

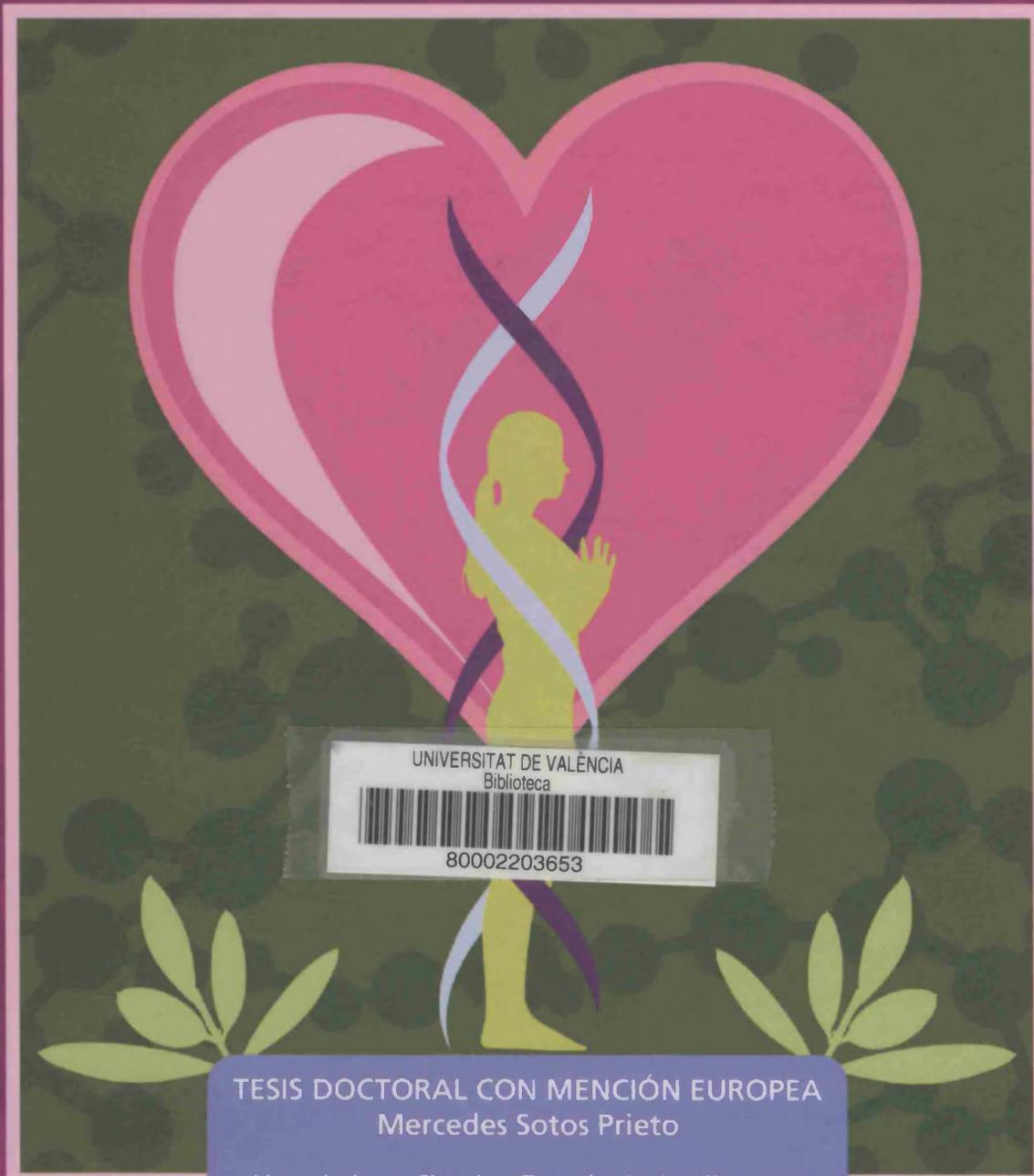


VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia
Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,
Ciències de l' Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal

GENÓMICA NUTRICIONAL EN LA PREVENCIÓN DE LA OBESIDAD Y FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

ESTUDIO DE INTERACCIONES GEN-AMBIENTE SOBRE FENOTIPOS INTERMEDIOS EN POBLACIÓN ESPAÑOLA



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Biblioteca



80002203653

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA
Mercedes Sotos Prieto

Licenciada en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Diplomada en Nutrición Humana y Dietética
Valencia, 2012

UMI Number: U607615

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607615

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

BID. T 7851

Acta de lectura de tesi doctoral

(Art. 21 del RD 1393/2007)

ESTUDIANT/A

Nom i cognoms: Mercedes Sotos Prieto

Núm. de registre: 5786

Títol del treball: Genómica nutricional en la prevención de la obesidad y factores de riesgo cardiovascular. Estudio de interacciones gen-ambiente sobre fenotipos intermedios en población española.

Departament/Institut: Medicina Preventiva i Salut Pública.

