos de función endotelial, con menores diferencias entre genotipos cuanto mayor es la concentración de compuestos fenólicos del aceite consumido. En otras palabras, cuanto mayor concentración de compuestos fenólicos hay en el medio, más se reduce el efecto propio que confiere el ser portador del alelo T del polimorfismo NOS3 Glu298Asp. Estos resultados pueden estar mediados por el efecto antioxidante y antiinflamatorio del aceite de oliva virgen en general y de los compuestos fenólicos en particular [37, 288, 289, 65].

Es importante recalcar que nuestro trabajo ha analizado el efecto biológico del aceite de oliva tras una única comida y que además estos resultados deberían ser replicados en diferentes poblaciones y tras una ingesta sostenida de los diferentes aceites incluida en población no caucásica. Se sabe que las diferencias étnicas pueden ser muy relevantes cuando de estudios genéticos se trata. De hecho las frecuencias alélicas del polimorfismo Glu289Asp de la NOS3 pueden variar considerablemente entre poblaciones caucásicas, africanas y asiáticas. Los beneficios de un consumo mantenido de aceite de oliva son bien conocidos y no solo debido a su contenido en AG monoinsaturados sino también debido a su contenido en compuestos minoritarios, que como se ha venido reiterando poseen múltiples efectos biológicos beneficiosos. Nuestro trabajo ha permitido conocer

un nuevo beneficio: la mejoría de la función endotelial, especialmente en una población que constitutivamente tienen una respuesta vasodilatadora deteriorada, por el genotipo que portan. Este beneficio se puede alcanzar tras la toma de una dosis única de aceite de oliva con alto contenido en fenoles, un hecho importante en la práctica clínica diaria a fin de aconsejar mejor a nuestros pacientes acerca de sus hábitos de vida saludables.

Análisis de la expresión génica diferencial.

Nuestro trabajo demuestra que la fracción fenólica del aceite de oliva virgen es capaz de reprimir *in vivo* la expresión de varios genes relacionados con rutas de la inflamación en pacientes con SMet durante el periodo postprandial. Estos resultados nos parecen de especial relevancia, ya que, como comentamos al inicio, el SMet se considera un estado de inflamación crónica de bajo grado y cualquier medida que ayude a corregir esta situación, limitará tanto el desarrollo como la perpetuación de la disfunción endotelial, la placa aterosclerótica y la enfermedad cardiovascular [295, 296].

Uno de los genes cuya expresión se ve reducida tras la ingesta de aceite de oliva es PTGS2. Este gen codifica la prostaglandin-endoperóxido sintasa 2 (COX-2), una isoenzima inducible involucrada en la biosíntesis de prostaglandinas, que utiliza como sustrato el ácido araquidónico. En macrófagos, la actividad de la COX-2 se incrementa rápidamente en respuesta a ciertos estímulos como la citoquina proinflamatoria IL1 β . Existen pruebas suficientes que indican que la sobreexpresión de PTGS2 y la síntesis de prostaglandinas influyen en el estado inflamatorio crónico [297]. De la Puerta y cols. observaron una reducción de la producción de IL1 β y de la actividad de la COX-2 en macrófagos de ratón tras la ingesta de una dieta enriquecida con aceite de oliva [298]. Por otro lado, se ha comprobado que el consumo sostenido de una DMed enriquecida con aceite de oliva revierte la sobreexpresión de COX-2 que presentan los pacientes con elevado RCV [72]. Recientemente se ha señalado la capacidad del hidroxitirosol, uno de los compuestos fenólicos más importante y más biológicamente activos

del aceite de oliva, de disminuir *in vitro* la expresión de PTGS2 inducida por LPS [299], probablemente mediante la reducción de la activación del factor de transcripción nuclear NF κ B [300]. Nuestro estudio ha mostrado que la ingesta de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos en humanos se ha asociado a una disminución de la expresión de ambos genes, IL1 β y PTGS2, comparado con la ingesta de aceite de oliva con baja concentración de dichos compuestos. Estos efectos podrían contribuir a la disminución del estado inflamatorio postprandial que se atribuye a la DMed rica en aceite de oliva, en consonancia con los resultados obtenidos en otros trabajos en este sentido [42, 45, 46].

La ruta de interacción citokina-citokina contiene una red de proteínas (quimiocinas y sus receptores) involucrada en el reclutamiento y activación de leucocitos durante la respuesta inflamatoria. En nuestro trabajo hemos visto que la expresión de algunos genes que codifican proteínas de dicha ruta, como CCL3, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCR4, IL1B, IL6 y OSM, es reprimida tras la ingesta de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos. El gen CCL3, que codifica la proteína inflamatoria 1 (MIP-1A), se ha relacionado con el fenómeno de infiltración de monocitos en el tejido adiposo, efecto clave en el desarrollo del SMet [301]. CXCL1, CXCL2 (MIP2A) y CXCL3 (MIP2B) codifican quimiocinas pequeñas y estructuralmente relacionadas que regulan el tráfico celular de varios tipos de leucocitos, mediante interacciones con un subgrupo de receptores acoplados a proteína G. Elgazar-Carmon y cols. han demostrado que la infiltración precoz de neutrófilos en el tejido adiposo de ratón puede estar mediada por CXCL1, un proceso que podría preceder a la infiltración macrofágica tras el consumo a largo plazo de una dieta rica en grasas [302].

El gen IL6 codifica una citoquina con el mismo nombre, que está involucrada en una gran variedad de condiciones relacionadas con fenómenos inflamatorios, como SMet, la DM tipo 2 o la artritis reumatoide [112, 303, 304]. Por otro lado se ha propuesto que IL6 y OSM (que codifica oncostatina M), un regulador de crecimiento y miembro del grupo de citocinas de la IL 6, pueden contribuir al incremento del riesgo cardiovascular en pacientes obesos por medio de

sobreexpresión de PAI-1 en el tejido adiposo [305]. Además se ha encontrado sobreexpresada en lesiones arterioscleróticas, pudiendo contribuir a la progresión de la arteriosclerosis promoviendo la proliferación de células musculares lisas [306] y mediante la expresión de factor tisular que a su vez es activado por NF- κ B [307].

La activación de las rutas del factor de transcripción NF- κ B y la proteína MAPK dan lugar a una cascada de fosforilaciones que inducen a su vez, la activación de otros factores de transcripción como CREB y AP-1, que actuarían en las regiones promotoras de diversos genes relacionados con la respuesta inflamatoria como IL-6 y TNF α [308]. La represión de todas las quimiocinas anteriores podría ser consecuencia de la interacción entre los compuestos fenólicos del aceite de oliva y la vía de señalización NF- κ B/MAPK/AP-1. NF- κ B representa una familia de factores de transcripción esenciales para la regulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, al ser activada por citoquinas inflamatorias y otros mediadores de estrés oxidativo [308, 309]. Se ha demostrado que la activación del NF- κ B juega un papel importante en la disfunción endotelial en obesos [310]. Este factor también se ha relacionado con la adipogénesis y el desarrollo de resistencia insulínica que aparece en el SMet [119, 311]. El producto del gen SGK1 es una quinasa regulada por glucocorticoides, con un papel fundamental en la respuesta al estrés. Al ser una proteína diana de la cascada de señalización PI3K, su activación incrementa la actividad de NF- κ B mediante la fosforilación de su quinasa inhibitoria IKK α [312]. De este modo, la disminución de la expresión del gen SGK1 por los compuestos fenólicos del aceite de oliva disminuiría la activación del NF- κ B. El incremento de actividad de SGK1 desencadenaría funciones glucocorticoides sobre la presión sanguínea y la ganancia ponderal, sin que existiesen concentraciones elevadas de dichas sustancias en el plasma sanguíneo [313]. Además, el gen NF κ BIA, que codifica I κ B α , miembro de la familia I κ B encargada de evitar la traslocación del NF κ B, se reprime tras la ingesta de HPOO. Ghanim y cols. describieron un incremento de I κ B α en células mononucleares de sujetos obesos al compararlas con sujetos delgados. Este

incremento paradójico se debe probablemente al hecho de que NF- κ B se une al promotor del gen de I κ B α a fin de activar su transcripción, y por este motivo su expresión estaría aumentada. I κ B α es un inhibidor rápido de la actividad NF- κ B. De este modo se alternarían ciclos de inducción y de unión de I κ B α a NF- κ B que reducirían rápidamente su actividad transcripcional y la expresión de I κ B α , seguido de ciclos rápidos de inhibición y estimulación de la actividad de NF- κ B a nivel transcripcional de forma concordante con la reducción de NF κ BIA que se muestra en nuestros resultados [314].

La hipótesis de que la activación de NF- κ B disminuye con los compuestos fenólicos del aceite de oliva se sustenta también en otros dos estudios *in vivo* que demostraron una reducción en la activación de NF- κ B tras el consumo de aceite de oliva [45, 46]. En otros estudios *in vitro* se ha observado una disminución en la activación de dicho factor mediada por resveratrol, considerando como hipótesis que esta vía utilizaría un mecanismo común a este compuesto, por el cual los compuestos fenólicos reducirían la expresión de genes que codifican citoquinas inflamatorias y moléculas de adhesión [315].

Tras la ingesta de HPOO encontramos un descenso en la expresión de DUSP1 y DUSP2. Estos genes codifican serina-treonina fosfatasas encargadas de disminuir tres efectores finales de la vía de las MAP kinasas: p38, MAPK/ERK y SAPK/JNK [308]. Además, TRIB1, otro de los genes reprimidos tras la ingesta de HPOO, está involucrado en la señalización de MAPK, participando en la activación de proteínas ERK [316] sobreexpresado en placas ateroscleróticas humanas [317]. Así, la reducción en la expresión de TRIB1 por los compuestos fenólicos del aceite de oliva podría promover el descenso de la activación de ERK. Esta observación concuerda con estudios *in vitro* que demuestran que los compuestos fenólicos del té verde reprimen la expresión de PTGS2 mediante la disminución de ERK y la activación de p38 MAPK [318]. Además, recientemente García-Rios y cols han estudiado el efecto que ejerce el polimorfismo rs17321515 del gen TRIB1, en pacientes con hipercolesterolemia familiar, encontrado que el polimorfismo modularía el efecto del tabaco sobre los niveles

de lípidos plasmáticos y la relación entre la presencia de arco corneal y dichos niveles [319]. Nuestros resultados permiten establecer como hipótesis que los compuestos fenólicos del aceite de oliva influirían en la activación de AP-1, conjunto de heterodímeros de JUN, FOS y familias de factores de transcripción activados [320], a través de dos mecanismos diferentes. Por un lado a través de la represión de JUN, JUNB y FOSB, tal y como se ha observado tras la ingesta de HPOO y por otro lado de manera indirecta, a través de la vía de las MAPK donde la intensidad relativa y la duración de la activación determinan el tipo de respuesta. Recientemente Chen y cols han descrito una red de genes con enriquecimiento de macrófagos (MEGN) de unos 1237 genes que presentan relaciones causales con enfermedades complejas asociadas al SMet [321]. De entre estos 1237 genes, 13 de ellos están incluidos en nuestro conjunto de genes expresados de manera diferencial en PMBCs tras la ingesta aguda de HPOO: JUN, RGS1, CXCL2, ANXA3, RASGEF1B, CD83, CA2, EGR2, DIAPH3, CCL3 y TLR7, PSAP e IFIT3. De Mello y cols evaluaron en individuos con deterioro del metabolismo hidrocarbonado y SMet, cómo la pérdida de peso a largo plazo se asoció a un descenso de la expresión de IL1B [322]. Kaizer y cols mostraron mediante análisis de *microarrays* en PBMCs un conjunto de 22 genes sobreexpresados en pacientes con DM tipo 1 y 2 en comparación con un grupo de sujetos sanos [323]. 8 de esos 22 genes sobreexpresados en los pacientes con diabetes tipo 2, se reprimieron en nuestro estudio tras el consumo de HPOO (IL1B, EGR2, EGR3, PTGS2, FOSB, CXCL1, SGK y TRIB1). Además la expresión de PBEF1, otro gen involucrado en la patogénesis de la DM tipo 2 [324], se redujo tras el consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos.

Análisis predictivo de elementos reguladores comunes.

Nuestros resultados apuntan a la existencia de un mecanismo de regulación de la expresión de genes en el que uno o más factores de transcripción y/o miRNAs actuarían de manera coordinada en respuesta al contenido fenólico del aceite de oliva. Los estudios realizados hasta ahora, concernientes al mecanismo de acción de los compuestos fenólicos, muestran que sus efectos se deberían no solo a su naturaleza antioxidante sino también al efecto modulador de rutas de señalización celular o actuando por sí mismos como moléculas de señalización sobre receptores aún desconocidos [325]. En nuestro caso, las regiones reguladoras de la transcripción situadas *upstream* de aquellos genes cuya expresión está modulada por el contenido fenólico del aceite de oliva presentan un enriquecimiento de sitios de unión para el factor de transcripción nuclear NF- κ B. NF- κ B es un eje central regulador de múltiples procesos inflamatorios crónicos [326] y su activación durante el postprandio disminuye en respuesta a la DMed enriquecida en aceite de oliva [46, 327, 41, 328, 329, 94, 330]. FOXQ1 codifica un factor de transcripción de la familia FOX [331] involucrado en la regulación transcripcional de genes relacionados con el desarrollo embrionario, el ciclo celular específica de tejidos y el crecimiento tumoral [332]. Por otro lado, el gen CSF codifica un TF miembro de la superfamilia MADS (MCM1, *Agamous*, *Deficiens*, SRF) que regula algunos genes que actúan como mediadores celulares, como FOS, que participan en el ciclo celular, apoptosis, desarrollo y diferenciación celular. De cualquier manera la información referente a los otros TF que obtuvimos en este estudio y sus efectos asociados al consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos es escasa.

Por medio de un abordaje bioinformático, NF- κ B se identificó como una diana potencial para miR-9. Estudios *in vitro* han mostrado que la sobreexpresión de miR-9 reduce NF- κ B a nivel proteico [333] y de ARNm [334]. Nuestro estudio ha revelado que algunos de los miRNAs obtenidos están relacionados con la inflamación y con la diferenciación macrofágica. En este sentido, el hecho de que la expresión de miR-9 en monocitos se induzca por factores proinflamatorios

como LPS, agonistas TLR2 y TLR7/8 o TNF α /IL1 sugiere que el papel principal del miR-9 es el de contrarregular la respuesta inflamatoria y proliferativa desencadenada por dichos estímulos mediante la represión de NF- κ B. En el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos, se produce una disminución de miR-223, lo que conlleva un incremento concomitante de la expresión de IKK α y un descenso de la expresión de genes proinflamatorios inducidos por NF- κ B [94]. MiR-223 se comportaría, de esta manera, como otro contrarregulador de la inflamación impidiendo la activación masiva de macrófagos. De hecho, la activación de la inhibición de NF- κ B por SC-514 (un inhibidor de IKK2) bloquea la expresión de algunos de los miRNAs inducidos por LPS, como miR-23ab y miR-27ab [335]. Se postula que es la acción de la subunidad p65 de NF- κ B, la que regula transcripcionalmente la expresión de dichos miRNAs.

Se ha identificado SLC2A4 (GLUT4), un transportador de la glucosa, como otra diana de miR-223 lo que podría involucrar a esta molécula en la regulación de la captación de glucosa y el desarrollo de resistencia a la acción de la insulina [336]. Tanto miR-9, miR-103 como miR-104 se han visto involucrados en el metabolismo de la glucosa y de las grasas. MiR-9 regularía la secreción de insulina, al aumentar los niveles de granufilina (SYTL4) en la célula beta pancreática por medio de la expresión del factor de transcripción ONECUT2 [337]. Sin embargo, la sobreexpresión de miR-29a, miR-29b y miR-29c en modelos experimentales con ratones reduce la captación de glucosa mediada por insulina en los adipocitos [338]. Por su parte, cambios en los niveles de miR-103 y miR-107 se han relacionado con la expresión de diversos genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de los ácidos grasos dentro del adipocitos en respuesta a una dieta enriquecida en ácido linoleico [339]. MiR-27A alternativamente utiliza como dianas PPARG y CEBPA que inhiben la formación de adipocitos y se reprimen durante la adipogénesis [340].

Resulta interesante comprobar cómo algunos aspectos biológicos relativos a la enfermedad coronaria están modulados por algunos miRNAs cuyas potenciales dianas encontramos en el grupo de genes diferencialmente expresados tras la

ingesta de aceite con alto contenido fenólico. Se ha encontrado una alteración en la expresión de miR-146 y miR-214 en arterias humanas dañadas [341] mientras que la expresión del primero en grasa subcutánea se correlaciona de una manera positiva con las concentraciones de triglicéridos en ayunas [342]. Los niveles de expresión de miR-221 y miR-222 se asocian de forma positiva con la concentración de precursores de células endoteliales, menores en pacientes con enfermedad coronaria y que aumentan tras el tratamiento con atorvastatina [343]. Por otra parte la sobreexpresión de miR-1 parece reducir la conducción cardíaca y el automatismo mediante la represión post-transcripcional de KCNJ2 y GJA1, lo que reduce el potencial arritmogénico tras un infarto de miocardio [344]. MiR-29 por su parte, inhibe la respuesta fibrótica tras sufrir un infarto de miocardio con lo que esto supone en la recuperación funcional del que lo padece [345]. Recientemente Rantalainen y cols. han investigado las diferencias de expresión de miRNAs en tejido adiposo visceral y glúteo de sujetos con y sin SMet, encontrando diferencias significativas en el perfil fenotípico molecular de miRNAs entre ambos tejidos. Al comparar los miRNAs de dicho estudio que estaban significativamente relacionados con sus correspondientes dianas de ARNm, con los miRNAs obtenidos en nuestro trabajo, observamos que había varios en común como miR-128, miR-137, miR-142, miR-144, miR-182, miR-183, miR-217, miR-223, miR-410 ó miR-488 [346], abriendo así una posibilidad a futuros abordajes para investigar el efecto modulador que sobre dichos miRNAs y sus dianas, podría tener la fracción fenólica del aceite de oliva en el tejido adiposo.

En la red de interacción que construimos, fue incluido un grupo de miRNAs involucrados en la biología del vaso arterial, los mecanismos inflamatorios que acompañan a su estado disfuncionante y al desarrollo de la enfermedad coronaria: (miR-1, miR-23ab, miR-27ab, miR-30b, miR-146, miR-214, miR-221, miR-222, miR-223) [94, 336, 339, 340, 347, 348, 343, 349, 338]. Todos los TF incluidos en dicha red, FOSB, JUNB, EGR1 y ZFP36, mostraron cambios en su expresión tras el consumo de compuestos fenólicos contenidos en el aceite

de oliva. En esta red, FOSB, JUNB y EGRF 1 tienen un papel fundamental conectando otros miRNAs y genes que codifican varias proteínas relacionadas con procesos inflamatorios. Recientemente, Gomard y cols. han observado que la inducción transcripcional de NF- κ B mediada por JUNB se correlaciona con la inducción de TNF- α e IL-6 [350], dos citoquinas estrechamente relacionadas con el desarrollo de SMet.

Podríamos establecer, de esta manera, la hipótesis de un mecanismo por el que los compuestos fenólicos del aceite de oliva modularían, a través de miRNAs y TFs, la expresión de genes que codifican proteínas de las rutas de respuesta inflamatoria. En este sentido, Milenkovic y cols. han publicado un trabajo en los últimos meses en el que estudian el efecto de diferentes compuestos fenólicos sobre la expresión de miRNAs y ARNm en hepatocitos de ratones Apo E -/-. Observaron que aquellos genes que comparten la peculiaridad de que tanto su expresión como la expresión de ciertos miRNAs, para los que poseen elementos reguladores en sus regiones no codificantes, se ven modificadas por la acción de los compuestos fenólicos, están involucrados en cerca de 30 rutas biológicas (KEGG), entre las que destacan la ruta de las MAPK quinasas, receptor de células T, adipoquinas, insulina o señalización Wnt. Sugiriendo así dianas celulares que pueden regularse por la acción de los compuestos fenólicos en ambos niveles: miRNA y RNAm[351].

Nuestros resultados están basados en predicciones computacionales, que conllevan sus tasas de falsos positivos y negativos. Durante varios años, la búsqueda mediante predicciones de dianas de miRNAs y TFBSs en las regiones 3'UTR se ha considerado bastante problemática [352]. Sin embargo existen estrategias encaminadas a minimizar estas tasas de falsos positivos a través del uso de análisis filogenético en paralelo para identificar las regiones con mayor preservación evolutiva y el análisis conformacional y energético de las estructuras miRNA-ARNm [353]. En el análisis que llevamos a cabo, limitamos el número de predicciones iniciales estableciendo un filtro que incrementara el número de verdaderos positivos en la selección final de resultados, de ambas clases de predicciones. Esta

estrategia conservadora y el hecho de que el listado de genes fue obtenido de un estudio de intervención alimentaria con un diseño controlado y aleatorizado, nos hacen confiar en la validez de nuestros resultados. No obstante estos resultados no dejan de ser preliminares hasta que un diseño experimental de interacción de proteínas (basado en un sistema de doble híbrido por ejemplo) o comprobando la acción del mRNA después de una transfección de dicho miRNA, pongan a prueba nuestras hipótesis.

Conclusiones

8. Conclusiones

Conclusión principal

La mejoría en la función endotelial que experimentarían los pacientes con SMet al consumir aceite de oliva virgen estaría modulada por la interacción existente entre la concentración en compuestos fenólicos y polimorfismo Glu298Asp NOS3 (rs1799983).

Conclusiones secundarias

1. Las concentraciones de eNOS y de $\text{NO}(x)$, cuya variabilidad determina diferencias en la respuesta vasodilatadora mediada por el endotelio durante el periodo postprandial, dependen tanto de la composición en compuestos fenólicos del aceite de oliva como del genotipo de NOS3 Glu298Asp (rs1799983), de tal modo que aquellos pacientes con genotipo TT serían los que más se beneficiarían del consumo de aceite de oliva con alto contenido en dichas sustancias.
2. Gran parte de los efectos beneficiosos observados tras ingerir de aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos estaría mediado por modificaciones en la expresión de diversos genes relacionados con rutas metabólicas implicadas en el desarrollo de fenómenos inflamatorios o de la regulación del ciclo celular como son la ruta de NFkB/AP-1, la interacción de citoquinas y sus receptores, el metabolismo del ácido araquidónico o la cascada de MAP quinasas.
3. Es probable que exista un complejo sistema regulador de los cambios en la expresión génica tras la ingesta de aceite de oliva en el que participen factores de transcripción y miRNAs, aunque creemos necesario diseñar futuros experimentos tanto en cultivos celulares como en modelos de experimentación animal que permitan poner a prueba dicha hipótesis.
4. Nuestros resultados proporcionan una base molecular que podría ayudar a

entender el reducido riesgo de enfermedad cardiovascular observado en el área Mediterránea, donde el aceite de oliva representa la principal fuente de grasa de la dieta. Estos hallazgos refuerzan la relación existente entre la alimentación y el síndrome metabólico, aportando nuevas evidencias del efecto beneficioso que el consumo de aceite de oliva virgen en el marco de un estilo de vida saludable puede tener.