Director/a: Dolores Corella Piquer

Francesc Francés Bozal

TRIBUNAL

President/a: Rose Ignacio González Arriaz

1r. Vocal: Oscar Cottell Simó

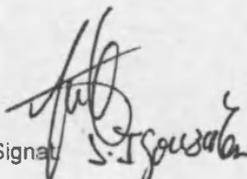
2n. Vocal: Sergio Rodríguez-Cuenca

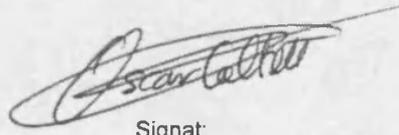
3r. Vocal: Dídac Velez Palacios

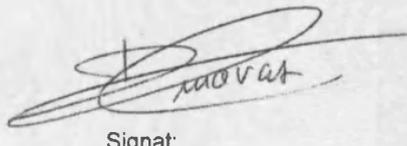
Secretari/a: Maria Luisa Guillén Domínguez

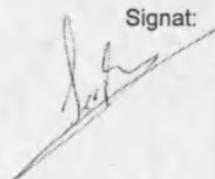
QUALIFICACIÓ: EXCEL LENT CUM LAUDE

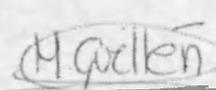
València, 30 d Març de 2012

Signat: 

Signat: 

Signat: 

Signat: 

Signat: 

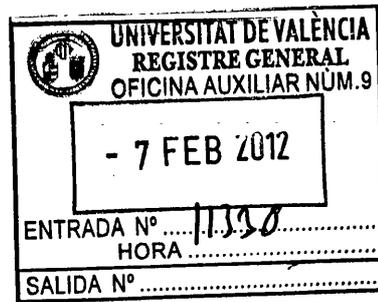
Art. 21.7 - Les qualificacions que es poden atorgar són: "NO APTA", "APROVAT", "NOTABLE", "EXCEL LENT", i "EXCEL LENT CUM LAUDE". (En cap cas s'hi farà servir la fórmula "per unanimitat").

COMISSIÓ DE DOCTORAT

b 22007295

i 23276162

BID. T 7851



Universitat de València (Estudi General)

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de
l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal

Genómica nutricional en la prevención de la obesidad y factores de riesgo cardiovascular. Estudio de interacciones gen-ambiente sobre fenotipos intermedios en población española.

Tesis doctoral con mención europea presentada por:

Mercedes Sotos Prieto

Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Diplomada en Nutrición Humana y Dietética

Para la obtención del Grado de Doctora con mención europea por la Universitat de València

Valencia, 2012

Dirigida por los profesores:

Dolores Corella Pirquer

Francesc Francés Bozal



Universitat de València (Estudi General)

Dolores Corella Piquer, Catedrática de Universidad del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral con el título: **“Genómica nutricional en la prevención y tratamiento de la obesidad y de las enfermedades cardiovasculares: Estudio de interacciones gen-ambiente sobre fenotipos intermedios en población española”**, ha sido realizada por Mercedes Sotos Prieto, bajo mi dirección, y reúne los méritos suficientes para que su autora obtenga el título de Doctora con la mención europea (“Doctor europeus”) por la Universitat de València.

Y para que así conste, firma el presente certificado en;

Valencia, a 5 de diciembre de 2011

Dolores Corella Piquer



Universitat de València (Estudi General)

Francesc Frances Bozal, Profesor Contratado Doctor del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal. Universitat de València.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral con el título: **“Genómica nutricional en la prevención y tratamiento de la obesidad y de las enfermedades cardiovasculares: Estudio de interacciones gen-ambiente sobre fenotipos intermedios en población española”**, ha sido realizada por Mercedes Sotos Prieto, bajo mi dirección, y reúne los méritos suficientes para que su autora obtenga el título de Doctora con la mención europea (“Doctor europeus”) por la Universitat de València.

Y para que así conste, firma el presente certificado en;

Valencia, a 5 de diciembre de 2011

Francesc Frances Bozal.

Esta tesis doctoral con mención europea se ha realizado durante el disfrute de las siguientes becas:

Beca predoctoral V Segles. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 16 Abril- 16 Julio de 2008

Beca predoctoral Formador Personal Universitario (FPU), (AP2007-04663) Ministerio de Educación y Ciencia. Unidad de Epidemiología Genética y Molecular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. 16 Julio 2008- 16 Abril 2012

De acuerdo con la normativa para el doctorado europeo (BOE num. 260 Martes 30 octubre 2007) la presente tesis cumple todos los criterios para la **MENCIÓN EUROPEA (“Doctor europeus”)**. Entre los requisitos, durante el periodo de formación y gracias a las ayudas obtenidas dentro del Programa FPU, Mercedes Sotos ha realizado estancias de investigación en Instituciones de Estados miembros de la Unión Europea por un periodo superior a tres meses.

- University College of London (UCL), Centro de Genética Cardiovascular. Londres, 2009
Duración: 2 meses (1 Julio 2009 al 31 Agosto 2009)
Responsable de la estancia: Professor Philippa Talmud
- Medical Research Council, Epidemiology Unit, Cambridge, 2011
Duración: 2 meses (1 Septiembre 2011 al 31 de Octubre 2011)
Responsable de la estancia: Professor Nick Wareham and Nita Forouhi

Otras estancias INTERNACIONALES:

- Harvard School of Public Health, Department of Nutrition. Boston, MA, 2010.
Duración: 3 meses (1 Agosto 2010 al 30 Octubre 2010)
Responsable de la estancia: Professor Frank Hu

Dedicatoria

A mis padres, el mejor ejemplo de vida que podré tener. Quienes me han enseñado aquellas cosas que son imposibles de estudiar y me han dado todas las oportunidades que ellos no pudieron disponer. Quienes han depositado su confianza ciega y su apoyo incondicional en cada reto que se me presenta. Sin los valores que me han transmitido no sería quien soy lo que soy ahora, un buen símil de interacción gen-ambiente. Sin duda, esta tesis y todos los retos conseguidos son el vivo reflejo de sus almas.
Ojalá y todos los hijos pudieran ser tan afortunados como yo.

A la primera letra del abecedario que tanta preocupación me supuso para que quedara perfecta cuando aprendí a escribir. Ahora entiendo por qué. A mis hermanos.
Ángel, por mostrarme su disposición, entrega y empatía en cada paso de mi vida personal y profesional. Por tener el don de hacer la vida mas sencilla a los demás.
Aurori, quien me ha demostrado a lo largo de estos años que su presencia es siempre visible y destacada en los momentos difíciles y de necesidad.

A Joaquín, quien ha recorrido este largo y corto camino de mi vida a mi lado y me ha ayudado a escribir las páginas de mi libro mágico. Gracias por aportarme la coherencia y la tranquilidad en los momentos más álgidos de esta andadura y no dejar que venza el aura negativa del ambiente. Por la complicidad y por enseñarme que “no importa lo que pasará mañana porque siempre habremos tenido hoy”.

Agradecimientos

Llegado este momento, cierro los ojos y se me pasan tantas cosas por la imaginación, tantos momentos, detalles, personas, situaciones, hechos, conversaciones, sueños, viajes que se atropellan unos a otros para querer salir y poder ser puestos de manifiesto en estas bonitas líneas de mi tesis. Sin embargo, no se si podré expresar y recordar todo lo que siento, asique pido perdón si algo que debería figurar no figura entre los agradecimientos.

Deseo agradecer la colaboración de mis directores de tesis por haber aceptado dirigirla. A Dolores Corella, porque me ha ayudado a saber qué es lo que quiero para mi vida y así poder tomar decisiones. A Francesc, que me dio cobijo, apoyo y comprensión desde el minuto cero.

A mis “supervisors” de mis estancias en el extranjero. A Philippa Talmud (UCL, Londres), quien me mostró que mi concepción y visión de la ciencia era válida. A Frank Hu (HSPH, Boston) un ejemplo de líder visionario, gracias por darme la oportunidad de aprender en una gran escuela y con una gran compañía. A Nita Forouhi y Nick Wareham (MRC, Cambridge), quienes me concedieron la oportunidad de tener una de las mejores experiencias en todos los sentidos. A todos ellos, gracias por no dejar dormido mi espíritu de progreso y las ganas de aprender, por ser hoy, una persona con una visión más amplia de la vida y por prestarme, desde entonces, su ayuda cuando la necesito.

Quería expresar mi profundo agradecimiento a VIC, pareja de FAM y no tiene nada que ver con las sondas taqman. Rima con confidente, y se llama Vicente. Sí, a Vicente, tu presencia en el laboratorio ha sido determinante en el camino de mi tesis. No puedo expresar mi gratitud por el gran apoyo que has supuesto para mí en todos los sentidos. Gracias. Me llevo una gran amistad y una gran dosis de optimismo.

A Pin y Pon, Eva y Laura o viceversa, si lo tuviera claro no sería yo. Por *las horas*, los buenos momentos que hemos pasado juntas y todas las actividades extra e intra-laboratorio que hemos vivido. Os deseo mucha suerte para el futuro.

A Marisa por tener los pies en la tierra en cada momento, por su gran inteligencia, por estar dispuesta siempre a enseñarme y responder mis dudas. Por compartir conmigo una forma de pensar y hacer así que todo sea más sencillo, cómodo, organizado y productivo. Gracias.

A Olga, por su sentido del humor y las conversaciones mantenidas en momentos especiales. A Gema, por su gran ojo clínico que tanta claridad nos ha

aportado. A Paco, por su saber estar y por tener siempre la solución a las cuestiones que tanto nos apuran, las “informáticas”. A mis compañeros de laboratorio y a Toni, Sorli, Carmen, Pepe. A Maribel, que se ha preocupado por mí cuando tan tarde se me hacía en el laboratorio y me ha prestado su ayuda incondicional.

A mis amigas de la carrera que hemos crecido juntas y a día de hoy seguimos compartiendo nuestro gran espíritu por el conocimiento, la pasión por la ciencia y el avance de nuestra profesión. A Laura y Ana, quienes han sabido comprender mi dedicación y la importancia que concedo a las cosas. Por estar presentes en todos mis logros, compartir conmigo las alegrías y por ayudarme a llevar las desavenencias con elegancia. Sois para mí algo más que amigas.

A mis amigos del pueblo con los que he pasado todas las etapas de mi vida. Ahora somos un gran equipo multidisciplinar y hemos demostrado con la “suficiente evidencia científica” que los niños de pequeños pueblos pueden tener un gran futuro. Gracias por implicaros como participantes y prestarme vuestra colaboración en el estudio INDIMED, fue hasta divertido. Gracias también por soportar mis interminables charlas sobre nutrición y genes, aun cuando la mayoría no tenéis nada que ver con este tema. Gracias por respetar (comprender, quizás es demasiado) mis largas ausencias cuando estaba involucrada con el estudio y la tesis (casi el 99 % de las veces: “tengo cosas que hacer”). Y sobre todo, gracias por las horchatas y los cafés, que nos han aportado conversaciones cargadas de dosis de antioxidantes.