9. Nomenclatura

Nomenclatura

8-OHdG	8 hidroxideoxiguanosina
8OHGua	8 hidroxiguanina
ABC	Área bajo la curva
Ach	Acetilcolina
ADA	American Diabetes Association
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AHA	American Heart Association
APO A-1	Apolipoproteína A-I
APO B	Apolipoproteína B
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adult Treatment Panel
CAT	Catalasa
Cav-1	Caveolina 1
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

CHO	Hidratos de carbono
CI	Cardiopatía isquémica
CNV	Variaciones en el número de copias
COX	Ciclooxigenasa
CT	Colesterol total
DHPE	2-(3,4-di-hidroxifenil)-etanol
DM tipo 2	Diabetes mellitus tipo 2
DMed	Dieta Mediterránea
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
ERNs	Especies radicales reactivas de nitrógeno
EROs	Especies radicales reactivas de oxígeno
EVOO	Extra virgin olive oil: aceite de oliva virgen
F2IP	F2-isoprostanos
FMD	Dilatación mediada por flujo
FVII	Factor VII de la coagulación
GO	Gene Ontology
GPx	Glutation peroxidasa
GR	Glutation reductasa
GTN	Gliceril trinitrato
GWAS	Genome-Wide Association Studies

H2O2	Peróxido de hidrógeno
HDLc	Colesterol vehiculizado en lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA reductasa	Hidroximetilglutarilcoenzima A reductasa
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPOO	Aceite de oliva con alto contenido en compuestos fenólicos
HT	Hidroxitirosol
HUVECs	Células endoteliales procedentes de vena umbilical humana
IAS	International Atherosclerosis Society
IASO	International Association for the Study of Obesity
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
JNK	JUN kinasa
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
LDF	Flujometría Laser Doppler
LDL-c	Colesterol vehiculizado en lipoproteínas de baja densidad
LDLox	LDL oxidada
Lowess	Locally weighted linear regression
LPO	Lipoperóxidos

LPOO	Aceite de oliva con bajo contenido en compuestos fenólicos
LPS	Lipopolisacáridos
LTB4	Leucotrieno B4
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1
miRNAs	Micro ARN
MMP-9	Metalopeptidasa de matriz 9
MPOO	Aceite de oliva con medio contenido en compuestos fenólicos
NCEP	National Cholesterol Education Program
NEFAs	Ácidos grasos libres no esterificados
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
NO	Oxido nítrico
NOO·	Peroxinitritos
PAI-1	Inhibidor del activador tisular del plasminógeno
PAT	Tonometría arterial periférica
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLIN	Gen que codifica perilipina
PON	Paraoxonasa
PORH	Hiperemia reactiva postisquemia

PWA	Análisis de la onda de pulso
RCV	Riesgo cardiovascular
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SOD	Superóxido dismutasa
T	Tirosol
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
TF	Factor tisular
TG	Triglicéridos
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TXA2	Tromboxano A2
TXB2	Tromboxano B2
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular
VOP	Pletismografía de oclusión venosa
WHF	World Heart Federation

10. Bibliografia

Bibliografía

- [1] Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*. 2011 Dec;14(12A):2274–2284.
- [2] Ordovas JM, Kaput J, Corella D. Nutrition in the genomics era: cardiovascular disease risk and the Mediterranean diet. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007 Oct;51(10):1293–1299.
- [3] de Lorgeril M, Salen P. The Mediterranean diet: rationale and evidence for its benefit. *Current Atherosclerosis Reports*. 2008 Dec;10(6):518–522.
- [4] Buckland G, Salas-Salvadó J, Roure E, Bulló M, Serra-Majem L. Sociodemographic risk factors associated with metabolic syndrome in a Mediterranean population. *Public Health Nutrition*. 2008 Dec;11(12):1372–1378.
- [5] Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007 Oct;51(10):1209–1214.
- [6] Yubero-Serrano EM, Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Delgado-Casado N, Perez-Martinez P, Rodriguez-Cantalejo F, et al. Postprandial effects of the Mediterranean diet on oxidant and antioxidant status in elderly men and women. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2011 May;59(5):938–940.
- [7] Costa B, Cabré JJ, Sagarra R, Solà-Morales O, Barrio F, Piñol JL, et al. Rationale and design of the PREDICE project: cost-effectiveness of type

- 2 diabetes prevention among high-risk Spanish individuals following lifestyle intervention in real-life primary care setting. *BMC Public Health*. 2011;11(1):623.
- [8] Couto E, Boffetta P, Lagiou P, Ferrari P, Buckland G, Overvad K, et al. Mediterranean dietary pattern and cancer risk in the EPIC cohort. *British Journal of Cancer*. 2011 Apr;104(9):1493–1499.
- [9] Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*. 2007;43(4):375–381.
- [10] Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, et al. International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*. 2005 Jul;35(7):421–424.
- [11] Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Mediterranean diet and the metabolic syndrome. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007 Oct;51(10):1268–1274.
- [12] Nordmann AJ, Suter-Zimmermann K, Bucher HC, Shai I, Tuttle KR, Estruch R, et al. Meta-analysis comparing mediterranean to low-fat diets for modification of cardiovascular risk factors. *The American Journal of Medicine*. 2011 Sep;124(9):841–851.e2.
- [13] Kuulasmaa K, Tunstall-Pedoe H, Dobson A, Fortmann S, Sans S, Tolonen H, et al. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet*. 2000 Feb;355(9205):675–687.
- [14] Panagiotakos DB, Dimakopoulou K, Katsouyanni K, Bellander T, Grau M, Koenig W, et al. Mediterranean diet and inflammatory response in

- myocardial infarction survivors. *International Journal of Epidemiology*. 2009 Jun;38(3):856–866.
- [15] de Lorgeril M. PREDIMED trial: Mediterranean diet may reduce the risk of type 2 diabetes. *Evidence-Based Medicine*. 2011;5(16):152–153.
- [16] Estruch R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: the experience of the PREDIMED study. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010 Aug;69(3):333–340.
- [17] Henríquez Sánchez P, Ruano C, de Irala J, Ruiz-Canela M, Martínez-González MA, Sánchez-Villegas A. Adherence to the Mediterranean diet and quality of life in the SUN Project. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Aug;p. Epub ahead of print.
- [18] Sánchez-Villegas A, Delgado-Rodríguez M, Alonso A, Schlatter J, Lahortiga F, Serra Majem L, et al. Association of the Mediterranean dietary pattern with the incidence of depression: the Seguimiento Universidad de Navarra/University of Navarra follow-up (SUN) cohort. *Archives of General Psychiatry*. 2009 Oct;66(10):1090–1098.
- [19] de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb;99(6):779–785.
- [20] Bermudez B, Lopez S, Ortega A, Varela LM, Pacheco YM, Abia R, et al. Oleic acid in olive oil: from a metabolic framework toward a clinical perspective. *Current pharmaceutical design*. 2011 Jan;17(8):831–43.
- [21] Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Current Pharmaceutical Design*. 2011;17(8):786–804.
- [22] Raederstorff D. Antioxidant activity of olive polyphenols in humans: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research In-*

- ternationale Zeitschrift Für Vitamin- Und Ernährungsforschung Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition. 2009 May;79(3):152–165.
- [23] Weinbrenner T, Fitó M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, et al. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *The Journal of Nutrition*. 2004 Sep;134(9):2314–2321.
- [24] Covas MI, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fitó M, López-Sabater C, et al. Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology & Medicine*. 2006 Feb;40(4):608–616.
- [25] Gambacorta G, Faccia M, Previtali MA, Pati S, La Notte E, Baiano A. Effects of olive maturation and stoning on quality indices and antioxidant content of extra virgin oils (cv. Coratina) during storage. *Journal of Food Science*. 2010 Apr;75(3):C229–235.
- [26] Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International journal of molecular sciences*. 2010 Jan;11(2):458–79.
- [27] Badimon L, Vilahur G, Padro T. Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010 Aug;28(4):202–215.
- [28] Ramírez-Tortosa C, López-Pedrosa JM, Suarez A, Ros E, Mataix J, Gil A. Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *The British Journal of Nutrition*. 1999 Jul;82(1):31–39.
- [29] Vissers MN, Zock PL, Wiseman SA, Meyboom S, Katan MB. Effect of phenol-rich extra virgin olive oil on markers of oxidation in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2001 May;55(5):334–341.

- [30] Moschandreas J, Vissers MN, Wiseman S, van Putte KP, Kafatos A. Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized cross-over study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2002 Oct;56(10):1024–1029.
- [31] Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, et al. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *European Journal of Nutrition*. 2005 Mar;44(2):121–127.
- [32] Marrugat J, Covas MI, Fitó M, Schröder H, Miró-Casas E, Gimeno E, et al. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation—a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*. 2004 Jun;43(3):140–147.
- [33] Covas MI, Nyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJF, Kiesewetter H, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. 2006 Sep;145(5):333–341.
- [34] Machowetz A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fitó M, Marrugat J, et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007 Jan;21(1):45–52.
- [35] Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *The British Journal of Nutrition*. 2006 Apr;95(4):742–751.
- [36] Klop B, Proctor SD, Mamo JC, Botham KM, Castro Cabezas M. Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle beha-

- viour and metabolic diseases. *International journal of vascular medicine*. 2012 Jan;2012:947417.
- [37] Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, et al. Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005 Nov;46(10):1864–1868.
- [38] Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*. 2007 Jan;190(1):181–186.
- [39] Wallace FA, Neely SJ, Miles EA, Calder PC. Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumour cells. *Immunology and Cell Biology*. 2000 Feb;78(1):40–48.
- [40] Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, et al. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003 Apr;23(4):622–629.
- [41] Dell'Agli. Minor components of olive oil modulate proatherogenic adhesion molecules involved in endothelial activation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(9):3259–3264.
- [42] Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M, et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2008 May;62(5):651–659.
- [43] Mena MP, Sacanella E, Vazquez-Agell M, Morales M, Fitó M, Escoda R, et al. Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular

- antiinflammatory effect of the Mediterranean diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009 Jan;89(1):248–256.
- [44] Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2008 Apr;62(4):570–574.
- [45] Bellido C, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Pérez-Martínez P, Muriana FJ, Martín-Ventura JL, et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Dec;80(6):1487–91.
- [46] Perez-Martinez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, et al. The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis*. 2007 Oct;194(2):e141–146.
- [47] Fuentes F, López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Jiménez Y, Marín C, Gómez P, et al. Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgin olive oil and a low-fat diet enriched with alpha-linolenic acid on postprandial endothelial function in healthy men. *The British Journal of Nutrition*. 2008 Jul;100(1):159–165.
- [48] Papageorgiou N, Tousoulis D, Psaltopoulou T, Giolis A, Antoniadis C, Tsiamis E, et al. Divergent anti-inflammatory effects of different oil acute consumption on healthy individuals. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Apr;65(4):514–519.
- [49] Maschi O, DM Galli et al. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *The British journal of nutrition*. 2008;99(5):945–51.

- [50] González-Correa JA, Navas MD, Muñoz Marín J, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, de la Cruz JP. Effects of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate administration to rats on platelet function compared to acetylsalicylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008 Sep;56(17):7872–7876.
- [51] Lopez-Segura F, Velasco F, Lopez-Miranda J, Castro P, Lopez-Pedraza R, Blanco A, et al. Monounsaturated fatty acid-enriched diet decreases plasma plasminogen activator inhibitor type 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996 Jan;16(1):82–8.
- [52] Oubiña P, Sánchez-Muniz FJ, Ródenas S, Cuesta C. Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and LDL peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *The British Journal of Nutrition*. 2001 Jan;85(1):41–47.
- [53] Léger CL, Carbonneau MA, Michel F, Mas E, Monnier L, Cristol JP, et al. A thromboxane effect of a hydroxytyrosol-rich olive oil wastewater extract in patients with uncomplicated type I diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2005 May;59(5):727–730.
- [54] Lopez-Miranda J, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Jimenez-Gómez Y, Fuentes F, Ruano J, et al. Olive oil and the haemostatic system. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007 Oct;51(10):1249–1259.
- [55] Trifiletti A, Scamardi R, Gaudio A, Lasco A, Frisina N. Hemostatic effects of diets containing olive or soy oil in hypertensive patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*. 2005 Jan;3(1):179–180.
- [56] Delgado-Lista J, Lopez-Miranda J, Cortés Bn, Perez-Martinez P, Lozano A, Gomez-Luna R, et al. Chronic dietary fat intake modifies the post-prandial response of hemostatic markers to a single fatty test meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008 Feb;87(2):317–322.

- [57] Ruano J, López-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, Fernández J, Caballero J, et al. Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007 Aug;86(2):341–346.
- [58] Fuentes F, López-Miranda J, Sánchez E, Sánchez F, Paez J, Paz-Rojas E, et al. Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men. *Annals of Internal Medicine*. 2001 Jun;134(12):1115–1119.
- [59] Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, et al. Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2004 Sep;292(12):1440–1446.
- [60] Karatzi K, Papamichael C, Karatzis E, Papaioannou TG, Voidonikola PT, Vamvakou GD, et al. Postprandial improvement of endothelial function by red wine and olive oil antioxidants: a synergistic effect of components of the Mediterranean diet. *Journal of the American College of Nutrition*. 2008 Aug;27(4):448–453.
- [61] Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, Lairon D, Estruch R, Trichopoulou A. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutrition Reviews*. 2009 May;67 Suppl 1:S111–116.
- [62] Allouche Y, Warleta F, Campos M, Sánchez-Quesada C, Uceda M, Beltrán G, et al. Antioxidant, antiproliferative, and pro-apoptotic capacities of pentacyclic triterpenes found in the skin of olives on MCF-7 human breast cancer cells and their effects on DNA damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011 Jan;59(1):121–130.

- [63] Kuttan G, Pratheeshkumar P, Manu KA, Kuttan R. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharmaceutical Biology*. 2011 Oct;49(10):995–1007.
- [64] Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. 2010;6(459):923–39.
- [65] Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010 Jan;11(2):458–79.
- [66] Ilavarasi K, Kiruthiga PV, Pandian SK, Devi KP. Hydroxytyrosol, the phenolic compound of olive oil protects human PBMC against oxidative stress and DNA damage mediated by 2,3,7,8-TCDD. *Chemosphere*. 2011 Aug;84(7):888–893.
- [67] Reddy LH, Couvreur P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009 Dec;61(15):1412–1426.
- [68] Lucas L, Russell A, Keast R. Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Current Pharmaceutical Design*. 2011;17(8):754–768.
- [69] Escrich E, Solanas M, Moral R, Escrich R. Modulatory effects and molecular mechanisms of olive oil and other dietary lipids in breast cancer. *Current pharmaceutical design*. 2011 Jan;17(8):813–30.
- [70] Wu T, Fu J, Yang Y, Zhang L, Han J. The effects of phytosterols/stanols on blood lipid profiles: a systematic review with meta-analysis. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. 2009;18(2):179–186.
- [71] Monti MC, Margarucci L, Tosco A, Riccio R, Casapullo A. New insights on the interaction mechanism between tau protein and oleocanthal, an extra-

- virgin olive-oil bioactive component. *Food & Function*. 2011 Jul;2(7):423–428.
- [72] Llorente-Cortés V, Estruch R, Mena MP, Ros E, González MAM, Fitó M, et al. Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2010 Feb;208(2):442–450.
- [73] Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuñiga O, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, et al. Postprandial antioxidant gene expression is modified by Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women. *Age (Dordrecht, Netherlands)*. 2011 Nov;.
- [74] Yubero-Serrano EM, Gonzalez-Guardia L, Rangel-Zuñiga O, Delgado-Lista J, Gutierrez-Mariscal FM, Perez-Martinez P, et al. Mediterranean diet supplemented with coenzyme q10 modifies the expression of proinflammatory and endoplasmic reticulum stress-related genes in elderly men and women. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2012 Jan;67(1):3–10.
- [75] Kovacic P, Somanathan R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: Focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2010 Apr;3(2):86–100.
- [76] González-Gallego J, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *The British Journal of Nutrition*. 2010 Oct;104 Suppl 3:S15–27.
- [77] Rimbach G, Moehring J, Huebbe P, Lodge JK. Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2010 Mar;15(3):1746–1761.
- [78] Khymenets O, Fitó M, Covas MI, Farré M, Pujadas MA, Muñoz D, et al. Mononuclear cell transcriptome response after sustained virgin olive oil

- consumption in humans: an exploratory nutrigenomics study. *Omics: A Journal of Integrative Biology*. 2009 Feb;13(1):7–19.
- [79] Oliveras-López MJ, Berná G, Carneiro EM, López-García de la Serrana H, Martín F, López MC. An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in OF1 mice. *The Journal of Nutrition*. 2008 Jun;138(6):1074–1078.
- [80] Eletto D, Leone A, Bifulco M, Tecce MF. Effect of unsaturated fat intake from Mediterranean diet on rat liver mRNA expression profile: selective modulation of genes involved in lipid metabolism. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*. 2005 Feb;15(1):13–23.
- [81] Acín S, Navarro MA, Perona JS, Surra JC, Guillen N, Arnal C, et al. Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice. *The British Journal of Nutrition*. 2007 Apr;97(4):628–638.
- [82] International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome;.
- [83] Meigs JB, Wilson PWF, Fox CS, Vasan RS, Nathan DM, Sullivan LM, et al. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006 Aug;91(8):2906–2912.
- [84] Simha V, Garg A. Lipodystrophy: lessons in lipid and energy metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. 2006 Apr;17(2):162–169.
- [85] Lusis AJ, Attie AD, Reue K. Metabolic syndrome: from epidemiology to systems biology. *Nature Reviews Genetics*. 2008 Nov;9(11):819–830.
- [86] Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and

- Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International . *Circulation*. 2009 Oct;120(16):1640–1645.
- [87] Lairon D, Defoort C. Effects of Nutrients on Postprandial Lipemia. *Current Vascular Pharmacology*. 2011;9(3):309–312.
- [88] Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*. 2008 Feb;117(6):754–761.
- [89] Gillingham LG, Harris-Janz S, Jones PJH. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*. 2011 Mar;46(3):209–228.
- [90] Wilsgaard T, Jacobsen BK. Lifestyle factors and incident metabolic syndrome. The Tromsø Study 1979-2001. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007 Nov;78(2):217–224.
- [91] Graff M, North KE, Monda KL, Lange EM, Lange LA, Guo G, et al. The combined influence of genetic factors and sedentary activity on body mass changes from adolescence to young adulthood: the National Longitudinal Adolescent Health Study. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 2011 Jan;27(1):63–69.
- [92] Pitsavos C, Panagiotakos D, Weinem M, Stefanadis C. Diet, exercise and the metabolic syndrome. The review of diabetic studies : RDS. 2006 Jan;3(3):118–26.
- [93] Weickert MO, Roden M, Isken F, Hoffmann D, Nowotny P, Osterhoff M, et al. Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Aug;94(2):459–471.

- [94] Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim YS, Liu ZG. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nature immunology*. 2010 Aug;11(9):799–805.
- [95] Solà R, Bruckert E, Valls RM, Narejos S, Luque X, Castro-Cabezas M, et al. Soluble fibre (*Plantago ovata* husk) reduces plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, triglycerides, insulin, oxidised LDL and systolic blood pressure in hypercholesterolaemic patients: A randomised trial. *Atherosclerosis*. 2010 Aug;211(2):630–637.
- [96] Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marín C, Pérez-Martínez P, Ruano J, et al. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis*. 2009 Jun;204(2):e70–6.
- [97] Hosseinpour-Niazi S, Mirmiran P, Sohrab G, Hosseini-Esfahani F, Azizi F. Inverse association between fruit, legume, and cereal fiber and the risk of metabolic syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011 Aug;94(2):276–83.
- [98] Hermsdorff HHM, Zulet MA, Abete I, Martínez JA. A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects. *European Journal of Nutrition*. 2011 Feb;50(1):61–69.
- [99] Ebrahimi M, Ghayour-Mobarhan M, Rezaiean S, Hoseini M, Parizade SMR, Farhoudi F, et al. Omega-3 fatty acid supplements improve the cardiovascular risk profile of subjects with metabolic syndrome, including markers of inflammation and auto-immunity. *Acta Cardiologica*. 2009 Jun;64(3):321–327.
- [100] Paniagua JA, Pérez-Martínez P, Gjelstad IMF, Tierney AC, Delgado-Lista J, Defoort C, et al. A low-fat high-carbohydrate diet supplemented with

- long-chain n-3 PUFA reduces the risk of the metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2011 Oct;218(2):443–450.
- [101] Babio N, Bulló M, Basora J, Martínez-González MA, Fernández-Ballart J, Márquez-Sandoval F, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*. 2009 Oct;19(8):563–570.
- [102] Esposito K, Giugliano D. Mediterranean Diet and the Metabolic Syndrome: The End of Beginning. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2010 Feb;.
- [103] Kastorini CM, Milionis HJ, Esposito K, Giugliano D, Goudevenos JA, Panagiotakos DB. The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Mar;57(11):1299–313.
- [104] Tzima N, Pitsavos C, Panagiotakos DB, Skoumas J, Zampelas A, Chrysohoou C, et al. Mediterranean diet and insulin sensitivity, lipid profile and blood pressure levels, in overweight and obese people; the Attica study. *Lipids in Health and Disease*. 2007;6:22.
- [105] Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, Chrysohoou C, Zampelas A, Tousoulis D, et al. The association between adherence to the Mediterranean diet and fasting indices of glucose homeostasis: the ATTICA Study. *Journal of the American College of Nutrition*. 2007 Feb;26(1):32–8.
- [106] Laclaustra M, Corella D, Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*. 2007 Feb;17(2):125–139.
- [107] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010 Mar;316(2):129–39.

- [108] Miranda PJ, DeFronzo RA, Califf RM, Guyton JR. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American Heart Journal*. 2005 Jan;149(1):33–45.
- [109] Tchoukalova YD, Koutsari C, Karpyak MV, Votruba SB, Wendland E, Jensen MD. Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008 Jan;87(1):56–63.
- [110] Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1550–1557.
- [111] Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2006 Jun;368(1-2):1–19.
- [112] Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2010 Apr;17(4):332–341.
- [113] Lago F, Gómez R, Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*. 2009 Oct;34(10):500–510.
- [114] Heber D. An integrative view of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010 Jan;91(1):280S–283S.
- [115] Farb MG, Bigornia S, Mott M, Tanriverdi K, Morin KM, Freedman JE, et al. Reduced adipose tissue inflammation represents an intermediate cardiometabolic phenotype in obesity. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011 Jul;58(3):232–237.
- [116] Le KA, Mahurkar S, Alderete TL, Hasson RE, Adam TC, Kim JS, et al. Subcutaneous adipose tissue macrophage infiltration is associated with hepatic and visceral fat deposition, hyperinsulinemia, and stimulation of NF κ B stress pathway. *Diabetes*. 2011 Nov;60(11):2802–2809.

- [117] Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008 Jun;28(6):1039–1049.
- [118] Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):1010–1013.
- [119] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006 Jul;116(7):1793–1801.
- [120] Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circulation research*. 2010 Sep;107(5):579–91.
- [121] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*. 2007 Sep;7(9):678–689.
- [122] Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. *Annual review of pathology*. 2011 Feb;6:275–97.
- [123] Schnell M. Genetical, clinical and pathophysiological aspects of the Metabolic Syndrome. *Anales Venezolanos de Nutrición*. 2007;20(2):92–98.
- [124] Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*. 2007 Apr;8(4):253–262.
- [125] Bruce KD, Cagampang FR. Epigenetic priming of the metabolic syndrome. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2011 May;21(4):353–361.
- [126] Barker DJP. The developmental origins of well-being. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 2004 Sep;359(1449):1359–1366.