A los jóvenes líderes iberoamericanos y a los líderes europeos en nutrición. Ambas experiencias me han hecho cuestionarme muchas cosas de mi vida con un propósito siempre constructivo que me han ayudado a sobrellevar incertidumbres durante estos cuatro años que podrían cambiar el rumbo de mi vida. A Loli, que a pesar de no estar cerca, me ha mostrado su calor en todos estos años de tesis. Gracias por hacerme reír hasta llorar y llorar conmigo.

A mis compañeros de las estancias en el extranjero que me hicieron sentir como en casa desde el primer día.

A mi familia, que durante esta tesis me han mostrado su apoyo más que nunca y me han hecho sentirme arropada aun sin entender a veces la historia completa. A mi abuela Elena, quien me demuestra cada día que con esfuerzo y trabajo todo es posible, quien se desvive en cuerpo y alma por nosotros. A mis tías. A mi tía Paqui que me ha cuidado y me cuida, es el mejor ejemplo de que el ambiente puede modificar nuestra genética. Estoy muy orgullosa de ti. A mi tía Ita, que me ha acompañado durante este largo recorrido, incluso nos hemos animado a correr para ver si acabábamos antes...A mis abuelos, Aurora y Sebas con mentes maravillosas, que se emocionan conmigo y yo con ellos. Gracias.

A todos los participantes y personas que trabajan en el PREDIMED porque sin su colaboración no hubiera sido posible llevar a cabo dicho estudio. También me gustaría agradecer muy especialmente a todos los participantes del INDIMED, sobre todo a la gran movilización por parte de Casas-Ibáñez, por creer en mí y participar en dicho estudio dándome la oportunidad de hacer ciencia.

Al CIBERobn por financiar los proyectos en los cuales se ha llevado a cabo esta tesis. La inversión en investigación es fundamental para el desarrollo de un país. A la beca FPU, Ministerio de Educación y Ciencia que me ha dado la oportunidad de aprender y me ha permitido desarrollar esta tesis durante cuatro años e iniciarme en el bonito campo de la docencia e investigación.

Por último, no quiero olvidarme de todas y cada una de las personas que han pasado y coincidido conmigo por mi tránsito en este Departamento. Gracias, porque sin duda, me han hecho crecer como persona y han representado un motor para plantearme el camino de mi vida haciendo florecer de nuevo mis ambiciones. Hoy soy una persona más fuerte y estoy feliz.

Las horas...

"(...) Muere lentamente quien no voltea la mesa cuando está infeliz en el trabajo, quien no arriesga lo cierto por lo incierto para ir detrás de un sueño, quien no se permite por lo menos una vez en la vida, huir de los consejos sensatos (...).

Pablo Neruda

ÍNDICE

TERMINOLOGÍA	21
SUMMARY/RESUMEN.....	25
1. INTRODUCCIÓN	35
1.1 OBESIDAD Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. PANORÁMICA ACTUAL Y REPERCUSIÓN SOBRE LA SALUD	35
1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD.....	35
1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES ..	39
1.1.3. OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS. IMPLICACIONES EN LA SALUD CARDIOVASCULAR	42
1.1.4. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. IMPORTANCIA DEL METABOLISMO LIPÍDICO Y LAS CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS	47
1.2. FACTORES AMBIENTALES DE LA OBESIDAD Y ECV	51
1.2.1. DIETA	51
1.2.2. ACTIVIDAD FÍSICA	53
1.2.3 OTROS FACTORES	55
1.3. FACTORES GENÉTICOS DE LA OBESIDAD Y ECV	57
1.3.1. FACTORES GENÉTICOS DE LA OBESIDAD	57
1.3.2. FACTORES GENÉTICOS DE LAS ECV. METABOLISMO LIPÍDICO	69
1.4. LA DIETA MEDITERRÁNEA	78
1.4.1. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN ENTRE LA DIETA MEDITERRÁNEA Y LOS FENOTIPOS INTERMEDIOS Y FINALES DE ECV	79
1.5 LA GENÓMICA NUTRICIONAL EN LA ERA ACTUAL	82
1.5.1 NUTRIGENÉTICA EN LA OBESIDAD Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: DIETA MEDITERRÁNEA Y GENES.....	84
1.5.2 NUTRIGENÓMICA EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: DIETA MEDITERRÁNEA Y EXPRESIÓN GENÉTICA.....	89

1.5.3 INCONVENIENTES METODOLÓGICOS DE LOS ESTUDIOS DE GENÓMICA NUTRICIONAL.....	90
1.6 GENÉTICA DEL SABOR. PREFERENCIAS ALIMENTARIAS.....	92
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	101
2.1 HIPÓTESIS.....	101
2.2 OBJETIVOS.....	101
3. MATERIAL Y MÉTODOS	105
3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO (ESTUDIO PREDIMED)	105
3.1.1 SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO PREDIMED ..	105
3.1.2 PROTOCOLO DE RECLUTAMIENTO	107
3.1.3 RECOPIACIÓN DE DATOS.....	108
3.2 ESTUDIO INDIMED.....	116
3.2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	116
3.2.2 SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO INDIMED	119
3.2.3 PROTOCOLO DE RECLUTAMIENTO DE LOS PARTICIPANTES.....	120
3.2.4 RECOPIACIÓN DE DATOS.....	124
3.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS	130
3.3.1 CASAS COMERCIALES.....	130
3.3.2 APARATOS Y EQUIPOS.....	131
3.3.3 REACTIVOS Y MATERIAL	132
3.4 ANÁLISIS GENÉTICO.....	133
3.4.1 REACTIVOS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO.....	133
3.4.2 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE POLIMORFISMOS	134
3.5. AISLAMIENTO DE ARN Y ANÁLISIS DE EXPRESION GÉNICA.....	145
3.5.1 RECOGIDA DE LA SANGRE EN TUBOS DE ARN SANGUÍNEO O PAXGENE TM (PAXGENE™ BLOOD RNA TUBE)	145
3.5.2 EXTRACCIÓN SEMIAUTOMÁTICA DEL ARN. MAXWELL 16 TISSUE LEV TOTAL RNA PURIFICATION KIT (PROMEGA)	146
3.5.3 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA. OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO O C-DNA (RT).....	150

3.4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL.....	151
3.6 DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL ELISA SANDWICH.....	154
3.7 METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DEL TEST DE SABORES.....	156
3.7.1 SABOR AMARGO.....	157
3.7.2 SABOR DULCE, SALADO, ÁCIDO, UMAMI.....	158
3.8 MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	162
3.9 MATERIAL Y MÉTODOS EMPLEADOS EN LAS ESTANCIAS FUERA DE ESPAÑA.....	166
3.9.1 ESTANCIA EN UNIVERSITY COLLEGE OF LONDON (UCL), LONDON.....	166
3.9.2 ESTANCIA EN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUTE OF METABOLIC SCIENCE, CAMBRIDGE.....	167
3.9.3 ESTANCIA EN HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH (HSPH), BOSTON.....	169
4. RESULTADOS.....	171
4.1 GENERALIDADES.....	171
4.2 ESTUDIO PREDIMED.....	172
4.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA ESTUDIADA.....	172
4.2.2 VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA SELECCIONADA. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.....	174
4.2.3 CONSUMO DE ALIMENTOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	179
4.2.4 ESTUDIO GENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS ASOCIACIONES.....	194
4.3 POBLACIÓN INDIMED (INTERVENCIÓN CON DIETA MEDITERRÁNEA).....	261
4.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA ESTUDIADA.....	261
4.3.2 VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA SELECCIONADA. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.....	273

4.3.3 CONSUMO DE ALIMENTOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO INDIMED.....	281
4.3.4 ESTUDIO DE LAS PREFERENCIAS ALIMENTARIAS.....	298
4.3.5 ESTUDIO DEL TEST DE SABORES. PERCEPCIÓN DE LOS SABORES.	306
4.3.6 ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA. VALORACIÓN DE LOS CAMBIOS	316
4.3.7 ESTUDIO GENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS ASOCIACIONES.....	332
4.3.8 ESTUDIO GENÉTICO DEL SABOR	344
4.3.9 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA Y SUS ASOCIACIONES.....	349
4.4 RESULTADOS DE LAS ESTANCIAS FUERA DE ESPAÑA	353
4.4.1 ESTANCIA EN UNIVERSITY COLLEGE OF LONDON (UCL), LONDON	353
4.4.2 ESTANCIA EN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUTE OF METABOLIC SCIENCE, CAMBRIDGE	353
4.4.3 ESTANCIA EN HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH, BOSTON. .	354
5. DISCUSIÓN	357
5.1 DISCUSIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES Y LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTILO DE VIDA Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.....	358
5.1.2 ESTUDIO PREDIMED	358
5.1.3 ESTUDIO INDIMED	361
5.2 DISCUSIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS	364
5.2.1 ESTUDIO PREDIMED	364
5.2.2 ESTUDIO INDIMED	367
5.3 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN INDIMED	370
5.4 DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS POLIMORFISMOS Y LAS INTERACCIONES GEN AMBIENTE	377
5.4.1 POLIMORFISMO rs1466113 DEL GEN SSTR2	377
5.4.2 POLIMORFISMOS rs7138803 DEL GEN FAIM2, rs7561317 DEL GEN TMEM18 Y rs2568958 DEL GEN NEGR1.	379
5.4.3 POLIMORFISMOS rs2167444 Y rs508384 DEL GEN SCD1	382
5.4.4 POLIMORFISMOS rs3818292 Y rs7069102 DEL GEN SIRT1.....	385

5.4.6 POLIMORFISMO <i>rs5082 DEL GEN APOA2</i>	387
5.4.7 POLIMORFISMOS <i>rs17020112, rs10863430, rs3748022, Y rs10863389 DEL GEN IKKE</i>	390
5.4.8 POLIMORFISMO <i>-1131T>C y S19W DEL GEN APOA5</i>	392
5.4.9 POLIMORFISMO <i>rs1799884 DEL GEN GCK</i>	398
5.4.10 POLIMORFISMO <i>rs1260326 (P446L) DEL GEN GCKR</i>	399
5.4.11 POLIMORFISMO <i>rs6950982 (P446L) DEL GEN DE LA SERPINE1</i> .	402
5.2 DISCUSIÓN DE LA PERCEPCIÓN DEL SABOR Y LAS PREFERENCIAS ALIMENTARIAS EN LA POBLACIÓN INDIMED Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES. ESTUDIO GENÉTICO DEL SABOR.....	405
5.2.1 PERCEPCIÓN DEL SABOR, CONSUMO DE ALIMENTOS Y SU ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS.....	405
5.2.2 ESTUDIO GENÉTICO DEL SABOR	408
5.6 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE EXPRESIÓN EN LA POBLACIÓN INDIMED	410
5.6.1 ADN POLIMERASA K (<i>POLK</i>).....	410
5.6.2 <i>SIRTUINA 1 (SIRT1)</i>	411
5.7 DISCUSIÓN DE LAS ESTANCIAS FUERA DE ESPAÑA.....	413
5.7.1 ESTANCIA EN UNIVERSITY COLLEGE OF LONDON (UCL), LONDON.....	413
5.7.2 ESTANCIA EN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUTE OF METABOLIC SCIENCE, CAMBRIDGE	413
5.7.3 ESTANCIA EN HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH, BOSTON. .	414
6. CONCLUSIONES.....	415
7. BIBLIOGRAFÍA	419
8. ÍNDICE DE FIGURAS	447
9. ÍNDICE DE TABLAS.....	457