- [127] Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science (New York, NY)*. 2004 Sep;305(5691):1733–1736.
- [128] Xita N, Tsatsoulis A. Fetal origins of the metabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Sep;1205:148–55.
- [129] Buckley AJ, Keserü B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 2005 Apr;54(4):500–7.
- [130] Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005 Jan;288(1):R127–133.
- [131] Harder T, Roepke K, Diller N, Stechling Y, Dudenhausen JW, Plagemann A. Birth weight, early weight gain, and subsequent risk of type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*. 2009 Jun;169(12):1428–1436.
- [132] Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif)*. 2004 Jan;20(1):63–8.
- [133] Campión J, Milagro F, Martínez JA. Epigenetics and obesity. *Progress in molecular biology and translational science*. 2010 Jan;94:291–347.
- [134] Povel CM, Boer JMA, Imholz S, Dollé MET, Feskens EJM. Genetic variants in lipid metabolism are independently associated with multiple features of the metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*. 2011;10:118.

- [135] Frederiksen L, Brødbæk K, Fenger M, Jørgensen T, Borch-Johnsen K, Madsbad S, et al. Comment: studies of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma gene in the Danish MONICA cohort: homozygosity of the Ala allele confers a decreased risk of the insulin resistance syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002 Aug;87(8):3989–3992.
- [136] Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Mc Monagle J, Gulseth HL, Ordovas JM, et al. Glucokinase regulatory protein genetic variant interacts with omega-3 PUFA to influence insulin resistance and inflammation in metabolic syndrome. *PloS One*. 2011;6(6):e20555.
- [137] Deram S, Nicolau CY, Perez-Martinez P, Guazzelli I, Halpern A, Wajchenberg BL, et al. Effects of perilipin (PLIN) gene variation on metabolic syndrome risk and weight loss in obese children and adolescents. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008 Dec;93(12):4933–4940.
- [138] Kajimoto K, Naraba H, Iwai N. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA (New York, NY)*. 2006 Sep;12(9):1626–1632.
- [139] Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, et al. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genomics*. 2010;11:320.
- [140] Kennell JA, Gerin I, MacDougald OA, Cadigan KM. The microRNA miR-8 is a conserved negative regulator of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Oct;105(40):15417–22.
- [141] Strum JC, Johnson JH, Ward J, Xie H, Feild J, Hester A, et al. MicroRNA 132 regulates nutritional stress-induced chemokine production through repression of SirT1. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2009 Nov;23(11):1876–84.

- [142] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research*. 2010 Sep;107(6):810–817.
- [143] Vendramini MF, Kasamatsu TS, Crispim F, Ferreira SR, Matioli SR, Moisés RS. Novel mutation in the adiponectin (ADIPOQ) gene is associated with hypoadiponectinaemia in Japanese-Brazilians. *Clinical Endocrinology*. 2009 Jul;71(1):50–55.
- [144] Lanktree M, Hegele RA. Copy number variation in metabolic phenotypes. *Cytogenetic and Genome Research*. 2008;123(1-4):169–175.
- [145] Jeon JP, Shim SM, Nam HY, Ryu GM, Hong EJ, Kim HL, et al. Copy number variation at leptin receptor gene locus associated with metabolic traits and the risk of type 2 diabetes mellitus. *BMC Genomics*. 2010;11:426.
- [146] Russo P, Lauria F, Siani A. Heritability of body weight: moving beyond genetics. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*. 2010 Dec;20(10):691–697.
- [147] Tung YCL, Yeo GSH. From GWAS to biology: lessons from FTO. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011 Mar;1220:162–171.
- [148] Hiura Y, Tabara Y, Kokubo Y, Okamura T, Miki T, Tomoike H, et al. A genome-wide association study of hypertension-related phenotypes in a Japanese population. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*. 2010 Nov;74(11):2353–2359.
- [149] Zhao J, Bradfield JP, Zhang H, Sleiman PM, Kim CE, Glessner JT, et al. Role of BMI-associated loci identified in GWAS meta-analyses in the context of common childhood obesity in European Americans. *Obesity*. 2011 Dec;19(12):2436–9.

- [150] Kraja AT, Vaidya D, Pankow JS, Goodarzi MO, Assimes TL, Kullo IJ, et al. A bivariate genome-wide approach to metabolic syndrome: STAMPEED consortium. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1329–39.
- [151] Sookoian S, Pirola CJ. Metabolic syndrome: from the genetics to the pathophysiology. *Current Hypertension Reports*. 2011 Apr;13(2):149–157.
- [152] Bruce KD, Hanson MA. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*. 2010 Mar;140(3):648–52.
- [153] Baccarelli A, Rienstra M, Benjamin EJ. Cardiovascular epigenetics: basic concepts and results from animal and human studies. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2010 Dec;3(6):567–73.
- [154] Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation*. 2003 Sep;108(13):1546–1551.
- [155] Mottillo S, Filion KB, Genest J, Joseph L, Pilote L, Poirier P, et al. The metabolic syndrome and cardiovascular risk a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010 Sep;56(14):1113–32.
- [156] Arrebola-Moreno AL, Laclaustra M, Kaski JC. Noninvasive Assessment of Endothelial Function in Clinical Practice. *Revista Española de Cardiología*. 2012 Jan;65(1):80–90.
- [157] Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007 Mar;115(10):1285–1295.
- [158] Dupuis J. Noninvasive evaluation of endothelial vascular reactivity: should the quest continue? *The Canadian Journal of Cardiology*. 2005 Oct;21(12):1047–1051.

- [159] Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 1992 Nov;340(8828):1111–1115.
- [160] Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *The New England Journal of Medicine*. 1986 Oct;315(17):1046–1051.
- [161] Camici PG, Crea F. Coronary microvascular dysfunction. *The New England Journal of Medicine*. 2007 Feb;356(8):830–840.
- [162] Picano E, Pálinkás A, Amyot R. Diagnosis of myocardial ischemia in hypertensive patients. *Journal of Hypertension*. 2001 Jul;19(7):1177–1183.
- [163] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002 Jan;39(2):257–265.
- [164] Joannides R, Haefeli WE, Linder L, Richard V, Bakkali EH, Thuiliez C, et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*. 1995 Mar;91(5):1314–1319.
- [165] Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, Charbonneau F, Delagrangé D, Creager MA, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*. 1995 Feb;75(6):71B–74B.
- [166] Widlansky ME, Gokce N, Keaney JFJ, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Oct;42(7):1149–1160.

- [167] Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension*. 2005 Jan;23(1):7–17.
- [168] Joyner MJ, Dietz NM, Shepherd JT. From Belfast to Mayo and beyond: the use and future of plethysmography to study blood flow in human limbs. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md: 1985). 2001 Dec;91(6):2431–2441.
- [169] Linder L, Kiowski W, Bühler FR, Lüscher TF. Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension. *Circulation*. 1990 Jun;81(6):1762–1767.
- [170] Nohria A, Gerhard-Herman M, Creager MA, Hurley S, Mitra D, Ganz P. Role of nitric oxide in the regulation of digital pulse volume amplitude in humans. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md: 1985). 2006 Aug;101(2):545–548.
- [171] Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DRJ, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004 Dec;44(11):2137–2141.
- [172] Hamburg NM, Benjamin EJ. Assessment of endothelial function using digital pulse amplitude tonometry. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2009 Jan;19(1):6–11.
- [173] Wilkinson IB, McEniery CM. Arterial stiffness, endothelial function and novel pharmacological approaches. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*. 2004 Nov;31(11):795–799.

- [174] Nichols WW, Denardo SJ, Wilkinson IB, McEniery CM, Cockcroft J, O'Rourke MF. Effects of arterial stiffness, pulse wave velocity, and wave reflections on the central aortic pressure waveform. *Journal of Clinical Hypertension* (Greenwich, Conn). 2008 Apr;10(4):295–303.
- [175] Wilkinson IB, MacCallum H, Cockcroft JR, Webb DJ. Inhibition of basal nitric oxide synthesis increases aortic augmentation index and pulse wave velocity in vivo. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002 Feb;53(2):189–192.
- [176] Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Stefanadis C. Prediction of cardiovascular events and all-cause mortality with arterial stiffness: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010 Mar;55(13):1318–1327.
- [177] Christen S, Delachaux A, Dischl B, Golay S, Liaudet L, Feihl F, et al. Dose-dependent vasodilatory effects of acetylcholine and local warming on skin microcirculation. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2004 Dec;44(6):659–664.
- [178] Charkoudian N. Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clinic Proceedings Mayo Clinic*. 2003 May;78(5):603–612.
- [179] Minson CT, Berry LT, Joyner MJ. Nitric oxide and neurally mediated regulation of skin blood flow during local heating. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md: 1985). 2001 Oct;91(4):1619–1626.
- [180] Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004 Mar;56(5):619–658.
- [181] Tesselaar E, Sjöberg F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvascular Research*. 2011 Jan;81(1):88–96.

- [182] Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006 Sep;27(9):503–508.
- [183] Rossi GP, Taddei S, Virdis A, Cavallin M, Ghiadoni L, Favilla S, et al. The T-786C and Glu298Asp polymorphisms of the endothelial nitric oxide gene affect the forearm blood flow responses of Caucasian hypertensive patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Mar;41(6):938–945.
- [184] Yvonne-Tee GB, Rasool AHG, Halim AS, Rahman ARA. Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2005;52(2):286–292.
- [185] Schmiedel O, Schroeter ML, Harvey JN. Microalbuminuria in Type 2 diabetes indicates impaired microvascular vasomotion and perfusion. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2007 Dec;293(6):H3424–3431.
- [186] Rossi M, Carpi A, Galetta F, Franzoni F, Santoro G. Skin vasomotion investigation: a useful tool for clinical evaluation of microvascular endothelial function? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008 Oct;62(8):541–545.
- [187] de Jongh RT, Serné EH, IJzerman RG, Jø rstad HT, Stehouwer CDA. Impaired local microvascular vasodilatory effects of insulin and reduced skin microvascular vasomotion in obese women. *Microvascular Research*. 2008 Mar;75(2):256–262.
- [188] Vuilleumier P, Decosterd D, Maillard M, Burnier M, Hayoz D. Postischemic forearm skin reactive hyperemia is related to cardiovascular risk factors in a healthy female population. *Journal of Hypertension*. 2002 Sep;20(9):1753–1757.

- [189] Debbabi H, Bonnin P, Ducluzeau PH, Lefthérotis G, Levy BI. Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation. *American Journal of Hypertension*. 2010 May;23(5):541–6.
- [190] Kubli S, Waeber B, Dalle-Ave A, Feihl F. Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2000 Nov;36(5):640–648.
- [191] Binggeli C, Spieker LE, Corti R, Sudano I, Stojanovic V, Hayoz D, et al. Statins enhance postischemic hyperemia in the skin circulation of hypercholesterolemic patients: a monitoring test of endothelial dysfunction for clinical practice? *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 Jul;42(1):71–77.
- [192] Yvonne-Tee GB, Rasool AHG, Halim AS, Rahman ARA. Reproducibility of different laser Doppler fluximetry parameters of postocclusive reactive hyperemia in human forearm skin. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*;52(2):286–292.
- [193] Boignard A, Salvat-Melis M, Carpentier PH, Minson CT, Grange L, Duc C, et al. Local hyperemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Research & Therapy*. 2005;7(5):R1103–1112.
- [194] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2006 Jun;368(1-2):33–47.
- [195] Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacological Reports: PR*. 2009 Feb;61(1):22–32.
- [196] Perez-Martinez P, Moreno-Conde M, Cruz-Teno C, Ruano J, Fuentes F, Delgado-Lista J, et al. Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *Atherosclerosis*. 2010 Apr;209(2):533–538.

- [197] Ramírez-Vélez R. Postprandial lipemia induces endothelial dysfunction and higher insulin resistance in healthy subjects. *Endocrinología Y Nutrición: Organo De La Sociedad Espanola De Endocrinología Y Nutricion*. 2011 Nov;.
- [198] Wallace JP, Johnson B, Padilla J, Mather K. Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review. *International Journal of Clinical Practice*. 2010 Feb;64(3):389–403.
- [199] Furchgott RF. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1996 Oct;276(14):1186–1188.
- [200] Patvardhan EA, Heffernan KS, Ruan JM, Soffler MI, Karas RH, Kuvin JT. Assessment of vascular endothelial function with peripheral arterial tonometry: information at your fingertips? *Cardiology in Review*. 2010 Feb;18(1):20–28.
- [201] Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 2008;13:5323–5344.
- [202] Simonsen U, Rodriguez-Rodriguez R, Dalsgaard T, Buus NH, Stankevicius E. Novel approaches to improving endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilatation. *Pharmacological Reports: PR*. 2009 Feb;61(1):105–115.
- [203] Singleton JR, Smith AG, Russell JW, Feldman EL. Microvascular complications of impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 2003 Dec;52(12):2867–2873.
- [204] Vita JA. Endothelial function. *Circulation*. 2011 Dec;124(25):e906–912.

- [205] Lopez-Garcia E, Schulze MB, Fung TT, Meigs JB, Rifai N, Manson JE, et al. Major dietary patterns are related to plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004 Oct;80(4):1029–1035.
- [206] McCall DO, McGartland CP, McKinley MC, Patterson CC, Sharpe P, McCance DR, et al. Dietary intake of fruits and vegetables improves microvascular function in hypertensive subjects in a dose-dependent manner. *Circulation*. 2009 Apr;119(16):2153–2160.
- [207] Gosmanov AR, Smiley DD, Robalino G, Siquiera J, Khan B, Le NA, et al. Effects of oral and intravenous fat load on blood pressure, endothelial function, sympathetic activity, and oxidative stress in obese healthy subjects. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 2010 Dec;299(6):E953–958.
- [208] Delles C, Dymott JA, Neisius U, Rocchiccioli JP, Bryce GJ, Moreno MU, et al. Reduced LDL-cholesterol levels in patients with coronary artery disease are paralleled by improved endothelial function: An observational study in patients from 2003 and 2007. *Atherosclerosis*. 2010 Jul;211(1):271–277.
- [209] Kris-Etherton PM, Hu FB, Ros E, Sabaté J. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *The Journal of Nutrition*. 2008 Sep;138(9):1746S–1751S.
- [210] Newens KJ, Thompson AK, Jackson KG, Wright J, Williams CM. DHA-rich fish oil reverses the detrimental effects of saturated fatty acids on postprandial vascular reactivity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011 Sep;94(3):742–748.
- [211] Siasos G, Tousoulis D, Oikonomou E, Zaromitidou M, Verveniotis A, Platsiras A, et al. Effects of omega-3 fatty acids on endothelial function, ar-

- terial wall properties, inflammatory and fibrinolytic status in smokers: A cross over study. *International Journal of Cardiology*. 2011 Nov;.
- [212] Hoch AZ, Papanek P, Szabo A, Widlansky ME, Gutterman DD. Folic Acid supplementation improves vascular function in professional dancers with endothelial dysfunction. *PM & R: The Journal of Injury, Function, and Rehabilitation*. 2011 Nov;3(11):1005–1012.
- [213] McRae MP. High-dose folic acid supplementation effects on endothelial function and blood pressure in hypertensive patients: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2009 Mar;8(1):15–24.
- [214] Anderson RA, Evans LM, Ellis GR, Khan N, Morris K, Jackson SK, et al. Prolonged deterioration of endothelial dysfunction in response to postprandial lipaemia is attenuated by vitamin C in Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*. 2006 Mar;23(3):258–264.
- [215] Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology & Medicine*. 2011 Sep;51(5):1000–1013.
- [216] Das UN, Repositi G, Dain A, Eynard AR. L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 2011;16:13–20.
- [217] Lucotti P, Monti L, Setola E, La Canna G, Castiglioni A, Rossodivita A, et al. Oral L-arginine supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2009 Sep;58(9):1270–1276.

- [218] Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001 Apr;73(4):673–686.
- [219] Davis N, Katz S, Wylie-Rosett J. The effect of diet on endothelial function. *Cardiology in Review*. 2007 Apr;15(2):62–66.
- [220] Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *The American Journal of Cardiology*. 1997 Feb;79(3):350–354.
- [221] Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2006 Jul;17(7):429–445.
- [222] Pitsavos C, Panagiotakos DB, Chryschoou C, Skoumas J, Papaioannou I, Stefanadis C, et al. The effect of Mediterranean diet on the risk of the development of acute coronary syndromes in hypercholesterolemic people: a case-control study (CARDIO2000). *Coronary Artery Disease*. 2002 Aug;13(5):295–300.
- [223] Kurzchalia TV, Parton RG. Membrane microdomains and caveolae. *Current Opinion in Cell Biology*. 1999 Aug;11(4):424–431.
- [224] Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nature medicine*. 2000 Dec;6(12):1362–7.
- [225] Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiological reviews*. 2004 Oct;84(4):1341–79.
- [226] Frank PG, Lee H, Park DS, Tandon NN, Scherer PE, Lisanti MP. Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004 Jan;24(1):98–105.

- [227] Xu Y, Buikema H, van Gilst WH, Henning RH. Caveolae and endothelial dysfunction: filling the caves in cardiovascular disease. *European Journal of Pharmacology*. 2008 May;585(2-3):256–260.
- [228] Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995 Sep;377(6546):239–242.
- [229] Lake-Bruse KD, Faraci FM, Shesely EG, Maeda N, Sigmund CD, Heistad DD. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1999 Aug;277(2):H770–776.
- [230] Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circulation Research*. 1996 Nov;79(5):984–991.
- [231] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology*. 2006 Jan;147 Suppl:S193–201.
- [232] Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999 Jun;399(6736):597–601.
- [233] Michell BJ, Chen Zp, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001 May;276(21):17625–17628.
- [234] Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000 Mar;97(6):2832–5.

- [235] Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu(298)→Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jul;276(28):26674–26679.
- [236] Imamura A, Takahashi R, Murakami R, Kataoka H, Cheng XW, Numaguchi Y, et al. The effects of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on endothelial function and metabolic risk factors in healthy subjects: the significance of plasma adiponectin levels. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2008 Feb;158(2):189–195.
- [237] Tso AWK, Tan KCB, Wat NMS, Janus ED, Lam TH, S L Lam K. Endothelial nitric oxide synthase G894T (Glu298Asp) polymorphism was predictive of glycemic status in a 5-year prospective study of Chinese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2006 Sep;55(9):1155–1158.
- [238] Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C, Setola E, et al. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes*. 2003 May;52(5):1270–1275.
- [239] Yan-Yan L. Endothelial Nitric Oxide Synthase G894T Gene Polymorphism and Essential Hypertension in the Chinese Population: a Meta-Analysis Involving 11,248 Subjects. *Internal Medicine (Tokyo, Japan)*. 2011;50(19):2099–2106.
- [240] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (New York, NY)*. 1995 Oct;270(5235):467–470.

- [241] DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nature Genetics*. 1996 Dec;14(4):457–460.
- [242] van 't Veer L. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530–536.
- [243] van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2002 Dec;347(25):1999–2009.
- [244] Jänne PA, Li C, Zhao X, Girard L, Chen TH, Minna J, et al. High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene*. 2004 Apr;23(15):2716–2726.
- [245] del Carmen Garcia Molina Wolgien M, da Silva IDC, Villanova FE, Yumi Otsuka A, Borra RC, Lima Reis LF, et al. Differential gene expression assessed by cDNA microarray analysis in breast cancer tissue under tamoxifen treatment. *European Journal of Gynaecological Oncology*. 2005;26(5):501–504.
- [246] Stears RL, Martinsky T, Schena M. Trends in microarray analysis. *Nature Medicine*. 2003 Jan;9(1):140–145.
- [247] Watson A, Mazumder A, Stewart M, Balasubramanian S. Technology for microarray analysis of gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*. 1998 Dec;9(6):609–614.
- [248] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nature Genetics*. 2002 Dec;32 Suppl:496–501.

- [249] Oshlack A, Emslie D, Corcoran LM, Smyth GK. Normalization of boutique two-color microarrays with a high proportion of differentially expressed probes. *Genome Biology*. 2007;8(1):R2.
- [250] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Oct;102(43):15545–15550.
- [251] Dinu I, Potter JD, Mueller T, Liu Q, Adewale AJ, Jhangri GS, et al. Gene-set analysis and reduction. *Briefings in Bioinformatics*. 2009 Jan;10(1):24–34.
- [252] Kim CS. Bayesian Orthogonal Least Squares (BOLS) algorithm for reverse engineering of gene regulatory networks. *BMC Bioinformatics*. 2007;8:251.
- [253] Deng X, Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Park EA, Raghov R, et al. Dietary olive oil and menhaden oil mitigate induction of lipogenesis in hyperinsulinemic corpulent JCR:LA-cp rats: microarray analysis of lipid-related gene expression. *Endocrinology*. 2004 Dec;145(12):5847–5861.
- [254] Lockridge JB, Sailors ML, Durgan DJ, Egbejimi O, Jeong WJ, Bray MS, et al. Bioinformatic profiling of the transcriptional response of adult rat cardiomyocytes to distinct fatty acids. *Journal of Lipid Research*. 2008 Jul;49(7):1395–1408.
- [255] Bermúdez B, López S, Pacheco YM, Villar J, Muriana FJG, Hoheisel JD, et al. Influence of postprandial triglyceride-rich lipoproteins on lipid-mediated gene expression in smooth muscle cells of the human coronary artery. *Cardiovascular Research*. 2008 Jul;79(2):294–303.
- [256] Bouwens M, Grootte Bromhaar M, Jansen J, Muller M, Afman LA. Postprandial dietary lipid-specific effects on human peripheral blood mononu-

- clear cell gene expression profiles. *Am J Clin Nutr.* 2010 Jan;91(1):208–217.
- [257] Crujeiras AB, Parra D, Milagro FI, Goyenechea E, Larrarte E, Margareto J, et al. Differential expression of oxidative stress and inflammation related genes in peripheral blood mononuclear cells in response to a low-calorie diet: a nutrigenomics study. *Omics: A Journal of Integrative Biology.* 2008 Dec;12(4):251–261.
- [258] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan;136(2):215–33.
- [259] Lee CT, Risom T, Strauss WM. Evolutionary conservation of microRNA regulatory circuits: an examination of microRNA gene complexity and conserved microRNA-target interactions through metazoan phylogeny. *DNA and Cell Biology.* 2007 Apr;26(4):209–18.
- [260] Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *Journal of Molecular Biology.* 2004 May;339(2):327–35.
- [261] Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development.* 2003 Apr;17(8):991–1008.
- [262] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, NY).* 2001 Oct;294(5543):853–858.
- [263] Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY).* 2001 Oct;294(5543):858–862.
- [264] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY).* 2001 Oct;294(5543):862–864.

- [265] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*. 2009 Jan;19(1):92–105.
- [266] Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*. 2007 Jan;2007(367):re1.
- [267] Reese JC. Basal transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2003 Apr;13(2):114–118.
- [268] Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009 Jan;19(1):92–105.
- [269] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Sep;11(9):597–610.
- [270] Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*. 2008 Jan;36(Database issue):D154–158.
- [271] Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG. The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Research*. 2009 Jan;37(Database issue):D155–158.
- [272] Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan;120(1):15–20.
- [273] Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*. 2005 May;37(5):495–500.

- [274] Witkos TM, Koscianska E, Krzyzosiak WJ. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Current Molecular Medicine*. 2011 Mar;11(2):93–109.
- [275] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biology*. 2004 Nov;2(11):e363.
- [276] Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Research*. 2008 Jan;36(Database issue):D149–153.
- [277] Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW, Lenhard B. JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*. 2004 Jan;32(Database issue):D91–94.
- [278] Marinescu VD, Kohane IS, Riva A. The MAPPER database: a multi-genome catalog of putative transcription factor binding sites. *Nucleic acids research*. 2005 Jan;33(Database issue):D91–7.
- [279] Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clinical chemistry*. 1974 Apr;20(4):470–5.
- [280] Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical chemistry*. 1973 May;19(5):476–82.
- [281] Briggs CJ, Anderson D, Johnson P, Deegan T. Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol. *Annals of clinical biochemistry*. 1981 May;18(Pt 3):177–81.
- [282] Riepponen P, Marniemi J, Rautaoja T. Immunoturbidimetric determination of apolipoproteins A-1 and B in serum. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1987 Nov;47(7):739–44.