TERMINOLOGÍA

Las abreviaturas utilizadas en esta tesis son las siguientes:

β :	Beta
A:	Adenina
aa:	Aminoácido
AA	ácido araquidónico
ACV:	Accidente Cerebrovascular
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ADM	Adherencia a la dieta mediterránea
AG	Ácidos grasos
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGL	Acidos grasos libres
AOV	Aceite de oliva virgen
APOA-1:	Gen de la apolipoproteína de tipo A-I
APOA5:	Gen de la apolipoproteína de tipo A-V
ApoA5:	Apolipoproteína de tipo A-V
APOA2	Gen de la apolipoproteína A-II
apoB:	Apolipoproteína de tipo B
APT III	Adult Treatment Panel III
ARN:	Ácido ribonucleico
C:	Citosina
CFCA	Cuestionario de Frecuencia de Consumo Alimentario
CLA	ácido linoleico conjugado
CETP	Trasferencia de esteres de colesterol

CT	Colesterol total
DHA	ácido docosohexaenoico
DT:	Desviación típica (en inglés, SD: <i>Standard Deviation</i>)
DM	Dieta Mediterránea
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECV:	Enfermedades cardiovasculares
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
EPA	ácido eicosopentaenoico
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer
FAIM2	Gen fas apoptotic inhibitory molecule
FS	Frutos secos
G:	Guanina.
GCK	Gen de la glucokinasa
Gck	glucokinasa
GCKR	Gen de la proteína reguladora de glucokinasa
Gckr	Proteína reguladora de glucokinasa
GLGC	Global Lipids Genetic Consortium
GWAs	Genome Wide Association studies (Estudios de asociación del genoma completo)
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HDL-C:	Colesterol HDL
HSPH	Harvard School of Public Health
HTA	Hipertensión arterial
HTG	Hipertrigliceridemia
IC:	Intervalo de confianza (en inglés, CI: <i>Confidence Interval</i>)
ICC	Índice cintura cadera
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleukina 6

IR	Insulino resistencia
IKKE	Gen inhibitor-Kb kinase épsilon protein
IMC:	Índice de masa corporal (en inglés, BMI: <i>Body mass index</i>).
INDIMED	INtervención con DIeta MEDiterránea
LCAT:	Gen de la lecitina-colesterol aciltransferasa
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad.
LDL-C:	Colesterol LDL.
LH:	Apolipoproteína lipasa hepática
Lp(a)	Lipoproteína (a)
M:	Molar
mmol:	Milimol
NCEP	National Cholesterol Education Program
NEGR1	Gen Neuronal growth regulator 1
NPISHII	Northwick Park Heart Study II
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR:	Odds Ratio.
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno 1
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
pb:	par de bases (en inglés, bp: <i>base pair</i>)
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCRus	Proteína C reactiva ultrasensible
PREDIMED	PREvención con Dieta MEDiterránea
PROP	6-n-propiltiouracil
PTC	feniltiocarbamida
QTL	<i>Loci</i> de rasgos cuantitativos
R ² (r ²):	Coefficiente de determinación (modelos de regresión lineal)
RFLP:	Polimorfismos de longitud en los fragmentos de restricción
RCV	Riesgo cardiovascular

rMED	relative Mediterranean Diet Score (escala relativa de adherencia a la Dieta Mediterránea)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SCD	Estearoil Coenzima-A desaturasa
SCD1	Gen de estearoil Coenzima-A desaturasa 1
Ser	Serina
SIRT1	Gen de la sirtuina 1
SNP:	Polimorfismos de único nucleótido.
SSTR2	Gen del receptor de la somatostatina 2
T:	Timina
TG:	Triglicéridos o triaglicéridos.
TMEM18	Gen de transmembrane protein 18
TNF	Factor de necrosis tumoral
t-PA	Activador del plasminógeno tisular
Trp	Triptófano
UCL	University College London
UDACS	UCL diabetes and cardiovascular disease Study
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad

Summary

Introduction: The World Health Organization (WHO) has described obesity as a global epidemic. Obesity affects a large number of people in developed countries, across all ages, sexes and socio economic status. Obesity rates are also increasing in developing countries, resulting in a total of 502 million obese and overweight people worldwide (41% men and 59% women)(WHO 1998, WHO, 2000). Recent data indicate that by 2030 2.16 billion people will be overweight and 1.12 billion people will be obese (Kelly T et al, 2008). According to DORICA results, obesity prevalence in the Spanish adult population between ages 25 and 64 years (Aranceta et al, 2004) is approximately 15.5%, with a higher prevalence in women (17.5%) than in men (13.2%). The highest proportions of obese people in Spain are registered in the Northwest regions, Murcia and South of the Canary Islands.