- [283] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*. 1972 Jun;18(6):499–502.
- [284] Benjamini H. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. 1995;57(1):289–300.
- [285] Glez-Peña D, Reboiro-Jato M, Domínguez R, Gómez-López G, Pisano DG, Fdez-Riverola F. PathJam: a new service for integrating biological pathway information. *Journal of Integrative Bioinformatics*. 2010;7(1).
- [286] Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular cell*. 2007 Jul;27(1):91–105.
- [287] López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Marín C, Moreno JA, Gómez P, Pérez-Jiménez F. Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Current opinion in lipidology*. 2006 Apr;17(2):132–8.
- [288] Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007 Oct;51(10):1199–1208.
- [289] Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutrition Reviews*. 2010 Apr;68(4):191–206.
- [290] Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de Lacerda CA, Aguila MB, Brunini TCM, Mendes-Ribeiro AC. High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010 Jul;499(1-2):56–61.

- [291] Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Fuentes F, Jiménez-Gomez Y, Gomez-Luna MJ, et al. Gene variations of nitric oxide synthase regulate the effects of a saturated fat rich meal on endothelial function. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*. 2011 Apr;30(2):234–238.
- [292] Ogimoto A, Shigematsu Y, Nakura J, Hara Y, Ohtsuka T, Kohara K, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in patients with coexistent hypertrophic cardiomyopathy and coronary spastic angina. *Journal of Molecular Medicine*. 2005 Aug;83(8):619–25.
- [293] Stabler T, Kenjale A, Ham K, Jelesoff N, Allen J. Potential mechanisms for reduced delivery of nitric oxide to peripheral tissues in diabetes mellitus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010 Aug;1203:101–6.
- [294] Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007 Sep;21(11):2655–63.
- [295] Schmierer RE. Endothelial dysfunction: how can one intervene at the beginning of the cardiovascular continuum? *Journal of Hypertension Supplement: Official Journal of the International Society of Hypertension*. 2006 Apr;24(2):S31–35.
- [296] Gokce N, Keaney JFJ, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO, et al. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003 May;41(10):1769–1775.
- [297] FitzGerald GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003 Nov;2(11):879–890.

- [298] de la Puerta R, Marquez-Martin A, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V. Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif). 2009 May;25(5):548–554.
- [299] Zhang X, Cao J, Zhong L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2009 Jun;379(6):581–586.
- [300] Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, Sacchi R, et al. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2005 Jun;371(6):457–465.
- [301] Sommer G, Kralisch S, Stangl V, Vietzke A, Köhler U, Stepan H, et al. Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2009 Mar;106(4):729–737.
- [302] Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *Journal of Lipid Research*. 2008 Sep;49(9):1894–1903.
- [303] Stephens JW, Hurel SJ, Lowe GDO, Rumley A, Humphries SE. Association between plasma IL-6, the IL6 -174G>C gene variant and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2007 Apr;90(4):422–428.
- [304] Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, Heymann D, Maugars Y. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme*. 2010 May;77(3):201–205.
- [305] Rega G, Kaun C, Weiss TW, Demyanets S, Zorn G, Kastl SP, et al. Inflammatory cytokines interleukin-6 and oncostatin m induce plasmid-

- nogen activator inhibitor-1 in human adipose tissue. *Circulation*. 2005 Apr;111(15):1938–1945.
- [306] Albasanz-Puig A, Murray J, Preusch M, Coan D, Namekata M, Patel Y, et al. Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: a role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2011 Jun;216(2):292–298.
- [307] Nishibe T, Parry G, Ishida A, Aziz S, Murray J, Patel Y, et al. Oncostatin M promotes biphasic tissue factor expression in smooth muscle cells: evidence for Erk-1/2 activation. *Blood*. 2001 Feb;97(3):692–699.
- [308] Lang R, Hammer M, Mages J. DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 2006 Dec;177(11):7497–7504.
- [309] Wheeler DS, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong HR. Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *The Journal of Nutrition*. 2004 May;134(5):1039–1044.
- [310] Pierce GL, Lesniewski LA, Lawson BR, Beske SD, Seals DR. Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans. *Circulation*. 2009 Mar;119(9):1284–1292.
- [311] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation Research*. 2005 May;96(9):939–949.
- [312] Tai DJC, Su CC, Ma YL, Lee EHY. SGK1 phosphorylation of IkappaB Kinase alpha and p300 Up-regulates NF-kappaB activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009 Feb;284(7):4073–4089.

- [313] Lang F, Artunc F, Vallon V. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2009 Sep;18(5):439–448.
- [314] Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation*. 2004 Sep;110(12):1564–1571.
- [315] Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 2005 Oct;135(10):2291–2294.
- [316] Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, et al. Trib1 and Evl1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood*. 2007 May;109(9):3998–4005.
- [317] Deng J, James CH, Patel L, Smith A, Burnand KG, Rahmoune H, et al. Human tribbles homologue 2 is expressed in unstable regions of carotid plaques and regulates macrophage IL-10 in vitro. *Clinical Science (London, England: 1979)*. 2009 Feb;116(3):241–248.
- [318] Kundu JK, Na HK, Chun KS, Kim YK, Lee SJ, Lee SS, et al. Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells. *The Journal of Nutrition*. 2003 Nov;133(11 Suppl 1):3805S–3810S.
- [319] Garcia-Rios A, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Phillips CM, Ferguson JF, Gjelstad IMF, et al. Genetic variations at the lipoprotein lipase gene influence plasma lipid concentrations and interact with plasma n-6 polyunsaturated fatty acids to modulate lipid metabolism. *Atherosclerosis*. 2011 Oct;218(2):416–422.
- [320] Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, et al. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Research & Therapy*. 2008;10(1):201.

- [321] Chen QR, Song YK, Wei JS, Bilke S, Asgharzadeh S, Seeger RC, et al. An integrated cross-platform prognosis study on neuroblastoma patients. *Genomics*. 2008 Oct;92(4):195–203.
- [322] de Mello VDF, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, et al. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism: Clinical and Experimental*. 2008 Feb;57(2):192–199.
- [323] Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC. Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007 Sep;92(9):3705–3711.
- [324] Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JCR, Huang HF, Shin SJ, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006 Jan;91(1):295–299.
- [325] Aggarwal BB, Shishodia S. Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004 Dec;1030:434–41.
- [326] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009 Dec;1(6):a001651.
- [327] Brunelleschi S, Bardelli C, Amoruso A, Gunella G, Ieri F, Romani A, et al. Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE) inhibits NF-kappa B translocation in human monocyte/macrophages. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2007 Dec;56(6):542–9.
- [328] Moras D. Structure of full-length PPARgamma-RXRalpha: a snapshot of a functional complex? *Cell metabolism*. 2009 Jan;9(1):8–10.

- [329] Krskova-Tybitanclova K, Macejova D, Brtko J, Baculikova M, Krizanova O, Zorad S. Short term 13-cis-retinoic acid treatment at therapeutic doses elevates expression of leptin, GLUT4, PPARgamma and aP2 in rat adipose tissue. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2008 Dec;59(4):731–43.
- [330] Lefebvre B, Benomar Y, Guédin A, Langlois A, Hennuyer N, Dumont J, et al. Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPARgamma in obese mice and humans. *The Journal of clinical investigation*. 2010 May;120(5):1454–68.
- [331] Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family (Review). *International journal of oncology*. 2004 Nov;25(5):1495–500.
- [332] Kaneda H, Arao T, Tanaka K, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, et al. FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. *Cancer research*. 2010 Mar;70(5):2053–63.
- [333] Wan HY, Guo LM, Liu T, Liu M, Li X, Tang H. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. *Molecular Cancer*. 2010 Jan;9:16.
- [334] Arora H, Qureshi R, Jin S, Park AK, Park WY. miR-9 and let-7g enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NFκB1. *Experimental & Molecular Medicine*. 2011 May;43(5):298–304.
- [335] Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Research*. 2010 Feb;38(10):3222–32.
- [336] Lu H, Buchan RJ, Cook SA. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovascular research*. 2010 Jun;86(3):410–20.

- [337] Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006 Sep;281(37):26932–42.
- [338] He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular Endocrinology*. 2007 Nov;21(11):2785–94.
- [339] Parra P, Serra F, Palou A. Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice. *PloS one*. 2010 Jan;5(9):e13005.
- [340] Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *The FEBS journal*. 2009 Apr;276(8):2348–58.
- [341] Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research*. 2007 Jun;100(11):1579–88.
- [342] Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, et al. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PloS one*. 2010 Jan;5(2):e9022.
- [343] Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, et al. Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009 May;39(5):359–67.
- [344] Yang Z, Ming XF. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clinical Medicine and Research*. 2006 Mar;4(1):53–65.

- [345] van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Sep;105(35):13027–32.
- [346] Rantalainen M, Herrera BM, Nicholson G, Bowden R, Wills QF, Min JL, et al. MicroRNA Expression in Abdominal and Gluteal Adipose Tissue Is Associated with mRNA Expression Levels and Partly Genetically Driven. *PloS One*. 2011;6(11):e27338.
- [347] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, Patil CK, Campisi J, Benz CC. Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene*. 2008 Sep;27(42):5643–7.
- [348] Zhou R, Hu G, Gong AY, Chen XM. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic acids research*. 2010 Feb;38(10):3222–32.
- [349] Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010 Aug;30(8):1562–8.
- [350] Gomard T, Michaud HA, Tempé D, Thiolon K, Pelegriin M, Piechaczyk M. An NF-kappaB-dependent role for JunB in the induction of proinflammatory cytokines in LPS-activated bone marrow-derived dendritic cells. *PloS one*. 2010 Jan;5(3):e9585.
- [351] Milenkovic D, Deval C, Gouranton E, Landrier JF, Scalbert A, Morand C, et al. Modulation of miRNA Expression by Dietary Polyphenols in apoE

- Deficient Mice: A New Mechanism of the Action of Polyphenols. *PloS one*. 2012 Jan;7(1):e29837.
- [352] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan;116(2):281–297.
- [353] Kielbasa SM, Klein H, Roider HG, Vingron M, Blüthgen N. TransFind—predicting transcriptional regulators for gene sets. *Nucleic Acids Research*. 2010 Jul;38:W275–80.

11. Anexos

NOS3 Glu298Asp Polymorphism Interacts with Virgin Olive Oil Phenols to Determine the Postprandial Endothelial Function in Patients with the Metabolic Syndrome

Ana I. Jiménez-Morales,* Juan Ruano,* Javier Delgado-Lista, Juan M. Fernandez, Antonio Camargo, Fernando López-Segura, Javier Caballero Villarraso, Francisco Fuentes-Jiménez, Jose López-Miranda, and Francisco Pérez-Jiménez

Lipids and Atherosclerosis Unit (A.I.J.-M., J.R., J.D.-L., J.M.F., A.C., F.L.-S., F.F.-J., J.L.-M., F.P.-J.), Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba, and Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, and Biochemical Laboratory (J.C.V.), Reina Sofia University Hospital, 14004 Cordoba, Spain

Background: Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene (*NOS3*) has been characterized as a risk factor of hypertension and coronary artery disease. Previous studies suggest that the higher risk observed in T allele carriers is due to endothelial dysfunction associated with a lower eNOS activity and that acute consumption of phenol-rich olive oil ameliorates postprandial endothelial dysfunction by reducing oxidative stress and increasing nitric oxide bioavailability. Nevertheless, how these facts may interact in a population with altered endothelial function such as metabolic syndrome patients remains unknown.

Objective: The objective of the study was to evaluate whether the presence of *NOS3* Glu298Asp polymorphism interacts with the phenol content of virgin olive oil (VOO) to influence postprandial endothelial function.

Design: Fifty-seven subjects with metabolic syndrome received three breakfasts based on VOO with different phenolic content. Baseline, incremental area under the curve, peak, and maximum parameters of postocclusive skin reactive hyperemia (PORH) were evaluated by laser Doppler, and the nitrate/nitrite [$\text{NO}_{(x)}$] and eNOS concentrations were obtained during fasting and postprandially.

Results: A gene-diet interaction was found on maximum PORH and $\text{NO}_{(x)}$ ($P = 0.039$ and $P = 0.043$, respectively). TT subjects showed lower values of eNOS, $\text{NO}_{(x)}$, and maximum PORH as compared with GG and GT subjects, especially in the postprandial measurements (all $P < 0.05$). However, most of these differences were attenuated when high-phenol VOO was consumed.

Conclusion: In a population with a compromised endothelial function, concentrations of phenols in dietary VOO interact with *NOS3* Glu298Asp to ameliorate the endothelial dysfunction associated to the TT genotype. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: E1694–E1702, 2011)

Endothelial dysfunction is an early event in the development of atherosclerosis and a subclinical condition found in most patients with hypercholesterolemia, hyper-

tension, type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome (MetS; as a cluster of conditions that predispose patients to cardiovascular disease and diabetes), and coronary ar-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2011-1056 Received March 22, 2011. Accepted July 8, 2011.

First Published Online August 3, 2011

* A.I.J.-M. and J.R. contributed equally to this work.

Abbreviations: AUC, Area under the curve; CAD, coronary artery disease; eNOS, endothelial NO synthase; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; MetS, metabolic syndrome; n-3 FA, n-3 fatty acid; NO, nitric oxide; $\text{NO}_{(x)}$, nitrate/nitrite; PORH, postocclusive skin reactive hyperemia; PORHmax, PORHpeak referred to baseline value; PORHpeak, maximum value achieved after 4 min of flow occlusion; t_0 , capillary flow measured for 1 min; Tchol, total cholesterol; t_c , flow recorded for 1 min after cuff was deflated; TG, triglyceride.

tery disease (CAD) (1, 2). The main biological feature of endothelial dysfunction is an impaired nitric oxide (NO) bioavailability as a consequence of either a reduced production by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) or, more frequently, of its increased breakdown by inflammatory molecules and reactive oxygen species (3). eNOS, encoded by the *NOS3* gene, is a dually acylated peripheral membrane protein that, targeted to the Golgi region and caveolae of endothelial cells, catalyzes the generation of NO (4).

Some studies have focused on the role of genetic variants in the *NOS3* gene on cardiovascular risk factors (5, 6) and the development of coronary artery disease (7, 8). One of the most studied polymorphisms to date is *NOS3* Glu298Asp (rs1799983), which has been reported as an independent risk factor for CAD (8–10), myocardial infarction (11), hypertension (12), MetS (6, 13, 14), and type 2 diabetes mellitus (15). Furthermore, this gene variant is related to a significant increase in reintervention and recurrent symptoms after coronary artery bypass grafting (11), to accelerated carotid atherosclerosis (16), and increased blood pressure responses to α 1-adrenoceptor activation (17).

Although it is well known that endothelial function can be modulated by nutrients, studies of the effect of interaction between *NOS3* Glu298Asp polymorphism and diet on endothelial function are scarce, mainly exploring the effect of fatty acids and foods with antioxidant capacity (18). In a descriptive study, Leeson *et al.* (19) analyzed the effect of the presence of *NOS3* Glu298Asp polymorphism on plasma n-3 fatty acid (n-3 FA) concentrations and flow-mediated brachial artery dilatation. Vascular function was positively related to plasma n-3 FA concentration in T allele carriers but not in G homozygotes (19). Interestingly, Ferguson *et al.* (20) showed from the LIPGENE dietary intervention study how in T allele carriers with MetS plasma triacylglycerol concentrations were considerably more responsive to changes after an n-3 FA-supplemented diet than G allele homozygotes. [Lipgene (“Diet, genomics, and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social, and economic analysis”) was a European Union Sixth Framework Integrated Program conducted by 25 research centers across Europe] (20). Recently Delgado-Lista *et al.* (21) observed that healthy T allele carriers of the *NOS3* Glu298Asp polymorphism have an impaired postprandial reactive hyperemia response after a saturated fatty meal.

Phenolic compounds are soluble minor components of virgin olive oil whose concentration in olive oil depends on some factors such as the cultivar, climate, ripeness of the olives at harvesting, *etc.* *In vitro* and *ex vivo* models have shown different properties like antioxidant, DNA oxida-

tion prevention, endothelial dysfunction prevention by quenching free radicals, inhibition of platelet aggregation, and antiinflammatory activity (22). Some of these properties as antioxidant, antithrombotic, and capacity of improve endothelial function are reproduced in human as well and revised elsewhere (23, 24). As our group has previously shown, the beneficial effect of a breakfast based in high phenol virgin olive oil on postocclusive skin reactive hyperemia (PORH) by increasing NO bioavailability during the postprandial period in a hypercholesterolemic population (25), the main purpose of this study was to investigate whether there is any interaction between this vascular response and the presence of the *NOS3* Glu298Asp polymorphism variants in a MetS population.

Subjects and Methods

Subjects and design

Fifty-seven subjects (22 men, 35 women) from the Lipids and Atherosclerosis Unit at Hospital Universitario Reina Sofía (Córdoba, Spain) participated in this study. All subjects fulfilled three or more of the criteria proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Panel III for MetS: 1) central obesity (waist circumference >102 cm in men or >88 cm in women); 2) high blood pressure of 130/85 mm Hg or greater or documented use of antihypertensive therapy; 3) high fasting glucose (≥ 100 mg/dl⁻¹); 4) hypertriglyceridemia (≥ 150 mg/dl⁻¹), and 5) low high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) (<40 mg/dl⁻¹ for males or 50 mg/dl⁻¹ for females) (26). None of the participants showed evidence of chronic disease such as hepatic, renal, thyroid, or cardiac; high alcohol consumption; or a family history of early-onset cardiovascular disease nor were taking drugs. None of them were active smokers. Baseline characteristics of all subjects are described in Table 1. All subjects gave written informed consent to participate, which was previously approved by the Review Committee at the Reina Sofía University Hospital in accordance with the Helsinki Declaration.

Participants followed a 6-wk washout period in which they were instructed to avoid consuming soy supplements, vitamins, or drugs. During this period and through the end of the study, all subjects followed a low-fat, carbohydrate-rich diet based on 20 different menus whose adherence was assessed after 2 and 4 wk using a 3-d record and a food frequency questionnaire. In the 24 h before the study intervention, participants were instructed to avoid consuming phenol-rich foods such as fruit or juices, wine, grapes, chocolate, coffee, tea, olive oil, or soy supplements and to refrain from intense physical exercise. After a 12-h fasting period and following a randomized sequential crossover design with a 1-wk washout period, subjects received in the hospital three fat meals (breakfast in this case) consisting of 60 g of white bread, 40 ml of virgin olive oil with three different amount of phenolic content each day (398, 149, and 70 ppm), and 60,000 IU of vitamin A per square meter of body surface. Throughout the 4-h duration of each intervention day, they performed no physical activity nor consumed anything but water *ad libitum*.

TABLE 1. Baseline characteristics of the study participants according to NOS3 Glu298Asp T allelic distribution

	GG	GT/TT	P value
Gender (men/women)	08/13	14/22	0.085
Age (yr)	54 ± 8	57 ± 9	0.23
Weight (kg)	101.8 ± 19.8	97.3 ± 11.1	0.28
Height (cm)	159 ± 9	160 ± 8	0.83
BMI [mass (kg)/height (m)] ²	39.7 ± 4.8	38.1 ± 4.2	0.18
Waist circumference (cm)	116 ± 11	113 ± 10	0.12
Hip circumference (cm)	127 ± 14	127 ± 11	0.31
SBP (mm Hg)	149 ± 20	144 ± 20	0.44
DBP (mm Hg)	93 ± 12	88 ± 11	0.13
MBP (mm Hg)	112 ± 14	107 ± 11	0.17
Glucose (mg/dl)	105 ± 19	104 ± 22	0.93
Insulin (mU/liter)	13.4 ± 8.4	12.3 ± 9.9	0.49
Tchol (mg/dl)	211 ± 37	199 ± 25	0.11
LDLc (mg/dl)	127 ± 33	119 ± 23	0.26
HDLc (mg/dl)	53 ± 12	48 ± 13	0.16
TG (mg/dl)	145 ± 49	174 ± 96	0.19
APOA1 (mg/dl)	148 ± 21	136 ± 24	0.98
APOB (mg/dl)	99 ± 24	98 ± 17	0.56
Lp(a) (mg/dl)	52 ± 45	33 ± 34	0.78
CRP (mg/liter)	3.5 ± 4.3	2.5 ± 2.9	0.28

Values are presented as mean ± SD. P values are from one-way ANOVA analysis testing differences between genotype groups. Gender differences were tested with χ^2 test. BMI, Body mass index; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MBP, mean blood pressure; LDLc, low-density lipoprotein-cholesterol; APO, apolipoprotein; Lp(a), lipoprotein a; CRP, C-reactive protein.

Sample collection

Blood samples were drawn after an overnight (12 h) fast, before the breakfast, and 120 and 240 min after its consumption. Samples from the fasting and postprandial states were collected in tubes containing 1 g EDTA per liter or 3.8% citrate and were stored in containers with ice and kept in the dark. Plasma was separated from whole blood by low-speed centrifugation at $1500 \times g$ for 15 min at 4°C within 1 h of extraction.

Endothelial function

Laser-Doppler linear Periflux 5000 (Perimed AB; Järfälla, Stockholm, Sweden) was used to measure PORH. Laser Doppler uses the Doppler shift principle in which laser light is scattered by moving blood cells to produce a shift on the reflected light, which is detected by a photodetector and processed to determine the amount of the frequency shift. The resulting signal is the product of the number of blood cells moving and the mean velocity of them in a sample, usually expressed in arbitrary units of flux. With the patient lying in the supine position in a room with stable temperature (20–22°C), the blood pressure cuff (HG Erkameter 300; Erka, Bad Tolz, Germany) was placed 5 cm above the elbow while the laser probe was attached to the palmar surface of the second finger of the same dominant hand. After a 5-min resting period, basal capillary flow was measured for 1 min (t_0). Thereafter, 4-min distal ischemia was induced by inflating the

cuff to suprasystolic pressure (200–220 mm Hg). The cuff was then deflated and, after 30 sec, the flow was recorded for 1 min (t_d). The data obtained were recorded and stored using the software PeriSoft for Windows 2.5 (Perimed AB; Järfälla). The values of the area under the curve (AUC) of the t_0 and t_d times were analyzed. These data were used to calculate the increase in postischemic flow by means of this formula: incremental area under the curve = $[(AUC_{t_d} - AUC_{t_0}) \times 100/AUC_{t_0}]$. The values of skin flux at baseline (baseline) and the maximum value achieved after 4 min of flow occlusion (PORH_{peak}) were also analyzed. PORH_{max} was defined as PORH_{peak} referred to baseline value and was calculated: $PORH_{max} = [(PORH_{peak}) - \text{baseline skin flux}]$. These measurements were carried out three times: before and 120 and 240 min after the consumption of every breakfast.

Analytical methods

Lipid parameters were measured with a modular autoanalyzer DDPII Hitachi (Roche, Basel, Switzerland) using specific reagents (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Determinations of total cholesterol (Tchol) and triglyceride (TG) levels were made by colorimetric enzymatic methods (27, 28); HDLc by colorimetric assay after precipitating the lipoproteins containing apolipoprotein B with polyethyleneglycol (29); low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald formula based on Tchol, TG, and HDLc values (30).

Apolipoprotein A1 and apolipoprotein B levels were measured by immunoturbidimetry (31). Plasma glucose concentrations were measured with a Hitachi 917 analyzer (Roche Molecular Biochemicals) by the glucose oxidase method. Plasma insulin concentrations were measured by microparticle enzyme immunoassay (Abbott Diagnostics, Matsudo-shi, Japan). Plasma NO concentration was estimated by measuring nitrate and nitrite [$NO_{(x)}$] levels as a marker of NO bioavailability by colorimetric method using a nitrate/nitrite colorimetric assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). eNOS plasma concentration was determined by a colorimetric assay kit (Calbiochem, La Jolla, CA).

Blood draws were performed after an overnight (12 h) fast, before the breakfast, and 120 and 240 min after its consumption.

NOS3 Glu298Asp polymorphism genotypes

Genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells using a Quiamp DNA blood mini kit (QIAGEN Iberia, Madrid, Spain). Genotype for the NOS3 Glu298Asp polymorphism was determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis using specific oligonucleotide primers (forward, 5'-CCC TGT CCT GCT CCC T-3' and reverse, 5'-CTC AAA CGC TAC AGG G-3'). PCR products were digested by *MobI* and were separated by a 2.5% agarose gel. The resulting 206-bp PCR product was cleaved into two smaller fragments of 119 and 87 bp in the presence of a T nucleotide at 894 (corresponding to Asp 298) but not in its absence. The fragments were visualized after ethidium bromide staining under UV light.

Statistical analysis

The normality of data was assessed using the Shapiro-Wilk test, and log transformation of data was performed when those variables were not normally distributed. In genotype

TABLE 2. Postprandial changes PORH evaluated by laser Doppler flowmetry after the acute intake of virgin olive oil with high (398 ppm), medium (189 ppm), or low (70 ppm) concentrations of phenolic compounds at time points 0, 120, and 240 min

Genotype	Log(PORHpeak) Time (min)			Log(PORHiAUC) Time (min)		
	0	120	240	0	120	240
HPOO						
GG	5.35 ± 1.10	5.24 ± 1.15	6.23 ± 1.20	3.29 ± 0.39	3.18 ± 0.21	3.18 ± 0.35
GT	5.86 ± 1.08	5.43 ± 1.10	5.24 ± 1.16	3.46 ± 0.55	3.20 ± 0.49	3.14 ± 0.53
TT	5.70 ± 1.14	5.23 ± 1.11	5.23 ± 1.26	2.96 ± 0.47	2.91 ± 0.55	3.06 ± 0.48
MPOO						
GG	5.58 ± 1.10	5.21 ± 1.13	5.21 ± 1.11	3.32 ± 0.65	3.83 ± 0.53	3.10 ± 0.44
GT	5.62 ± 1.13	5.39 ± 1.16	5.13 ± 1.15	3.32 ± 0.41	3.19 ± 0.49	3.22 ± 0.56
TT	5.62 ± 1.10	5.06 ± 1.11	5.03 ± 1.16	2.98 ± 0.74	3.12 ± 0.45	3.25 ± 0.60
LPOO						
GG	5.46 ± 1.12	5.06 ± 1.15	5.06 ± 1.09	3.18 ± 0.5	3.23 ± 0.41	3.02 ± 0.61
GT	5.62 ± 1.11	5.13 ± 1.16	4.96 ± 1.18	3.28 ± 0.48	3.16 ± 0.59	3.25 ± 0.56
TT	5.61 ± 1.20	4.82 ± 1.25	4.79 ± 1.09	2.95 ± 0.18	2.87 ± 0.35	2.23 ± 0.45
		p1 = 0.026			p1 = 0.004	
		p2 = 0.073			p2 = 0.002	
		p3 = 0.878			p3 = 0.051	

Values are presented as mean ± SD. Two-way ANOVA analysis for repeated measures was used: p1, olive oil effect; p2, genotype effect; p3, olive oil*genotype effect. iAUC, Incremental AUC; HPOO, high phenol olive oil; MPOO, medium phenol olive oil; LPOO, low phenol olive oil.

analysis, the Hardy Weinberg equilibrium was tested using a robust χ^2 -based test. We performed two-factor ANOVA for repeated measures with Tukey *post hoc* analysis. In this analysis we studied the statistical effects of the type of the olive oil ingested independent of genotype, the effect of genotype, and the interaction of both factors, indicative of the degree of the postprandial response in each subjects with each breakfast by genotype and the effect of the genotype in $\text{NO}_{(x)}$ and eNOS concentrations. For correlation analysis Pearson's test was used. All data presented in the text and tables are expressed as mean ± SD unless otherwise specified. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical tests were performed using R programming and statistical environment software (General Public License).

Results

Baseline characteristics of study participants

The age of participants ranged from 36 to 70 yr (mean 56 yr). The subjects had a mean body mass index [mass (kilograms)/[height (meters)]²] of $38.7 \pm 4.4 \text{ kg/m}^2$ (27.9–49.4 kg/m^2). The general characteristics of the subjects, according to the NOS3 Glu298Asp genotype subgroups, are described in Table 1. There were no baseline characteristic differences between both groups.

Genotype analysis

Allelic frequencies (G = 0.560; T = 0.440) and genotypic frequencies (GG = 0.335; GT = 0.45; TT = 0.215) for NOS3 Glu298Asp were in line with the reference data for Caucasian populations in HapMap and PERLEGEN. These distributions were in the Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.196$, $P = 0.657$, D = 0.826).

Doppler, genotype, and olive oil

There were no significant differences according to genotype for incremental area under the curve values (Table 2). For the rest of the laser-Doppler parameters, the effect of olive oil on the endothelial function by NOS3 Glu298Asp genotypes is shown in Table 2 and Fig. 1. The grade of olive oil influenced the PORHpeak response ($P = 0.026$). In the *post hoc* analysis, the PORHpeak after the intake of olive oil with high or medium phenolic content was higher than after low-phenol olive oil (data not shown). In the other variable measured, PORHmax, we found a gene-diet interaction ($P = 0.039$). The postprandial vascular response was lower in TT subjects compared with those with the TG or GG genotypes after intake of olive oil with low and medium phenol concentration but not when phenol-rich olive oil was consumed ($P = 0.002$) (Fig. 1).

eNOS/ $\text{NO}_{(x)}$ concentrations, genotype, and olive oil

Homozygous subjects for the T allele had significantly lower basal plasma concentrations of eNOS ($P = 0.032$) and $\text{NO}_{(x)}$ ($P = 0.039$) compared with GG and GT subjects (Figs. 2 and 3). A marked reduction in $\text{NO}_{(x)}$ was observed in homozygous subjects for the T allele after the intake of low-phenol olive oil but not when olive oil with medium or high content in phenolic compounds was consumed ($P = 0.015$).

Correlation between PORHmax and $\text{NO}_{(x)}$

A positive correlation between $\text{NO}_{(x)}$ concentration and PORHmax was found after the intake of olive oil with high ($r = 0.379$; $P = 0.001$) and medium ($r = 0.378$; $P =$

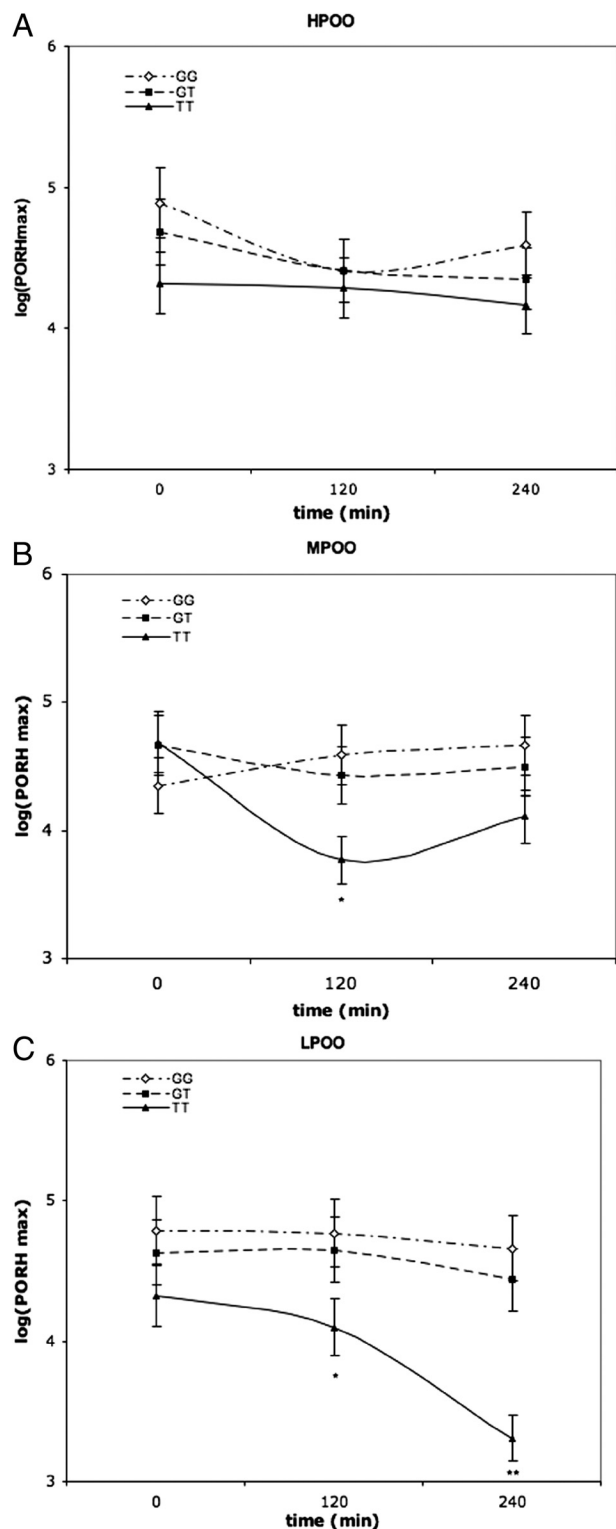


FIG. 1. Evaluation of the influence of NOS3 Glu298Asp genotypes PORHmax after the intake of olive oil with different content of phenolic compounds at time points 0, 120, and 240 min. A, High phenol olive oil. B, Medium phenol olive oil. C, Low phenol olive oil. HPOO, High phenol olive oil; MPOO, medium phenol olive oil; LPOO, low phenol olive oil. Two-way ANOVA analysis for repeated measures was used: olive oil effect: $P = 0.414$; genotype effect: $P = 0.002$; olive oil*genotype effect: $P = 0.039$. Tukey *post hoc* analysis by genotype: *, $P < 0.05$.

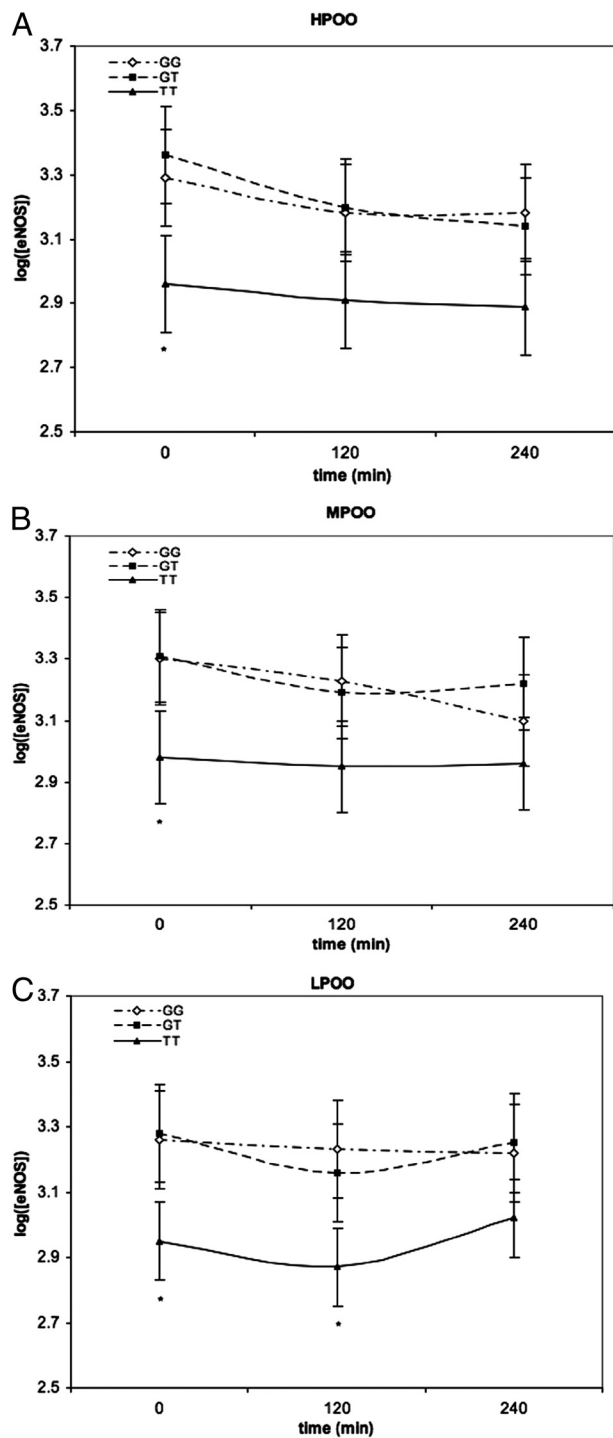


FIG. 2. Evaluation of the influence of NOS3 Glu298Asp genotypes on postprandial plasma eNOS concentration after the intake of olive oil with different contents of phenolic compounds at time points 0, 120, and 240 min. A, High phenol olive oil. B, Medium phenol olive oil. C, Low phenol olive oil. HPOO, High phenol olive oil; MPOO, medium phenol olive oil; LPOO, low phenol olive oil. Two-way ANOVA analysis for repeated measures was used: olive oil effect: $P = 0.932$; genotype effect: $P = 0.032$; olive oil*genotype effect: $P = 0.242$. Tukey *post hoc* analysis by genotype: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$.

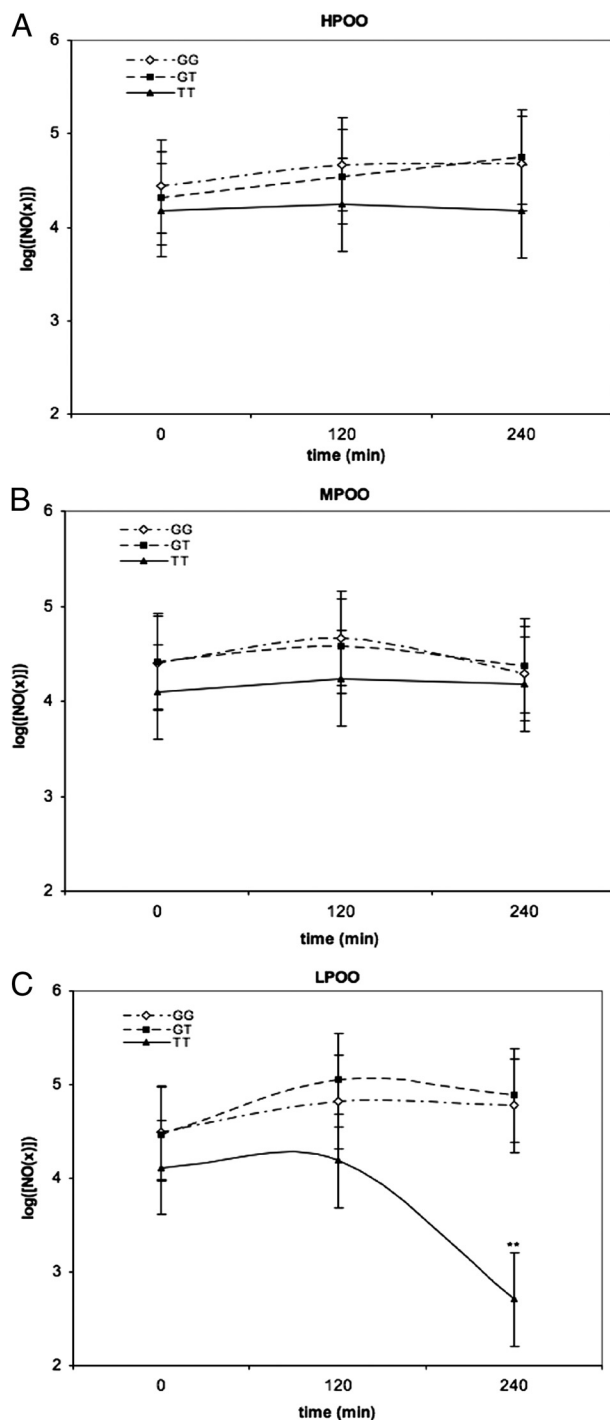


FIG. 3. Evaluation of the influence of NOS3 Glu298Asp genotypes on postprandial plasma NO_(x) concentration after the intake of olive oil with different content of phenolic compounds at time points 0, 120, and 240 min. A, High phenol olive oil. B, Medium phenol olive oil. C, Low phenol olive oil. HPOO, High phenol olive oil; MPOO, medium phenol olive oil; LPOO, low phenol olive oil. Two-way ANOVA analysis for repeated measures was used: olive oil effect: $P = 0.015$; genotype effect: $P = 0.039$; olive oil*genotype effect: $P = 0.042$. Tukey *post hoc* analysis by genotype: **, $P < 0.001$.

0.0001) content in phenolic compounds but not when low-phenol olive oil was consumed ($r = 0.060$, $P = 0.587$). When an analysis was carried out for the NOS3 Glu298Asp genotype, a positive correlation between

NO_(x) concentration and PORHmax was observed in G allele carriers (GG: $r = 0.778$; $P < 0.0001$; TG: $r = 0.318$; $P = 0.0001$) but not in subjects with the TT genotype ($r = 0.170$; $P = 0.128$). Figures are given as supplemental material.

Discussion

Our findings demonstrate that patients with MetS who have the TT genotype for NOS3 Glu298Asp polymorphism display a less efficient postprandial endothelial function, as evidenced by a lower PORHmax. Interestingly, this loss of function is more evident when the olive oil used in preparing the meal is low in phenolic content, showing an interaction between genotype and the concentration in phenolic compounds of the olive oil consumed. Looking for underlying mechanisms, we found that these subjects have a lower eNOS concentration and NO bioavailability. This group of patients could have an insufficient response when, in stress conditions, an increase of activity is required of a dysfunctional eNOS, unless molecules with a high antioxidant capacity, such as those provided by meals rich in high-phenol virgin olive oil, are present.

The postprandial state is an active field of research in cardiovascular disease due to the evidence indicating that it influences cardiovascular risk (32). During this period, there is a transient endothelial dysfunction, mainly after fatty meals. However, this phenomenon is not uniform and may be regulated by extrinsic and intrinsic variables. We previously published that the intake of a virgin olive oil with a high content of phenolic compounds modulates the postprandial endothelial function in hypercholesterolemic patients (25). There are several possible mechanisms underlying this fact, but the main route seems to be the NO pathway. For this, there is a lot of evidence about the antioxidant *in vivo* effects of phenols (25, 33–36). In line with this evidence, it has been recently published that giving mice a diet rich in olive oil increases the activity of NOS, as well as its genetic expression, via an activation of L-arginine transport (37). In addition, NO synthase gene variations have been implicated in postprandial endothelial function. We have recently shown that healthy male T carriers for the NOS3 Glu298Asp who are submitted to a saturated fatty acid-rich meal have a less efficient postprandial endothelial function compared with GG homozygous (21).

Interestingly, some studies have linked the T allele with an increased risk of coronary vasospasm in patients with CAD, which can indicate that part of its augmented risk may be due to alterations in normal vessel vasodilatation (38, 39), which agrees with our results. Nevertheless, few

studies have focused on the endothelial function when looking the underlying biological processes that link this polymorphism to cardiovascular disease (CAD, stroke, hypertension, *etc.*).

Our data suggest that the NO pathway may mediate differences in the endothelial function due to NOS3 Glu298Asp genotypes. To show this, we determined the eNOS plasma concentration and NO_(x), and these parameters were lower among the TT genotype of the NOS3 Glu298Asp polymorphism compared with GT and GG subjects. We suggest that a lower constitutive concentration of eNOS in the group of patients with the TT genotype could be the cause of the lower bioavailability of NO during the fasting and postprandial states. It is known that NO bioavailability is crucial for the maintenance of basal tone and endothelium-dependent vasodilatory response, and its alteration leads to oxidative stress and local inflammatory environment (40). A lack of positive correlation between PORHmax and NO_(x) concentration was observed in TT subjects after intake of olive oil with low phenolic content. In a deleterious environment, with a lower NO concentration, some other additional mechanisms of vasodilatation (neuronal, cAMP, calcium, or the kinases pathway) probably contribute to PORH.

How a single nucleotide change can perform such an important effect on the endothelial function is still to be discovered, but it has been shown in experimental studies that the presence of the T allele is correlated with lower eNOS activity. When a T is present instead of a G at nucleotide position 894, the NOS3 gene encodes a protein product containing aspartate, instead of glutamate, which leads to a higher susceptibility to cleavage into a 100-kDa fragment, thus decreasing eNOS activity (41). Looking for additional hypothesis to help us to understand how this single-nucleotide polymorphism could influence the NO pathway, it has recently been discovered that the T allele carriers have less eNOS associated with caveolin-1, the main protein in endothelial caveolae, and the main storage of inactive NOS3 in a static condition and a functional disruption after acute stress, leading to a dysfunctional enzyme (42).

In our model, we combined two potential endothelial stress factors for MetS patients: the postprandial state and transient ischemia. First, we used virgin olive oil, high in phenolic compounds, as the source of fat, thus creating a less proinflammatory and prooxidant environment, and second, we tested this situation after several concentrations of those natural antioxidants. According to our hypothesis, the T carriers showed a less efficient endothelial function via NO pathway activation, as evidenced by a lower PORHmax parameter and lower NO_(x) and eNOS plasma concentrations. But, more interestingly, there was

a gene-diet interaction, both in PORHmax parameters and plasma surrogate markers, with lower differences between genotypes when increasing concentrations of phenols. In other words, a higher concentration of phenols seemed to reduce, at least in part, the deleterious effect of the T allele carrier's condition. These results may be mediated by the antioxidant and antiinflammatory effects of virgin olive oil in general and phenols in particular (25, 33, 35, 36).

It has to be underlined that we have analyzed the biological effect of olive oil after only one isolated meal, and these results have to be replicated in different populations and after a long-term consumption of virgin olive oils, including a non-Caucasian population. As is well known, ethnic differences can be of considerable relevance in genetic studies. In fact, the allelic frequencies of the Glu289Asp polymorphism vary considerably among Caucasian, African, and Asiatic groups, so it certainly would not be right to generalize our results to those populations.

The benefits of sustained olive oil consumption are known worldwide and not only due to its monounsaturated fatty acids but also to its minor components as phenolic compounds. After this study we know one more benefit of this nutrient: improving the endothelial function, especially in a population who constitutively has a worse vasodilatory response. This benefit is achieved after a single dose of olive oil with high phenolic content, an important fact in the diary clinical practice to give advice to our patients.

Summarizing, we describe for the first time a gene-diet interaction between virgin olive oil with high concentration of phenolic compounds and the Glu298Asp polymorphism of the eNOS, one of the most relevant enzymes involved in endothelial function regulation. The patients with the TT genotype display a lower vascular response compared with the TG and GG genotypes, and this response is ameliorated after intake of phenol rich EVOO.

Acknowledgments

We thank the patients who participated in this study. The Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III (Madrid, Spain). We also extend our thanks to Marino Uceda, who prepared the olive oil, and to José Carlos Isla Tejera for the technical support with the artworks. A.I.J.-M., J.R., and F.P.-J. designed research; A.I.J.-M., J.R., J.M.F., A.C., F.L.-S., J.C.V., and F.F.-J. conducted research; A.I.J.-M. and J.R. analyzed data; A.I.J.-M., J.R., and J.D.-L. wrote the paper; and J.L.-M. and F.P.-J. had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Francisco Pérez-Jiménez, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Reina Sofía, Avendua Menéndez Pidal s/n, Córdoba 14004, Spain. E-mail: fperezjimenez@uco.es.