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide and are expected to remain so over the coming years due to aging population and their increasing prevalence in developing countries (WHO, 2003). It is estimated that in 2015 20 million people will die from CVD, mainly from heart disease and stroke. In Europe, 4.3 million deaths are caused by heart disease and stroke each year. Nearly half (48%) of all deaths are due to CVD (54% of deaths in women and 43% of deaths in men). In Spain, according to a report of the Spanish Society of Cardiology (2009), CVD are consolidated as the leading cause of death. According to 2007 statistics, CVD caused 124,126 deaths, representing approximately 31% of all deaths (28.6% males and 36.8% for females) (INE, 2007).

Both obesity and CVD are complex diseases. The risk factors that contribute to their development can be classified as modifiable or non-modifiable (Posner et al, 1991, Haskell et al, 2003). Modifiable factors or environmental factors are for instance diet, physical inactivity and tobacco, whereas non-modifiable risk factors are age, sex and family history. Diet is the modifiable risk factor with the greatest impact on lipid metabolism, obesity, oxidative stress and development of the atherosclerotic process (Ordovas et al, 2004).

Classical genetic analysis carried out in families and twins have shown clearly that there is a genetic contribution to obesity (Maes et al, 1997; Stunkard et

al, 1990). Twin studies allow separation of genetic and environmental components of variance since monozygotic (MZ) twins share 100 per cent of their genes whilst non-identical dizygotic (DZ) twins share 50 per cent on average. Comparison of MZ twins raised together with MZ twins raised apart probably represents the ideal study group. One study (Stunkard et al, 1986) assessed BMI in a sample of 1974 MZ and 2097 DZ male twin pairs and found concordance in MZ twins to be around 0.8. This was twice as high as that in DZ twins both at age 20 and at 25 year follow up. One of the best estimates of obesity heritability, accounting for 67 per cent of variance, is derived from the Virginia cohort of 30 000 twins, their parents, siblings, spouses and children (McLaughlin, 1991). Overall, weighted mean BMI correlations have been calculated to be 0.74 for MZ twins, 0.32 for DZ twins, 0.25 for siblings, 0.19 for parent–offspring pairs, 0.06 for adoptive relatives and 0.12 for spouses (Maes et al., 1997). Today, it is estimated that about 40-70% of the variation in adiposity in humans can be attributed to genetic factors (Chung and Leibel, 2008). The interest of genetic contribution to obesity has led to the search for candidate genes related to obesity to better understand metabolic pathways and networks involved in the control of body composition and CVD in humans.

Recently, Genome Wide Association Studies (GWAs) have revolutionized the field of genetic epidemiology. Advances in high-throughput sequencing, chip technology and knowledge on the human genome have allowed genotyping of hundreds or thousands of genetic variants, typically single nucleotide polymorphisms (SNPs) across the genome simultaneously. The Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) consortium tries to bring together groups from across the world to study the genetic aetiology of anthropometric traits. In the second meta-analysis (16,976 individuals) one new locus was identified near the *MC4R* gene (widely known for its biological effect) (Loos RJ et al, 2008). Subsequently, a doubling of the sample size in two independent cohorts resulted in the discovery of ten more loci. These included the previous *FTO* and *MC4R* and six new loci (*NEGR1*, *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *GNPDA2*, *MTCH2*) (Willer CJ et al, 2009; Thorleifsson et al, 2009). Derived from these GWAs genetic variations in *SSTR2*, *TMEM18*, *NEGR1*, *FAIM2*, *SCD1*, *SIRT1*, *IKKE*, *APOA2* genes have been studied in this thesis.

Regarding the genetic contribution of CVD, the analysis carried out by the Global Lipids Genetics Consortium (GLGC) has provided a list of 32 loci that contribute to triglyceride (TG) concentration variation (Teslovich T et al, 2010). Taken together, SNPs in these loci explained 9.6% of the total variation in plasma TG, corresponding with 25-30% of the total heritability of TG concentration. Some of these genetic variants and others have been selected to be studied in this thesis: *APOA5*, *APOA2*, *GCKR*, *GCK*, *SERPINE1*.

With respect to environmental factors influencing adiposity variance, diet is one of the most important. In recent decades, the eating pattern in Spain has

changed considerably; from a traditional Mediterranean diet (MD) to a diet characterized by excessive intake of calories and saturated fatty acids. This contributed to increased rates of obesity and CVD. Several diets have been proposed to induce weight loss (low-carb - high fat diets, high protein diets and the MD) (Sahi I et al, 2008, Larsen TM et al, 2010, Sacks FM et al, 2009). The MD has been proposed as one of the best because of its recognized beneficial effects on cardiovascular health (Sotos-Prieto M et al, 2010). However, there is strong evidence for great inter-individual variability in response to dietary modifications and this variability is at least partly determined by genetic factors (Loktionov A, 2003). The human genome is sensitive to the nutritional environment in two ways. First, nutrients can regulate gene expression and secondly, genetic factors can influence the effect of a diet (Loktionov A et al, 2003). A new term has been raised up known as Nutritional Genomics, defined as the study of the relationship between the human genome, nutrition and health, aiming to personalize diet to prevent or treat diseases. Nutritional genomics can be divided in two disciplines: nutrigenetics and nutrigenomics. Most studies conducted to determine whether genetic factors could explain inter-individual differences are based on the study of SNPs and related dietary factors, including those belonging to the MD.