This work was supported by Grant AGR 922 from the Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía (to F.P.-J.); Grants 06/0129 (to F.P.-J.) and 0040/07 (to J.R.) from the Consejería de Salud, Junta de Andalucía; Grant REF 200500253 from the Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud (to F.P.-J.); and the Diputación Provincial de Córdoba, Agencia para el Aceite de Oliva and the University of Córdoba. The work was also supported in part by research grants from the Spanish Ministry of Health (Grant CB06/03/0047, Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, to F.P.-J.) and the Fundación Biomédica de Córdoba.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S 2009 Endothelial dysfunction as a target for prevention of cardiovascular disease. *Diabetes Care* 32(Suppl 2):S314–S321
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Lüscher TF, Mancía G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ 2005 Endothelial function and dysfunction. Part II: association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23:233–246
- Taddei S, Ghiadoni L, Viridis A, Versari D, Salvetti A 2003 Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr Pharm Des* 9:2385–2402
- Chidlow Jr JH, Sessa WC 2010 Caveolae, caveolins, and cavins: complex control of cellular signalling and inflammation. *Cardiovasc Res* 86:219–225
- Velloso MW, Pereira SB, Gouveia L, Chermont S, Tardin OM, Gonçalves R, Camacho V, Contarato Lde F, Quintão M, Oliveira e Alves T, Pessoa LP, Brito Júnior A, Ribeiro GS, Mesquita ET 2010 Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism in a multi-ethnic population with heart failure and controls. *Nitric Oxide* 22:220–225
- Hsieh MC, Hsiao JY, Tien KJ, Chang SJ, Lin PC, Hsu SC, Liang HT, Chen HC, Lin SR 2008 The association of endothelial nitric oxide synthase G894T polymorphism with C-reactive protein level and metabolic syndrome in a Chinese study group. *Metabolism* 57:1125–1129
- Han Y, Xu W, Zhang W, Liu N, Ji Y 2010 T-786C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Pharmacology* 85:211–216
- Isordia-Salas I, Leañós-Miranda A, Borrayo-Sánchez G 2010 The Glu298ASP polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with premature ST elevation myocardial infarction in Mexican population. *Clin Chim Acta* 411:553–557
- Hibi K, Ishigami T, Tamura K, Mizushima S, Nyui N, Fujita T, Ochiai H, Kosuge M, Watanabe Y, Yoshii Y, Kihara M, Kimura K, Ishii M, Umemura S 1998 Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and acute myocardial infarction. *Hypertension* 32:521–526
- Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, Haydock S, Hopper RV, Stephens NG, O'Shaughnessy KM, Brown MJ 1999 A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298→Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation* 100:1515–1520
- Eifert S, Rasch A, Beiras-Fernandez A, Nollert G, Reichart B, Lohse P 2009 Gene polymorphisms in APOE, NOS3, and LIPC genes may be risk factors for cardiac adverse events after primary CABG. *J Cardiothorac Surg* 4:46
- Wang CJ, Zhao JB, Xu JL, Xiang ZL, Liang CW, Li J 2009 [Meta-analysis on the association of G894T polymorphism in endothelial nitric oxide synthase gene and essential hypertension in Chinese population.]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 30:845–849
- Piccoli JC, Gottlieb MG, Castro L, Bodanese LC, Manenti ER, Bogo MR, Peres A, Rocha MI, Cruz IB 2008 Association between 894G>T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52:1367–1373
- González-Sánchez JL, Martínez-Larrad MT, Sáez ME, Zabena C, Martínez-Calatrava MJ, Serrano-Ríos M 2007 Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with features of metabolic syndrome. *Clin Chem* 53:91–97
- Tso AW, Tan KC, Wat NM, Janus ED, Lam TH, S L Lam K 2006 Endothelial nitric oxide synthase G894T (Glu298Asp) polymorphism was predictive of glycemic status in a 5-year prospective study of Chinese subjects with impaired glucose tolerance. *Metabolism* 55:1155–1158
- Lembo G, De Luca N, Battagli C, Iovino G, Aretini A, Musicco M, Frati G, Pompeo F, Vecchione C, Trimarco B 2001 A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke* 32:735–740
- Philip I, Plantevefe G, Vuillaumier-Barrot S, Vicaut E, LeMarie C, Henrion D, Poirier O, Levy BI, Desmots JM, Durand G, Benessiano J 1999 G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation* 99:3096–3098
- Perez-Martinez P, Moreno-Conde M, Cruz-Teno C, Ruano J, Fuentes F, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Marin C, Gomez-Luna MJ, Perez-Jimenez F, Roche HM, Lopez-Miranda J 2010 Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *Atherosclerosis* 209:533–538
- Leeson CP, Hingorani AD, Mullen MJ, Jeerooburkhan N, Kattenhorn M, Cole TJ, Muller DP, Lucas A, Humphries SE, Deanfield JE 2002 Glu298Asp endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism interacts with environmental and dietary factors to influence endothelial function. *Circ Res* 90:1153–1158
- Ferguson JF, Phillips CM, McMonagle J, Pérez-Martínez P, Shaw DI, Lovegrove JA, Helal O, Defoort C, Gjelstad IM, Drevon CA, Blaak EE, Saris WH, Leszczyńska-Golabek I, Kiec-Wilk B, Rísérus U, Karlström B, Lopez-Miranda J and Roche HM 2010 NOS3 gene polymorphisms are associated with risk markers of cardiovascular disease, and interact with ω-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* 211:539–544
- Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, Fuentes F, Jiménez-Gomez Y, Gomez-Luna MJ, Parnell LD, Marin C, Lai CQ, Perez-Jimenez F, Ordovas JM, Lopez-Miranda J 2011 Gene variations of nitric oxide synthase regulate the effects of a saturated fat rich meal on endothelial function. *Clin Nutr (Edinburgh, Scotland)* 30:234–238
- Fitó M, de la Torre R, Farré-Albaladejo M, Khymenetz O, Marrugat J, Covas MI 2007 Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita* 43:375–381
- Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio JJ, Garcia Luna PP, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton PM, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez MA, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Peruchó M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriguer-Escofet F,

- de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F 2005 International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 35:421–424
24. López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI, Escrich E, Ordovás JM, Soriguer F, Abiá R, de la Lastra CA, Battino M, Corella D, Chamorro-Quirós J, Delgado-Lista J, Giugliano D, Esposito K, Estruch R, Fernandez-Real JM, Gaforio JJ, La Vecchia C, Lairon D, López-Segura F, Mata P, Menéndez JA, Muriana FJ, Osada J, Panagiotakos DB, Paniagua JA, Pérez-Martínez P, Perona J, Peinado MA, Pineda-Priego M, Poulsen HE, Quiles JL, Ramírez-Tortosa MC, Ruano J, Serra-Majem L, Solá R, Solanas M, Solfrizzi V, de la Torre-Fornell R, Trichopoulou A, Uceda M, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F, Yiannakouris N 2010 Olive oil and health: summary of the II International Conference on Olive Oil and Health Consensus Report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20:284–294
 25. Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martinez P, Lozano A, Gómez P, Jiménez Y, Pérez Jiménez F 2005 Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 46:1864–1868
 26. Grundy SM, Cleeman Jr JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith Jr SC, Spertus JA, Costa F 2005 Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735–2752
 27. Bucolo G, David H 1973 Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19:476–482
 28. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC 1974 Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 20:470–475
 29. Briggs CJ, Anderson D, Johnson P, Deegan T 1981 Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol. *Ann Clin Biochem* 18:177–181
 30. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS 1972 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499–502
 31. Riepponen P, Marniemi J, Rautaoja T 1987 Immunoturbidimetric determination of apolipoproteins A-1 and B in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 47:739–744
 32. López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Marín C, Moreno JA, Gómez P, Pérez-Jiménez F 2006 Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 17:132–138
 33. Cicerale S, Lucas L, Keast R 2010 Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *Int J Mol Sci* 11:458–479
 34. Covas MI, de la Torre K, Farré-Albaladejo M, Kaikkonen J, Fito M, López-Sabater C, Pujadas-Bastardes MA, Joglar J, Weinbrenner T, Lamuela-Raventós RM, de la Torre R 2006 Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radic Biol Med* 40:608–616
 35. Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC 2010 Hydroxytyrosol: from laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr Rev* 68:191–206
 36. Pérez-Jiménez F, Ruano J, Perez-Martinez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J 2007 The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res* 51:1199–1208
 37. Martins MA, Catta-Preta M, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB, Brunini TC, Mendes-Ribeiro AC 2010 High fat diets modulate nitric oxide biosynthesis and antioxidant defence in red blood cells from C57BL/6 mice. *Arch Biochem Biophys* 499:56–61
 38. Chang K, Baek SH, Seung KB, Kim PJ, Ihm SH, Chae JS, Kim JH, Hong SJ, Choi KB 2003 The Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with coronary spasm. *Coron Artery Dis* 14:293–299
 39. Ogimoto A, Shigematsu Y, Nakura J, Hara Y, Ohtsuka T, Kohara K, Hamada M, Miki T, Higaki J 2005 Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) in patients with coexistent hypertrophic cardiomyopathy and coronary spastic angina. *J Mol Med (Berlin, Germany)* 83:619–625
 40. Stabler T, Kenjale A, Ham K, Jelesoff N, Allen J 2010 Potential mechanisms for reduced delivery of nitric oxide to peripheral tissues in diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 1203:101–106
 41. Tesauro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J 2000 Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:2832–2835
 42. Joshi MS, Mineo C, Shaul PW, Bauer JA 2007 Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variation in human endothelium: altered caveolar localization and impaired response to shear. *FASEB J* 21:2655–2663

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil

Antonio Camargo¹, Juan Ruano¹, Juan M Fernandez¹, Laurence D Parnell², Anabel Jimenez¹, Monica Santos-Gonzalez³, Carmen Marin¹, Pablo Perez-Martinez¹, Marino Uceda⁴, Jose Lopez-Miranda¹ and Francisco Perez-Jimenez*¹

Abstract

Background: Previous studies have shown that acute intake of high-phenol virgin olive oil reduces pro-inflammatory, pro-oxidant and pro-thrombotic markers compared with low phenols virgin olive oil, but it still remains unclear whether effects attributed to its phenolic fraction are exerted at transcriptional level *in vivo*. To achieve this goal, we aimed at identifying expression changes in genes which could be mediated by virgin olive oil phenol compounds in the human.

Results: Postprandial gene expression microarray analysis was performed on peripheral blood mononuclear cells during postprandial period. Two virgin olive oil-based breakfasts with high (398 ppm) and low (70 ppm) content of phenolic compounds were administered to 20 patients suffering from metabolic syndrome following a double-blinded, randomized, crossover design. To eliminate the potential effect that might exist in their usual dietary habits, all subjects followed a similar low-fat, carbohydrate rich diet during the study period. Microarray analysis identified 98 differentially expressed genes (79 underexpressed and 19 overexpressed) when comparing the intake of phenol-rich olive oil with low-phenol olive oil. Many of these genes seem linked to obesity, dyslipemia and type 2 diabetes mellitus. Among these, several genes seem involved in inflammatory processes mediated by transcription factor NF- κ B, activator protein-1 transcription factor complex AP-1, cytokines, mitogen-activated protein kinases MAPKs or arachidonic acid pathways.

Conclusion: This study shows that intake of virgin olive oil based breakfast, which is rich in phenol compounds is able to repress *in vivo* expression of several pro-inflammatory genes, thereby switching activity of peripheral blood mononuclear cells to a less deleterious inflammatory profile. These results provide at least a partial molecular basis for reduced risk of cardiovascular disease observed in Mediterranean countries, where virgin olive oil represents a main source of dietary fat. Admittedly, other lifestyle factors are also likely to contribute to lowered risk of cardiovascular disease in this region.

Background

Metabolic syndrome (MetS) is a very common condition that is associated with increased cardiovascular disease (CVD) risk and type 2 diabetes mellitus, itself a risk factor

for CVD. Its diverse clinical characteristics illustrate the complexity of the disease, involving several dysregulated metabolic pathways and multiple genetic targets. When caloric intake exceeds caloric expenditure, a positive caloric balance and subsequent storage of fat in adipose tissue appears; this often is cause of adipocyte hypertrophy and obesity. Depending on interaction of genetic and environmental factors, this hypertrophy can be followed by macrophage accumulation within adipose tissue leading to local hypoxia, inflammation, and oxidative stress.

* Correspondence: fperezjimenez@uco.es

¹ Lipids and Atherosclerosis Research Unit. IMIBIC (Instituto Maimonides de Investigacion Biomedica de Cordoba), Reina Sofia University Hospital, University of Cordoba, and CIBER Fisiopatologia de la Obesidad y Nutricion, Spain

† Contributed equally

Full list of author information is available at the end of the article

These deleterious effects favor adipose functional failure resulting in changes in systemic energy delivery; these also impair glucose consumption and activate self-regulatory mechanisms that exert influence over whole body homeostatic systems and link obesity to numerous health problems associated with MetS [1]. A low-level systemic chronic inflammation, with abnormal cytokine production in adipose tissue, increased acute-phase reactants, and activation of inflammatory signaling pathways, often acting over a period of many years, appears to constitute a potential link to atherosclerosis development in these patients [2]. In addition, changes in postprandial metabolism undergoing every time we have a meal as well as alterations in this state may play an important role in the development of cardiovascular and cardiovascular associated diseases [3]. Moreover, Van Oostrom et al. [4] provides evidence that postprandial triglyceridemia is related to a pro-inflammatory state due to high expression of markers of neutrophilic and monocyte activation.

The anti-atherogenic effects associated with Mediterranean Diet (MD) rich in Virgin Olive Oil (VOO) consumption, could contribute in explaining the low rates of cardiovascular mortality found in Southern European Mediterranean countries, in comparison with other Western populations [5]. It has been demonstrated recently that inhibition of circulating immune cell activation could be a protective mechanism by which MD exerts its healthy effects [6]. Bonani et al. [7] showed that extra VOO consumption reduces inflammatory markers and increase serum antioxidant capacity at postprandial state. Previously, our group has showed how a VOO-rich MD, during postprandial state, reduces inflammatory response of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) mediated by transcription factor NF- κ B, when compared to, butter and walnut-enriched diets or Western diets [8,9]. These results have been replicated by others and support the hypothesis that decreasing NF- κ B pathway activation is a mechanism involved in the anti-inflammatory effect of a VOO-rich MD [10,11]. Nevertheless, it has been proposed that healthy effects of VOO may be due not only to its oleic acid content but also to the antioxidant and anti-inflammatory capacity of minor components, especially the phenol-rich fraction [12,13]. Our group demonstrated that the VOO phenol fraction also improves endothelial dysfunction and haemostatic profile during postprandial state [14,15]. Other studies showed how these compounds ameliorate lipid profiles and decrease oxidative stress *in vivo* [12]. However, in animal models, it has been showed that hydroxytyrosol, a phenol found in olive oil, administered after being extracted from its original matrix could be not only non beneficial but indeed harmful for health [16].

It has been speculated that potentially beneficial effects could be due to olive oil modulation on genes involved in

proliferative, antioxidant and inflammatory pathways. In order to clarify this question, some human, animal models and *in vitro* studies were undertaken using gene expression microarray platforms [17]. These studies showed that olive oil is able to modify gene expression coding for proteins participating in cellular mechanisms involved in oxidative stress resistance [18], lipid metabolism [19] and other atherosclerosis-related traits/pathways [20,21]. Nonetheless, it is unresolved whether these changes in gene expression are mediated by oleic acid or executed by olive oil polar minor components, maybe as a consequence of their antioxidant capacity, or by interacting directly with receptors, enzymes or transcription factors. To date, no intervention studies in humans have thoroughly explored the effects of VOO phenol compounds on gene expression. Thus, the main purpose of this study was to identify genes which undergo changes in expression in PBMCs in patients with MetS, after acute intake of breakfast based in phenol-rich virgin olive oil, compared to phenol-poor olive oil breakfast.

Results

Postprandial metabolic parameters

No significant differences were observed in any of the iAUCs of the main metabolic variables (glucose, insulin, non-sterified fatty acids, serum triglycerides and high density lipoprotein cholesterol) after intake of phenol-rich virgin olive oil compared with olive oil with lower content of these compounds (Table 1).

Microarray results and selection of candidate genes

Two color microarrays experiments were performed by using Agilent platforms; 45,220 probe sets were tested to interrogate the expression of 30,886 unique human genes. Microarray analysis showed a correlation index >90% of the raw log-intensity signal among replicates in the array in all cases. Mean coefficient of variation of the log-signal probe values was lower than 0.1 for intra-array replicates. Changes in gene expression were determined as log₂ ratio of signal intensity values corresponding to transcripts present 4 hours after intake of olive oil with high phenol content, divided by the signal intensity values, which correspond to transcripts present 4 hours after consumption of low phenol content olive oil. 15,308 high-quality probes were selected ranging from 1.89 to -1.79 log₂ ratio. In these, we found 98 genes differentially expressed in human PBMCs (Additional File 1), selecting log₂ ratio greater than 0.4 (more expression after intake of olive oil with high phenol content, this is, at least 1.32 fold, in 19 over-expressed genes) or log₂ ratio lower than -0.4 (less expressed after consumption of high phenol content olive oil; this is, at least 1.32 fold, in 79 under-expressed genes) with a statistical significance (*p*) for the fitted linear model of = 0.01. Results were adjusted by dye-swap

Table 1: Postprandial metabolic parameters.

	Low-phenol OO breakfast	High-phenol OO breakfast	p value
iAUC Glucose (mg.dL-1. min-1)	1775 ± 5156	1556 ± 2661	0.876
iAUC Insulin (U.L-1.min-1)	3722 ± 2904	4141 ± 2239	0.627
iAUC NEFA (mmol.L-1.min-1)	-4257 ± 3321	-4029 ± 2626	0.990
iAUC TG (mg.dL-1. min-1)	4256 ± 3504	4277 ± 6441	0.995
iAUC HDLc (mg.dL-1. min-1)	112 ± 689	135 ± 1036	0.395

Incremental area under the postprandial serum concentration curve (iAUC) of glucose, insulin, NEFA, TG and HDLc after the acute intake of both types of olive oil. OO, olive oil; p values correspond to Wilcoxon-paired test (n = 20); iAUC, incremental area under the concentration curve; NEFA, non-sterified fatty acids; TG, serum triglycerides; HDLc, high density lipoprotein cholesterol. All values are expressed as mean ± SD.

effects and by False Discovery Rate (FDR) using the Benjamini and Hochberg method. The most under-expressed genes in MetS patients during postprandial period after intake of olive oil phenols were *GOS2*, *EGR2*, *EGR1*, *FOSB*, *IL1B*, *NR4A2*, *EGR3*, *RASGEF1B*, *CXCL1* and *PTGS2* (1.95- to 2.74 fold) and the most over-expressed genes were *CA1*, *RAP1GAP*, *GYPB*, *FN1* and *SELENBP1* (1.46- to 1.57- fold). Additionally, we performed a gender analysis (Additional File 2). From these, we found 32 genes differentially expressed in the analysis for both, men and women. However, 329 genes were differentially expressed only for men (218 genes) and only for women (111 genes).

Results validation by qRT-PCR

To confirm microarray results using an independent technique, log₂ of the normalized microarray ratio values were compared with log₂ ratio values for four genes obtained from qRT-PCR experiments (*JUN*, *PTGS2*, *EGR1* and *IL1B*). Results showed that features of the changes in both procedures were similar with Spearman r coefficients between 0.901 and 0.968 and p-values less than 0.001 (Figure 1 and 2).

Pathway analysis

In order to investigate functional relationships in the set of differentially expressed genes, we used the Ingenuity Pathway Analysis Software [22] (Ingenuity Systems, Redwood City, CA USA) which employs a predefined knowledge base containing over 10.000 curated human genes. Of the 98 differentially expressed genes found in patients with MetS during the postprandial period after intake of olive oil phenols, two transcripts (LOC284454, AF351612) showed no entries within the knowledge base and only 81 genes were eligible for network analysis. Inflammatory disorder was the most highly represented disorder (39 genes, p = 2.11E-19). From these, 35 genes (*PTGS2*, *IL1B*, *IL6*, *OSM*, *CCL3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*,

CXCR4, *NAMPT*, *DUSP1*, *DUSP2*, *EGR1*, *EGR2*, *EGR3*, *EREG*, *FOSB*, *GOS2*, *JUN*, *JUNB*, *NFKBIA*, *NFKBIZ*, *NR4A1*, *NR4A2*, *PER1*, *SOCS3*, *SOD2*, *TAGAP*, *TNFAIP3*, *ZFP36*, *AREG*, *CA2*, *CD69*, *CD83*, *CDKN2A*) were under-expressed and after intake of virgin olive oil with high content in phenolic compounds, 4 genes were over-expressed (*CCR2*, *CA1*, *CPVL*, *FN1*). Cellular functions most strongly associated with the differentially expressed genes were cell death (41 genes, p = 7.53E-11), cell migration (24 genes, p = 3.88E-8), cell division (23 genes, p = 6.29E-8), cell proliferation (32 genes, p = 9.90E-7) and transcription (25 genes, p = 3.55E-05). Network analysis yielded 14 different sub-networks, from which, one was identified as preferentially enriched by genes found differentially expressed after high-phenol VOO intake. This top-scoring sub-network included 26 genes whose related top-function was 'inflammatory diseases' with a probability value of 10⁻⁵⁴ (Fisher's exact test) of gene interrelationships being by chance. All sub-networks were merged to obtain the overall network shown in Figure 3. Interacting proteins were added using Ingenuity Pathways Knowledge Base database. Finally non-connected genes or those connected by two or more edges were removed, except for those genes that were found to be differentially expressed in our microarrays analysis.

Discussion

In the present study, we have observed that the phenol fraction of VOO *in vivo* is able to repress the expression of several genes related to inflammation pathways in patients with MetS during postprandial period (Additional File 1). This finding draws interest since pro-inflammatory state remains as one component of MetS [23] and low-grade inflammation is often associated with endothelial dysfunction [24], which by itself is associated to the development of atherosclerosis [25].

The *PTGS2* gene encodes prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (COX-2), an inducible isozyme involved in

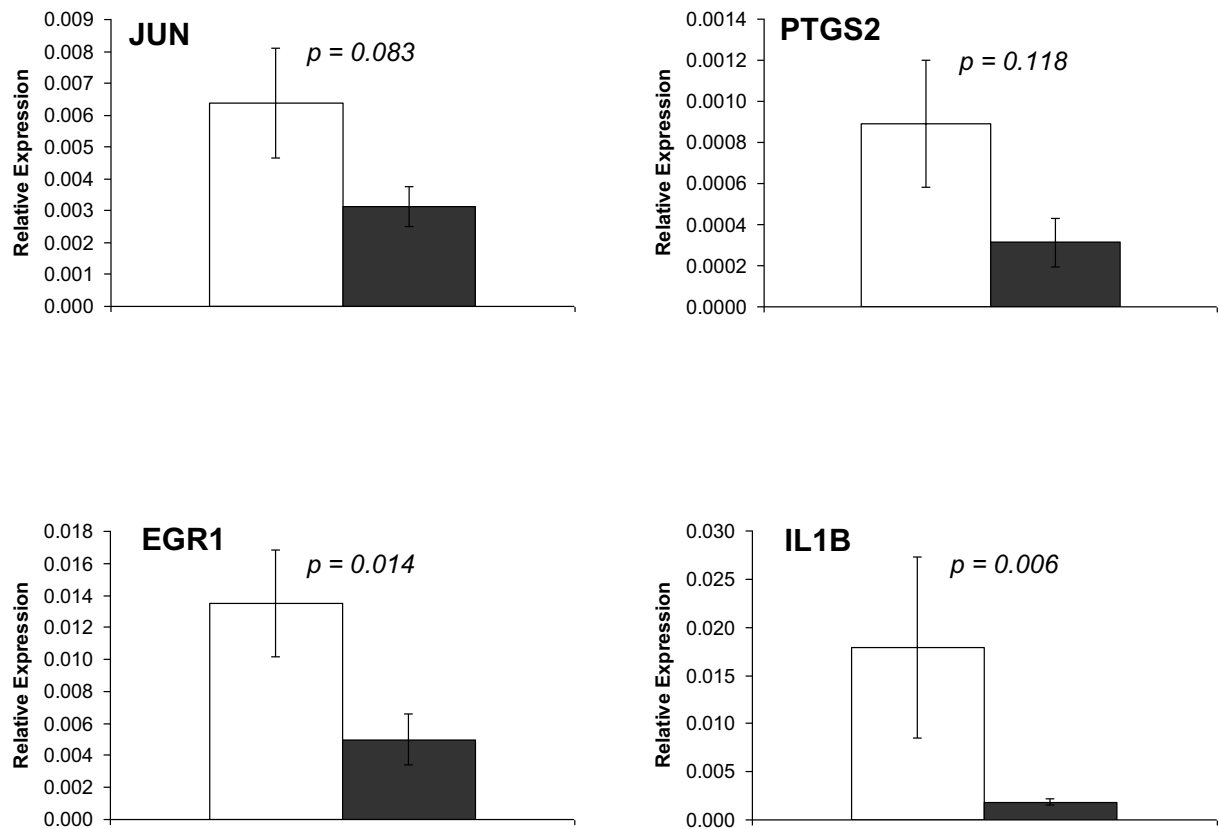
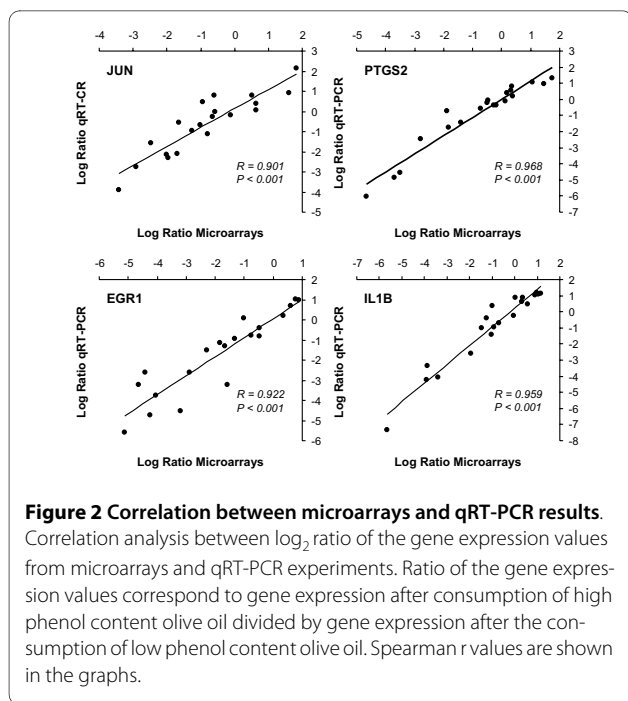


Figure 1 Microarrays results validation by qRT-PCR. Mean (\pm S.E.M.) of relative expression values after the consumption of low and high phenol content olive oil. One way ANOVA p value is showed. Gene expression values were log transformed before statistical analyses.

prostaglandin biosynthesis using arachidonic acid as substrate. In macrophages, and other cells, COX-2 activity is rapidly increased by various stimuli, such as pro-inflammatory cytokine IL1 β . Substantial evidence indicates that up regulated *PTGS2* expression and prostaglandin synthesis indeed influence chronic inflammatory conditions [26]. De la Puerta et al. observed that murine macrophages showed significantly reduced IL1 β production and COX-2 activity after olive oil-enriched diet [27]. Recently, it has been demonstrated that hydroxytyrosol, one of the most important phenol compounds found in virgin olive oil, attenuates *in vitro* LPS-induced transcription of *PTGS2* [28]. Our study showed that *in vivo* intake of phenol-rich virgin olive oil in humans is associated with a decreased expression of both *IL1B* and *PTGS2*, as compared to low-phenol olive oil intake. Those effects could contribute to reduced inflammation during post-prandial state in agreement with anti-inflammatory effects observed after VOO-rich MD consumption [8,9].

The cytokine-cytokine interaction pathway contains a network of proteins (chemokines and their receptors) involved in the recruitment and activation of leukocytes

during inflammatory response. Expression of genes such as *CCL3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, *CXCR4*, *IL1B*, *IL6*, and *OSM* is described under-expressed after acute intake of phenol-rich olive oil in our intervention study on diet. *CCL3* gene, which codes for macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1), has been implicated in monocyte infiltration of adipose tissue, an action that could significantly influence a pro-inflammatory pattern within endothelial cells [29]. *CXCL1*, *CXCL2* (*MIP2A*), and further, *CXCL3* (*MIP2B*) are genes for small and structurally related chemokines that regulate cell trafficking of various types of leukocytes through interactions with a subset of G protein-coupled receptors. Elgazar-Carmon et al. have demonstrated in mice that early neutrophil infiltration of adipose tissue may be mediated by *CXCL1*, a process that would precede macrophage infiltration after long-term consumption of a high-fat diet [30]. *IL6* encodes a cytokine which is secreted to serum and induces a transcriptional response involved in a wide variety of inflammation-associated conditions, including MetS and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [31]. On the other hand, it has been proposed that *IL6* and *OSM*, which encodes



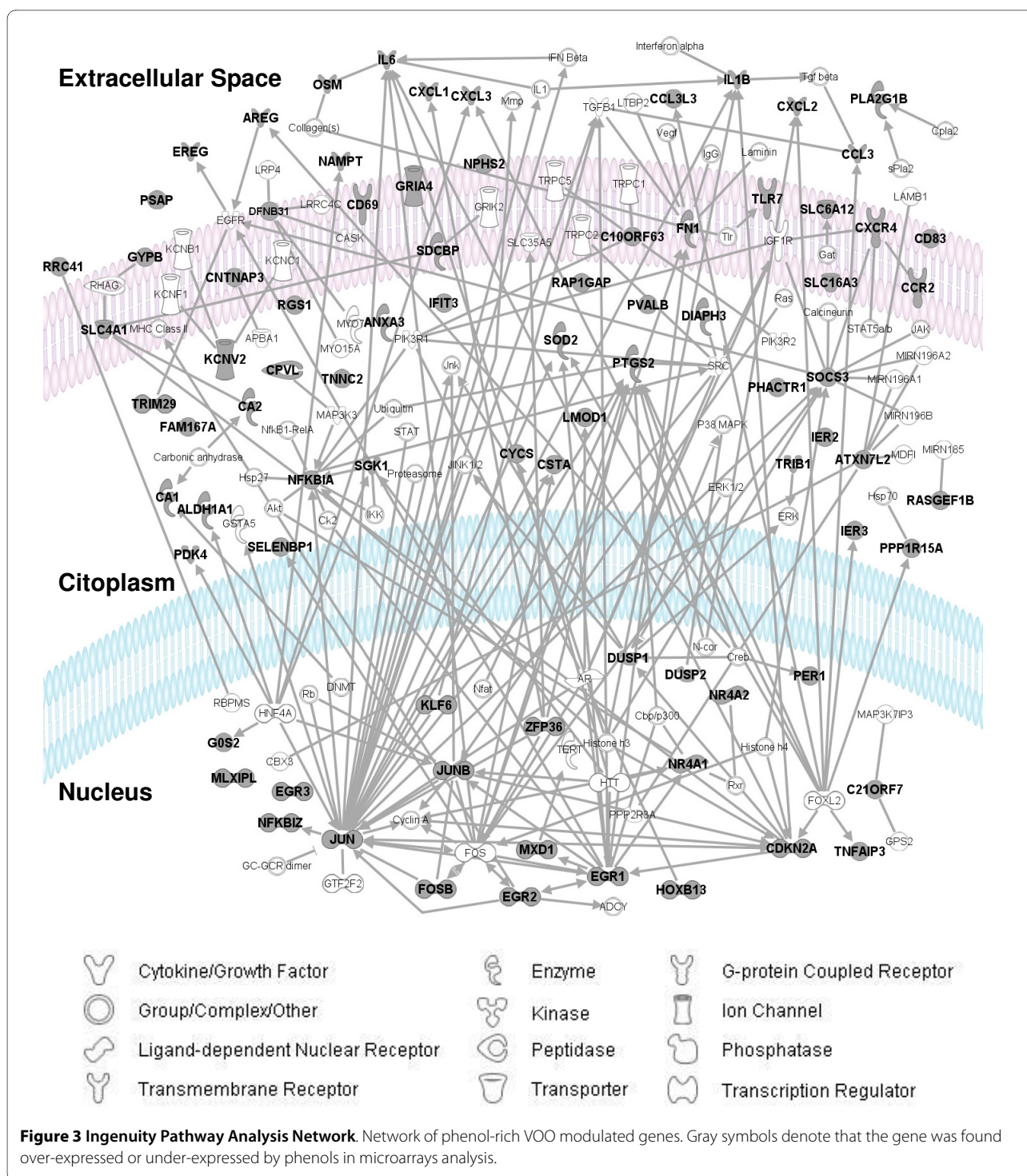
oncostatin M, a growth regulator and member of the *IL6* group of cytokines, can contribute to the increased cardiovascular risk in obese patients by up regulating PAI -1 in adipose tissue [32].

Activation of NF- κ B and MAPK pathway, a cascade of phosphorylation events that result in the activation of transcription factors like CREB and AP-1, synergize for expression of inflammatory genes through coordinate bindings of transcription factors to κ B and AP-1 sites which have been found together in the promoters of e.g. *IL6* and TNF- α , and many other inflammatory genes [33]. Chemokine repression found in our study could be consequence of phenols interaction with this inflammation signaling system, since expression of some genes involved in NF- κ B/MAPK/AP-1 signaling pathways was also modulated after phenol-rich olive oil based breakfast. NF- κ B is a transcription factor activated by pro-inflammatory cytokines [34] and oxidative stress mediators [35]. Recently Pierce et al. have demonstrated that NF- κ B activation is important in mediating vascular endothelial dysfunction in obese humans [36]. The product of *SGK1* gene, encoding a serum/glucocorticoid regulated kinase with a role in stress response and by itself being a downstream target for PI₃K signaling, enhances nuclear NF- κ B activity by phosphorylating an inhibitory kinase IKK α [37]; so repression on expression of *SGK1* gene by olive oil phenols would decrease the NF- κ B activation. In addition, *NFKBIA* gene, which encodes to I κ B α , a member of an inhibitory I κ B family that retains NF κ B into the cytoplasm, remained under-expressed after acute intake of phenol-rich olive oil. It has been reported that NF- κ B

binds to the I κ B α promoter in order to activate its transcription [38]. Thus, this negative feedback mechanism results in rapid cycles of inhibition and stimulation of NF- κ B where a decrease on NF- κ B activation is accompanied by a reduction on *NFKBIA* gene expression, as observed in our results. The hypothesis that NF- κ B activation is decreased by olive oil phenols is also supported by two *in vivo* studies which showed reduced NF- κ B activation after olive oil consumption [8,9]. Additionally, *in vitro* studies showing attenuated NF- κ B activation by resveratrol support the hypothesis that this pathway employs a shared mechanism by which polyphenols reduce expression of genes encoding inflammatory cytokines and adhesion molecules [39].

After intake of virgin olive oil with high content in phenolic compounds we found a decreased postprandial expression of *DUSP1* and *DUSP2*. Those genes encode dual serine-threonine phosphatases, which down regulate members of p38, MAPK/ERK and SAPK/JNK, the three final effectors of the MAPK pathway [33]. In addition, *TRIB1*, another gene repressed by phenol-rich olive oil, is involved in MAPK signaling, participating in the activation of ERK proteins [40] and being up regulated in human atherosclerotic plaques [41]. Thus, reduction of *TRIB1* expression by olive oil phenols could promote decreased ERK activation. This observation agrees with *in vitro* studies demonstrating that phenol compounds of green tea down regulate *PTGS2* expression by decreasing ERK and p38 MAPK activation [42]. Our results allow us to hypothesize that olive oil phenols influence activation of AP-1, which consists of a variety of heterodimers of Jun, Fos and activating transcription factor families [43], by means of two different mechanisms: a) one direct, involving repression of *JUN*, *JUNB* and *FOSB* as observed after phenol-rich olive oil intake; and/or b) another one indirect, through MAPK pathway, where the relative intensity and duration of activation determine the type of response.

Lastly, biomedical literature and text mining tasks were performed to identify interactions of differentially expressed genes in PBMCs as response to phenol-rich VOO with conditions clustered around MetS such as obesity, hypertension, dyslipemia, hyperglycemia, or T2DM. Recently, Chen et al. have described a macrophage-enriched gene network (MEGN) of ~1237 genes referred as having causal relationship with complex-disease traits associated with MetS [44]. Thirteen genes share our set of differentially expressed genes in PBMCs after acute intake of phenol-rich olive oil and MEGN: *JUN*, *RGS1*, *CXCL2*, *ANXA3*, *RASGEF1B*, *CD83*, *CA2*, *EGR2*, *DIAPH3*, *CCL3*, and *TLR7*, *PSAP* and *IFIT3*. De Mello et al. assessed individuals with both impaired glucose metabolism and MetS on how long-term weight loss affects expression of cytokines in PBMCs. Weight reduc-



tion resulted in a decrease in of *IL1B* expression [45]. Kaiser et al. showed by microarrays analysis in PBMCs a set of 22 over-expressed genes in T1DM and T2DM compared to healthy subjects [46]. Interestingly, 8 of the identified 22 over-expressed genes in T2DM were repressed by olive oil phenols, according to our intervention study

(*IL1B*, *EGR2*, *EGR3*, *PTGS2*, *FOSB*, *CXCL1*, *SGK*, and *TRIB1*). In addition, *PBEF1*, another gene involved in the pathogenesis of T2DM [47], was also found repressed after consumption of phenols-rich olive oil. Taken together, this finding could lead to potential therapeutic implications in T2DM.

Conclusions

Our study shows that intake of breakfast based in virgin olive oil being rich in phenol compounds is able to repress expression of several pro-inflammatory genes *in vivo*, thereby switching activity of PBMCs to a less deleterious inflammatory profile. These results provide at least a partial molecular basis for risk reduction of cardiovascular disease observed in Mediterranean countries, where VOO represents a main source of dietary fat. Admittedly, other lifestyle factors are also likely to contribute to lowered risk of CVD in this region. Nonetheless, our data suggest that mechanisms by which these micronutrients in phenol-rich olive oil would exert their anti-inflammatory effect could involve pathways related to NF- κ B/AP-1, cytokine-cytokine receptor interaction, arachidonic acid metabolism, and MAPK. These findings strengthen the relationship between inflammation, obesity and diet and provide evidence at transcription level of control of healthy effects derived from VOO consumption in humans. However, it would be interesting to evaluate whether these beneficial effects are maintained after prolonged feeding and if these effects are carried out by one or several olive oil phenolic compounds, or if they are consequence of a synergic effect of the total phenolic fraction.

Methods

Subjects

Twenty (56 years old; range, 40-70) subjects (9 men, 11 women) from the Lipids and Atherosclerosis Unit at Hospital Universitario Reina Sofía (Cordoba, Spain) participated in this study.

All subjects fulfilled three or more of the proposed criteria proposed by the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) for MetS: a) central obesity (waist circumference > 102 cm in men or > 88 cm in women); b) high blood pressure \geq 130/85 mmHg or documented use of antihypertensive therapy; c) high fasting glucose (\geq 100 mg.dL⁻¹); d) hypertriglyceridemia (\geq 150 mg.dL⁻¹), and e) low high density lipoprotein cholesterol (HDLc) (< 40 mg.dL⁻¹ for males or 50 mg.dL⁻¹ for females). Subjects had an average body mass index (BMI) of 38.98 (27.95-44.42) kg.m⁻², waist perimeter of 132.2 cm (103.0-137.0), systolic blood pressure of 146 \pm 19 mmHg, diastolic blood pressure of 89 \pm 10 mmHg, plasma glucose levels of 102.8 \pm 17.0 mg.dL⁻¹, plasma insulin levels of 11.5 \pm 6.5 mU.L⁻¹, total cholesterol (TC) plasma levels of 201.7 \pm 27.1 mg.dL⁻¹ triacylglyceride (TAG) plasma levels of 185 \pm 78 mg.mL⁻¹, low density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels of 120.3 \pm

19.7 mg.dL⁻¹ and high density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels of 50.7 \pm 11.8 mg.dL⁻¹. No subjects showed evidence of chronic diseases (hepatic, renal, thyroid, cardiac), smoking, alcohol consumption, or family history of cardiovascular disease of early onset, nor were they taking drugs. The Human Investigation Review Committee at Reina Sofia University Hospital approved this study. All participants gave informed consent before joining the study.

Study design and dietary intervention

Before the first breakfast intervention, participants followed a 6-week washout period in which they were instructed to not take vitamins, soy supplements, or any drug. To eliminate the potential effect that might exist in their usual dietary habits, all subjects followed a low-fat, carbohydrate rich (CHO) diet during this period through the end of the study. Compliance with the CHO diet was assessed after two and four weeks using a three-day recording and a food frequency questionnaire. 24 hours prior to each breakfast intervention, participants were instructed to avoid consuming phenol-rich foods such as fruit or juices, wine, grape juice, chocolate, coffee, tea, olive oil, or soy, and to refrain from intense physical exercise. After a 12-h fast and following a randomized sequential crossover design with one-week washout period, participants reported to the hospital and received two fat meals consisting of 60 grams of white bread, 40 mL of VOO (CANOLIVA[®], Antonio Cano e Hijos[™], Cordoba, Spain) with high (398 ppm) or low (70 ppm) content in phenolic compounds, and 60,000 IU of vitamin A per m² of body surface. Throughout the 4-hour duration of the study session, subjects performed no physical activity, nor did they consume anything but water.

Olive oil characteristics

Olive oil with low content in phenolic compounds was obtained by physical extraction of most phenolic compounds from the high-phenol olive oil, so that both oils retained a similar composition of the remaining macro- and micro-nutrients with the exception of phenolic content (70 ppm vs 398 ppm) (data not shown). Hydroxytyrosol content was 0.2 μ mol.g⁻¹ and 45.4 μ mol.g⁻¹, respectively in low-phenol and high-phenol olive oil. High-phenol olive oil was washed in separating funnels with the same volume of distilled water. This operation was repeated seven times at room temperature under reduced light to avoid oxidation. Fatty acid composition of oils was determined by gas chromatography in a Perkin-Elmer Autosystem (SGE Scientific, Australia) according to EU Regulation 2568/91 (CE, 1991). Tocopherol composition was analyzed by HPLC in a Perkin-Elmer HPLC, applying IUPAC method 2432 (IUPAC, 1992).

Sample collection

Venous blood samples were obtained at 0, 30, 60, 120 and 240 min after consumption of each breakfast. Samples from fasting and postprandial states were collected in tubes containing 1 g EDTA/L and stored in containers with iced water and kept in the dark. Special care was taken to avoid exposure to air, light, and ambient temperature. Plasma was separated from whole blood by low-speed centrifugation at $1500 \times g$ for 15 min at 4°C within the hour after extraction.

Lipid analysis and biochemical determinations

Lipid parameters were assessed with the modular autoanalyzer DDPII Hitachi (Roche, Basel, Switzerland), using specific reagents (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Determinations of TC and TAG levels were made by colorimetric enzymatic methods [48,49]; of HDLc by colorimetric assay [50]; of LDLc by the Friedewald formula based on CT, TAG, and HDLc values [51]. Plasma glucose concentrations were measured with a Hitachi 917 analyzer (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) by the glucose oxidase method (GOD-PAP). Plasma insulin concentrations were measured by microparticle enzyme immunoassay (Abbott Diagnostics, Matsudo-shi, Japan). Nonsterified fatty acid concentrations were measured by enzymatic colorimetric assay (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany).

Isolation of PBMCs

PBMCs were isolated within 2 hours after blood draw from 30 mL EDTA anticoagulated blood samples taken 4 hours after consumption of each olive oil-based breakfast. Buffy coats were diluted 1:2 in PBS, and cells were separated in 5 mL Ficoll gradient (lymphocyte isolation solution, Rafer) by centrifugation at $2000 \times g$ for 30 min. PBMCs were collected and washed twice with cold PBS. Harvested PBMCs were preserved in liquid nitrogen and stored at -80°C prior to RNA extraction.

RNA extraction and microarray samples preparation

Total RNA was extracted from mononuclear cells with TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) and purified with RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Recovered RNA was quantified using a Nanodrop ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (Nanodrop Technology, Cambridge, UK). RNA integrity was assessed using 1.6% agarose gel, $1 \times$ TBE. RNA was judged suitable for array hybridization only if samples exhibited intact bands corresponding to 18S and 28S ribosomal RNAs.

Microarray analysis design

Gene expression profiles were generated using the *4x44K* glass slide *Whole Human Genome Oligo Microarray*

G4112A (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Each microarray uses 45,220 probes to interrogate 30,886 unique human genes and transcripts. Two sets of dye-swapped experiments were performed to total four replicate hybridizations per subject (totals 80 microarray experiments). Each array compared total RNA from PBMCs obtained 4 hours after intake of virgin olive oil with high phenolic content with RNA obtained 4 hours after low-phenol virgin olive oil consumption.

Synthesis and labeling of cDNA

RNA samples were labeled using the *SuperScript Indirect RNA Amplification System* (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. To avoid confounding by extraneous factors, all experiments were performed in a single batch and processed by one researcher on the same day for each step. Dye incorporation rates were assessed with a Nanodrop[®] ND-1000 v3.5.2 spectrophotometer (Nanodrop Technology, Cambridge, UK) and found to be between 8 and 12 pmol. μL^{-1} .

Microarray hybridization and scan protocol

Differentially labeled aRNA samples were cohybridized on microarray slides. Hybridization was performed using the *Gene Expression Hybridization Kit* (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Microarray images of each slide were obtained with a Gene Pix 4000B scanner (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Image quantization was performed using Agilent Feature Extraction Software v9.5 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA).

Preprocessing and normalization of the microarray data

Background adjusted signals (BGSubSignal) were calculated by the Agilent Feature Extraction Software (v9.5) and filtered on the flag IsWellAboveBG. Log_2 dye swapped (red/green) mean-centered signal ratio data were normalized within-array and between-array by Lowess and quantile methods respectively, both implemented in the R Limma package (GLP).

Differential gene expression analysis

Identification of genes whose expression could be regulated by virgin olive oil phenols was done by comparing microarray results from PBMCs obtained at 4 hours after high and low phenol olive oil ingestion. Differential gene expression analysis was performed by fitting of gene-wise linear models to microarray data with R Limma package (GLP). For considering a gene as differentially expressed, filtering criteria were used combining M value (signal log_2 ratio) greater than 0.4 (over-expressed) or lower than -0.4 (under-expressed) (by 1.32 and -1.32-fold changes, respectively), and statistical significance (p) of the fitted linear model of ≤ 0.01 for every gene. Results were

adjusted by dye-swap effects and by False Discovery Rate (FDR) using Benjamini and Hochberg method.

MIAME Gene Expression Omnibus (GEO) database

Raw microarray data have been curated and accepted in GEO (a public repository for microarray data, aimed at storing MIAME (Minimum Information About Microarray Experiments) compliant data in accordance with MGED (Microarray Gene Expression Data) recommendations. Access to data concerning this study may be found under GEO experiment accession number GSE15812 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=pjihumyoyogmhy&acc=GSE15812>.

qRT-PCR analysis of differentially expressed genes

PCR analyses were performed using Mx3005 Thermocycler (Agilent Technologies, La Jolla, CA) and *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) commercial kit in a final volume of 20 μ l with 10 pmol of each primer. Each reaction was performed on 1 μ l of 1:5 (v/v) dilution of the first cDNA strand, synthesized using 1 μ g of total RNA by the commercial kit *iScript[®] cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. The reaction was incubated at 96°C for 3 min, followed by 40 cycles of 30 s at 96°C, 30 s at 62°C, 20 s at 72°C and 10 s at 80°C where fluorescence was measured to avoid primer-dimer and background signals. Primers used were: ERG1-Up (5'-CTACGAGCACCTGACCGCAGAG-3'), ERG1-Low (5'-CCAGG-GAAAAGCGGCCAGTATAG-3'), JUN-Up (5'-GACCTTCTATGACGATGCCCTCAA-3'), JUN-Low (5'-ACGTCGGGCGAGGTGAGGAGTC-3'), IL1B-Up (5'-GGGACAGGATATGGAGCAACAAGT-3'), IL1B-Low (5'-GCTTATCATCTTTCAACACGCAGGA-3'), PTGS2-Up (5'-ATGAGTTATGTCTTGACATCCAGATCAC-3'), PTGS2-Low (5'-CAAACATCATGTTTGAGC-CCTGG-3'), RPL13-Up (5'-CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA-3') and RPL13-Low (5'-TTGAGGACCTCTGTGTATTGTCAA-3'). Specificity of PCR amplifications was verified by a melting curve program (60-95°C with a heating rate of 0.5°C/s and a continuous fluorescence measurement) and analyzed by electrophoresis on a 1.6% agarose gel, TBE 1 \times . Primer efficiencies were: EGR1, 98%; PTGS2, 101%; IL1B, 96%; JUN, 108%; RPL13a, 95%. Expression values were obtained as relative expression of the target gene versus the constitutively expressed RPL13a gene (relative expression = $2^{-(Ct, \text{Target gene} - Ct, \text{Reference gene})}$).

Statistical analysis

Several variables were transformed to define the metabolic postprandial response after acute intake of both types of olive oil. Incremental area under plasma concen-

tration curve (iAUC) was calculated for all measured metabolic variables by the trapezoidal method. The normality of data was assessed using the Saphiro-Wilk test. Log transformation of data was performed when those variables were not normally distributed. Differences between iAUC after intake of high-phenol and low-phenol olive oils were analyzed using Wilcoxon-paired test.

For data analysis, gene expression data were presented in M-values [$\log_2(\text{ratio})$] expressing a fold change after high-phenol olive oil intake compared to low-phenol olive oil consumption. The corresponding *p*-value, B-value, and B-probability are shown (Additional File 1). The data input for correlation analysis using Spearman's test were the $\log_2(\text{ratio})$ value for microarrays (M-value) and qRT-PCR in subject individuals.

All data presented in the text and tables are expressed as mean \pm SD unless otherwise specified. Significance levels were set to *p*-values less than 0.01 for microarray data and less than 0.05 for all other analyses. All statistical tests were performed using R programming and statistical environment software (GLP).

Abbreviations used

ppm: part per million; MetS: metabolic syndrome; CVD: cardiovascular disease; VOO: virgin olive oil; MD: Mediterranean Diet; PBMC: peripheral blood; mononuclear cells; MEGN: macrophage-enriched gene network.

Additional material

Additional file 1 Description of differentially expressed genes in microarray analysis.

List of the differentially expressed genes identified by microarray analysis when comparing the intake of phenol-rich olive oil with low-phenol olive oil in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome.

Additional file 2 Description of differentially expressed genes in gender analysis.

List of the differentially expressed genes when comparing the intake of phenol-rich olive oil with low-phenol olive oil in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome in gender analysis.

Authors' contributions

AC and JR contributed equally to this work. AC, JR, JL-M, and FP-J: designed research; AC, JMF, and MU: provision of study materials and subjects; AC, JR, JMF, AJ, and MS-G: performed research; LDP and MU: contributed new reagents/analytic tools; AC, AJ, and MS-G: collection and assembly of data; AC, JR, JMF, LDP, CM, PP-M, JL-M, and FP-J: analyzed data; CM, PP-M, JL-M, and FP-J: provided statistical expertise; AC: wrote the paper; JR, LDP, MU, JL-M and FP-J: critical review of the manuscript; FP-J: obtained funding. None of the authors had any personal or financial conflicts of interest.

Acknowledgements

This work has been supported by Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (AGR 922 to FP-J), Ministerio de innovación, Ciencia y Empresa (SAF 2003-05770 to FP-J), Consejería de Salud, Junta de Andalucía (06/0129 to FP-J and 0040/07 to JR); Centro de Excelencia en Investigación sobre Aceite de Oliva y Salud (CEAS), Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Agencia para el Aceite de Oliva. We wish to thank the patients who participated in this study. The CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. We extend our thanks to Canoliva (Antonio Cano e Hijos SA, Luque, Córdoba), who generously donated the olive oil.

Author Details

¹Lipids and Atherosclerosis Research Unit. IMIBIC (Instituto Maimonides de Investigación Biomedica de Córdoba), Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Spain, ²Jean Mayer US Department of Agriculture Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, Massachusetts, USA, ³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain and ⁴IFAPA Centro Venta del Llano, Junta de Andalucía, P.O. Box 50, Mengíbar, Jaen E-23620, Spain

Received: 6 November 2009 Accepted: 20 April 2010

Published: 20 April 2010

References

- Phillips C, Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, McManus R, Roche HM: **Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome.** *Curr Opin Cardiol* 2006, **21**:185-193.
- Subramanian S, Chait A: **The effect of dietary cholesterol on macrophage accumulation in adipose tissue: implications for systemic inflammation and atherosclerosis.** *Curr Opin Lipidol* 2009, **20**:39-44.
- Parks EF: **Recent findings in the study of postprandial lipemia.** *Curr Atheroscler Rep* 2001, **3**:462-470.
- van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HW, De Jaegere PP, Cabezas MC: **Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers.** *Atherosclerosis* 2004, **177**:175-182.
- Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L, Barja G, Battino M, Blanco A, Bonanome A, Colomer R, Corella-Piquer D, Covas I, Chamorro-Quiros J, Escrich E, Gaforio JJ, Garcia Luna PP, Hidalgo L, Kafatos A, Kris-Etherton PM, Lairon D, Lamuela-Raventos R, Lopez-Miranda J, Lopez-Segura F, Martinez-Gonzalez MA, Mata P, Mataix J, Ordovas J, Osada J, Pacheco-Reyes R, Peruchio M, Pineda-Priego M, Quiles JL, Ramirez-Tortosa MC, Ruiz-Gutierrez V, Sanchez-Rovira P, Solfrizzi V, Soriquer-Escofet F, de la Torre-Fornell R, Trichopoulos A, Villalba-Montoro JM, Villar-Ortiz JR, Visioli F: **International conference on the healthy effect of virgin olive oil.** *Eur J Clin Invest* 2005, **35**:421-424.
- Mena MP, Sacanella E, Vazquez-Agell M, Morales M, Fitó M, Escoda R, Serrano-Martínez M, Salas-Salvado J, Benages N, Casas R, Lamuela-Raventós RM, Masanes F, Ros E, Estruch R: **Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular anti-inflammatory effect of the Mediterranean diet.** *Am J Clin Nutr* 2009, **89**:248-256.
- Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F: **Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil.** *Atherosclerosis* 2007, **190**:181-186.
- Perez-Martínez P, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio L, Bellido C, Jimenez Y, Moreno JA, Delgado-Lista J, Egido J, Perez-Jimenez P: **The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men.** *Atherosclerosis* 2007, **194**:141-146.
- Bellido C, Lopez-Miranda J, Blanco-Colio LM, Pérez-Martínez P, Suriana FJ, Martín-Ventura JL, Marin C, Gómez P, Fuentes F, Egido J, Perez-Jimenez F: **Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men.** *Am J Clin Nutr* 2004, **80**:1487-1491.
- Meydani M: **A Mediterranean-style diet and metabolic syndrome.** *Nutr Rev* 2005, **63**:312-314.
- Esposito K, Marfella R, Ciotola M, Di Palo C, Giugliano F, Giugliano G, D'Armiento M, D'Andrea F, Giugliano D: **Effect of a mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome: a randomized trial.** *JAMA* 2004, **292**:1440-1446.
- Perez-Jimenez F, Ruano J, Perez-Martínez P, Lopez-Segura F, Lopez-Miranda J: **The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone.** *Mol Nutr Food Res* 2007, **51**:1199-1208.
- Covas MI, Nyssonson K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R, Mursu J, Baumler H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J, Marrugat J, EUROLIVE Study Group: **The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial.** *Ann Intern Med* 2006, **145**:333-341.
- Ruano J, Lopez-Miranda J, de la Torre R, Delgado-Lista J, Fernandez J, Caballero J, Covas MI, Jiménez Y, Perez-Martínez P, Marin C, Fuentes F, Perez-Jimenez F: **Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients.** *Am J Clin Nutr* 2007, **86**:341-346.
- Ruano J, Lopez-Miranda J, Fuentes F, Moreno JA, Bellido C, Perez-Martínez P, Lozano A, Gomez P, Jiménez Y, Perez-Jimenez F: **Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients.** *J Am Coll Cardiol* 2005, **46**:1864-1868.
- Acin S, Navarro MA, Arbones-Mainar JM, Guillen N, Sarria AJ, Carnicer R, Surra JC, Orman I, Segovia JC, de la Torre R, Covas MA, Fernandez-Bolanos J, Ruiz-Gutierrez V, Osada J: **Hydroxytyrosol Administration Enhances Atherosclerotic Lesion Development in Apo E Deficient Mice.** *J Biochem* 2006, **140**:383-391.
- Khymenets O, Fitó M, Covas MI, Farré M, Pujadas MA, Muñoz D, Konstantinidou V, de la Torre R: **Mononuclear cell transcriptome response after sustained virgin olive oil consumption in humans: an exploratory nutrigenomics study.** *OMICS* 2009, **13**:7-19.
- Oliveras-López MJ, Berná G, Carneiro EM, López-García de la Serrana H, Martín F, López MC: **An extra virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effect in OF1 mice.** *J Nutr* 2008, **138**:1074-1078.
- Eletto D, Leone A, Bifulco M, Tecce MF: **Effect of unsaturated fat intake from Mediterranean diet in rat liver mRNA expression profile: selective modulation of genes involved in lipid metabolism.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005, **15**:13-23.
- Deng X, Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Park EA, Raghov R, Patel D, Kumar P, Sheybani A, Russell JC: **Dietary olive oil and menhaden oil mitigate induction of lipogenesis in hyperinsulinemic corpulent JCR:LA-cp rats: microarray analysis of lipid-related gene expression.** *Endocrinology* 2004, **145**:5847-5861.
- Acin S, Navarro MA, Perona JS, Surra JC, Guillen N, Arnal C, Sarria AJ, Arbones-Mainar JM, Carnicer R, Ruiz-Gutiérrez V, Osada J: **Microarray analysis of hepatic genes differentially expressed in the presence of the unsaponifiable fraction of olive oil in apolipoprotein E-deficient mice.** *Br J Nutr* 2007, **97**:628-638.
- Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HW, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF: **A networkbased analysis of systemic inflammation in humans.** *Nature* 2005, **437**:1032-1037.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N: **C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women.** *Circulation* 2003, **107**:391-7.
- Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D: **Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year.** *Circulation* 2002, **105**:804-809.
- Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE: **Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction.** *J Am Coll Cardiol* 1994, **24**:1468-1474.
- FitzGerald GA: **COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**:879-890.
- de la Puerta R, Marquez-Martin A, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V: **Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages.** *Nutrition* 2009, **25**:548-554.
- Zhang X, Cao J, Zhong L: **Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells.** *Nuynyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009, **379**:581-586.
- Sommer G, Kralisch S, Stangl V, Vietzke A, Köhler U, Stepan H, Faber R, Schubert A, Lössner U, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M: **Secretory products from human adipocytes stimulate proinflammatory cytokine secretion from human endothelial cells.** *J Cell Biochem* 2009, **106**:729-737.
- Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R: **Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding.** *J Lipid Res* 2008, **49**:1894-1803.
- Stephens JW, Hurel SJ, Lowe GD, Rumley A, Humphries SE: **Association between plasma IL-6, the IL6 -174G>C gene variant and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus.** *Mol Genet Metab* 2007, **90**:422-428.
- Rega G, Kaun C, Demyanets S, Pfaffenberger S, Rychli K, Hohensinner PJ, Kastl SP, Speidl WS, Weiss TW, Breuss JM, Furnkranz A, Uhrin P, Zaujec J,

- Zilberfarb V, Frey M, Roehle R, Maurer G, Huber K, Wojta J: **Inflammatory Cytokines Interleukin-6 and Oncostatin M Induce Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human Adipose Tissue.** *Circulation* 2005, **111**:1938-1945.
33. Lang R, Hammer M, Mages M: **Dusp meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response.** *The Journal of Immunology* 2006, **177**:7497-7404.
34. Wheeler DS, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong HR: **Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells.** *J Nutr* 2004, **134**:1039-1044.
35. Biesalski HK: **Polyphenols and inflammation: basic interactions.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007, **10**:724-728.
36. Pierce GL, Lesniewski LA, Lawson BR, Beske SD, Seals DR: **Nuclear factor-(kappa)B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans.** *Circulation* 2009, **119**:1284-1292.
37. Tai DJ, Su CC, Ma YL, Lee EH: **SGK1 phosphorylation of IKKalpha and p300 upregulates NF-kappa B activity and increases N-Methyl-D-aspartate receptor NR2A and NR2B expression.** *J Biol Chem* 2009, **284**:4073-4089.
38. Ghanim H, Aljada A, Hofmeyer D, Syed T, Mohanty P, Dandona P: **Circulating Mononuclear Cells in the Obese Are in a Proinflammatory State.** *Circulation* 2004, **110**:1564-1571.
39. Zern TL, Fernandez ML: **Cardioprotective effects of dietary polyphenols.** *J Nutr* 2005, **135**:2291-2294.
40. Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, Miyata S, Nakamura T: **Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis.** *Blood* 2007, **109**:3998-3405.
41. Deng X, Elam MB, Wilcox HG, Cagen LM, Park EA, Raghov R, Patel D, Kumar P, Sheyban A, Russell JC: **Human tribbles homologue 2 is expressed in unstable regions of carotid plaques and regulates macrophage IL-10 in vitro.** *Clin Sci London* 2009, **116**:241-248.
42. Kundu JK, Na HK, Chun KS, Kim YK, Lee SJ, Lee OS, Sim YC, Surh YJ: **Inhibition of phorbol ester-induced COX-2 expression by epigallocatechin gallate in mouse skin and cultured human mammary epithelial cells.** *J Nutr* 2003, **133**:3805S-3810S.
43. Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF: **Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:201.
44. Chen Y, Schadt EE: **Variations in DNA elucidate molecular networks that cause disease.** *Nature* 2008, **452**:429-435.
45. de Mello VD, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa R, Uusitupa M: **Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome.** *Metabolism* 2008, **57**:192-199.
46. Kaizer EC, Glaser CL, Chaussabel D, Banchereau J, Pascual V, White PC: **Gene expression in peripheral blood mononuclear cells from children with diabetes.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**:3705-3711.
47. Chen MP, Chung FM, Chang DM, Tsai JC, Huang HF, Shin SJ, Lee YJ: **Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:295-299.
48. Allain CC, Poon LS, Chang CSG, Richmond W, Fu PC: **Enzymatic determination of total serum cholesterol.** *Clin Chem* 1974, **20**:470-475.
49. Bucolo G, David H: **Quantitative determination of serum triacylglycerols by the use of enzymes.** *Clin Chem* 1973, **19**:476-482.
50. Briggs CJ, Anderson D, Johnson P, Deegan T: **Evaluation of the polyethylene glycol precipitation method for the estimation of high-density lipoprotein cholesterol.** *Ann Clin Biochem* 1981, **18**:177-181.
51. Friedewald WT, Levy RI, Fredrikson DS: **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of a preparative ultracentrifuge.** *Clin Chem* 1972, **18**:499-502.

doi: 10.1186/1471-2164-11-253

Cite this article as: Camargo et al., Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil *BMC Genomics* 2010, **11**:253

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





SÍNDROME METABÓLICO Y ACEITE DE OLIVA



ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA

**INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO Glu/Asp EN EL GEN DE LA
ÓXIDO NÍTRICO SINTASA Y LA INGESTA DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN
EN PERSONAS CON RIESGO CARDIOVASCULAR**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO

TITULO DEL PROYECTO DE INVESTIGACION: INTERACCIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO Glu/Asp EN EL GEN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA Y LA INGESTA DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EN PERSONAS CON RIESGO CARDIOVASCULAR

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación en el que se analizará la forma en que la toma de tres aceites de oliva con diferente composición en compuestos fenólicos modifican la función del endotelio de las arterias en personas que, como usted, tiene síndrome metabólico.

Debe decidir si desea tomar parte en él. Tómese el tiempo necesario para decidir. Lea atentamente lo que sigue y formule al médico del estudio todas las dudas que tenga. El estudio es llevado a cabo por miembros de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

¿Por qué se realiza este estudio?

La obesidad, el exceso de peso y la diabetes tipo 2 están aumentando en todas las regiones de Europa. Antes de 2010, casi 31 millones de personas en nuestro continente requerirán tratamiento para la diabetes y sus complicaciones relacionadas. La diabetes y el síndrome metabólico son enfermedades de mayor frecuencia en personas en edad media y avanzada, y en todas los países europeos, la proporción de la población mayor y económico-dependiente está aumentando, con las predicciones de que antes de 2030, cerca del 30% de europeos serán personas de edad mayor a 60 años.

El síndrome metabólico es una enfermedad caracterizada por una disminución de la sensibilidad de los tejidos a la acción de la insulina, junto a la existencia de anormalidades de los lípidos de la sangre, obesidad abdominal e hipertensión arterial. El síndrome afecta una proporción substancial de las poblaciones de edad media o avanzada de los países europeos y confiere un

riesgo perceptiblemente mayor de enfermedad cardiovascular así como de enfermedades relacionadas.

El propósito de este estudio es el de investigar la relación entre la diferente composición en compuestos fenólicos (unas sustancia antioxidantes que se encuentran de forma natural tanto en la aceituna como en el aceite de oliva virgen) y las alteraciones metabólicas, inflamatorias y de la coagulación que se relacionan con el síndrome metabólico. De este modo, se pretende investigar si la dieta puede mejorar el control de la enfermedad.

Objetivos:

- Mejorar nuestro conocimiento acerca de la influencia de la composición en compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen consumido con el síndrome metabólico a nivel clínico, celular y genómico.
- Establecer los determinantes genéticos que regulan la respuesta vascular que llevan a una mejor respuesta a la variación del tipo de aceite de oliva en personas con síndrome metabólico.

¿Por qué se me pide que participe en este estudio?

Se le ha pedido que participe en el estudio y que done muestras de su sangre para analizar su ADN, los lípidos y otros componentes de la sangre. La información que se obtenga será utilizada para investigar que relación existe entre los genes y los componentes de la sangre y los compuestos fenólicos con el desarrollo y el tratamiento del síndrome metabólico. Su autorización para donar estas muestras de sangre es opcional y depende por entero de usted. Tanto si decide donarlas como si decide no hacerlo, recibirá el mismo trato médico. Si decide no donar la muestra o sí retira su consentimiento, no perderá ninguno de los beneficios, el tratamiento médico ni los derechos que le correspondan. El investigador no desea identificarle en relación con esta investigación y utilizará procedimientos diseñados para impedir que los resultados de la misma sean relacionados con usted.

¿En qué consistirá mi participación?

Tras ser seleccionado, usted recibirá una alimentación control durante seis semanas, para unificar el tipo de alimentación inicial de todos los participantes en el estudio. Después de esto, se le realizará un estudio basal

para determinar su situación con respecto a los lípidos y otros factores que influyen en el síndrome metabólico. Para ello, se le extraerán medidas repetidas de sangre durante una jornada, de forma que se sepa como se comporta su organismo a lo largo del día. Así, tras 12 horas de ayunas, le administrará en el tiempo 0 un desayuno y se le realizarán extracciones de 20 mililitros de sangre venosa en ayunas y a los 0, 30, 60, 120, 240 y 360 minutos tras la administración de dicha comida. También se realizará un estudio de función endotelial con un aparato láser Doppler y se le recogerá la orina de esas 24 horas. Este procedimiento se repetirá otros dos días más con otros tipos de aceite.

¿Qué efectos adversos (malos) pueden derivarse de mi donación de las muestras de sangre o de orina?

Debe saber que se utilizará una aguja para extraerle sangre y para el test de resistencia a la insulina. La mayoría de los donantes experimenta un ligero dolor en el punto de inserción de la aguja y algunos pueden desarrollar un hematoma.

Los procedimientos han sido diseñados para que sea muy difícil relacionarle a usted con los resultados de la investigación genética. No obstante, existe siempre una remota posibilidad de que la información sobre su participación en este estudio sea conocida.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (nombre y apellidos) _____

He leído y entendido la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio.

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha:
(A completar por el paciente)

Firma del Participante.

Fecha:

Firma de la persona que llevó la discusión del
Consentimiento informado.

Fecha:

Firma del investigador*

- En caso de que sea la misma persona que llevó la discusión del consentimiento informado, debe firmar también en este apartado.

CONSENTIMIENTO DEL REPRESENTANTE

Yo (nombre y apellidos) _____

En calidad de (relación con el participante): _____ de (nombre del participante): _____

He leído y entendido la hoja de información que se me ha entregado.
He podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado.
He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas.
He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con (nombre del Investigador) _____

Comprendo que la participación es voluntaria,
Comprendo que puede retirarse del estudio.:
1º Cuando quiera.
2º Sin tener que dar explicaciones.
3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

En mi presencia se ha dado a _____ toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento y está de acuerdo en participar.

Y presto mi conformidad con que _____ participe en este estudio.

Fecha:
Firma del representante.
(a completar por el representante).

Fecha: _____ Firma de la persona que llevó la discusión del Consentimiento informado.

Fecha: _____ Firma del Investigador*

*En caso de que sea la misma persona que llevó la discusión del consentimiento informado, debe firmar también en este apartado.

CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

Yo (nombre y apellidos) _____

Declaro bajo mi responsabilidad que _____

Ha recibido y entendido la hoja de información sobre el estudio.
Ha podido hacer preguntas sobre el estudio y se han contestado,
Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
Ha sido informado por _____

Comprende que su participación es voluntaria.

Comprende que puede retirarse del estudio:

- 1º Cuando quiera.
- 2º Sin tener que dar explicaciones.
- 3º Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Y ha expresado libremente su conformidad para participar en el estudio.

Fecha:
(A completar por el Testigo)

Firma del Testigo Imparcial.

Fecha:
(A completar por el paciente)

Firma (o marca o huella digital)
del paciente:

Fecha:

Firma de la persona que llevó la discusión del
consentimiento informado.

Fecha:

Firma del Investigador*

- En caso de que sea la misma persona que llevó la discusión del consentimiento informado, debe firmar también en este apartado.