Objectives: Within this context, the objectives of this thesis are:

1. To select by literature review genetic polymorphisms in candidate genes associated with obesity and related parameters, such as lipid metabolism, which association could be modified by dietary components and environmental factors. Subsequently, to study the main associations between selected variants in in several candidate genes and obesity, anthropometric parameters and lipid metabolism The selected variants in candidate genes were:
 - a) Genes involved in obesity and other anthropometric parameters (rs1466113 in *SSTR2* gene, rs7561317 in *TMEM18* gene, rs2568958 in *NEGR1* gene, rs7138803 in *FAIM2* gene, rs2167444 and rs508384 in *SCD1* gene, rs3818292 and rs7069102 in *SIRT1* gene, rs5082 in *APOA2* gene and rs17020112, rs10863430, rs3748022, rs10863389 in *IKKE* gene).
 - b) Genes involved in lipid metabolism (-1131T> C and S19W in *APOA5* gene, in the rs5082 in *APOA2* gene, rs1260326 in *GCKR* gene, rs1799884 in *GCK* gene, and rs6950982 in *SERPINE1* gene)
2. To study gene-environment interactions between selected polymorphisms and intermediate phenotypes of cardiovascular risk in the PREDIMED study. Fundamentally, we examined whether the association between genotype and anthropometric and lipid parameters are modified by adherence to MD. To design and perform a dietary intervention study

(INDIMED study) with four intervention groups (control, virgin olive oil, nuts and a MD) to assess whether dietary intervention affects anthropometric and biochemical parameters.

3. To identify correlates of adherence to MD (e.g. frequency of physical activity, tobacco use, educational level, social class, food consumption and alcohol intake) and characterize different dietary patterns based on adherence to MD in the INDIMED Study. To study the association between the aforementioned lifestyle factors and anthropometric traits and cardiovascular risk factors.
4. To perform the genotyping in SNPs which association were most relevant in the PREDIMED study (genetic variants in *APOA5*, *APOA2*, *GRCK*, *NEGR1*) as well as other genetic variants involved in taste receptors (V296I, A262V, P49A in *TAS2R38*) in the INDIMED study. To study the association between these genetic variants and phenotypes associated with obesity, lipid metabolism and other biochemical parameters as well as with the perception of bitter taste, both cross sectionally and following the intervention with VOO, nuts and MD.
5. To examine the influence of dietary intervention (virgin olive oil, nuts and a MD) in the expression of selected candidate genes (*APOA2*, *APOA5*, *GCKR*, *SIRT1*, *POLK*) in the INDIMED study.
6. To replicate findings in other European populations.

Participants and methods: The populations studied in this thesis are:

- The PREDIMED study (PREvención con DIeta MEDiterránea); a prospective multicenter, randomized, single blind, controlled study to evaluate the effects of two dietary interventions with Mediterranean diet supplemented with virgin olive oil (extra virgin olive oil, 1 liter per week) or nuts (30g per day of a 50:50 mixture of walnuts and almonds) (Estruch et al, 2006). Although the study is an interventional, prospective study, we analysed the data as if it were a cross-sectional design. We included 945 men and women at high risk for cardiovascular diseases
- The INDIMED study (INtervención con DIeta MEDiterránea) is a randomized, single blind, controlled intervention study aiming to examine the effect of three dietary interventions based on supplements with extra virgin olive oil (one liter per week) and mixed nuts (30 g per day of a 50:50 mixture of walnuts and almonds) in the usual diet or both interventions combined in a strictly monitored MD (based on a validated 14-points questionnaire that define the adherence to Mediterranean diet) in

healthy adults (n = 132) (men and women aged 25 to 55 years) for a follow-up of 10 weeks.

The institutional review boards of the 10 participating centers in the PREDIMED study approved the study protocol, which was in accordance with the Declaration of Helsinki. Specifically, the PREDIMED-Valencia study has been approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Valencia.

For genetic analyses, DNA extraction was performed using two techniques: by purification with phenol-chloroform extraction and by MagNaPure LC DNA Isolation kit (ROCHE Diagnostics). Genotyping of polymorphisms was performed using a conventional PCR reaction and 7900HT Sequence Detection system (Applied Biosystems) using a fluorescent allelic discrimination TaqMan assay according to the manufacturer's protocol. The isolation of RNA for gene expression study was performed by semi-extraction (Maxwell 16 LEV tissue total RNA purification kit) from blood collected in PAXgene tubes. Reverse transcription reaction and subsequent analysis of gene expression was performed with a 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems).

To study perception of bitter, sweet, salty, sour and umami, methods described by Zhao L et al (2003), Tepper BJ et al (2001) and Qing Ying et al, (2009) were applied.

Results: Lifestyles in both populations were associated with intermediate cardiovascular risk factors. A physically active lifestyle was associated with a lower prevalence of obesity (sedentary: 75% obese vs non-sedentary: 48.9%; $p=0.034$) and with lower TG (Sedentary: 119.6 ± 80.1 vs non-sedentary: 91.0 ± 45.3 mg/dL; $p=0.007$). Lower education level was associated with higher BMI (none: 31.1 ± 5.1 ; primary studies: 31.1 ± 4.8 ; bachelor degree 29.9 ± 5.0 ; university degree: 29.9 ± 5.4 Kg/m²; $p=0.006$), weight (primary studies: 72.8 ± 12.7 ; bachelor degree 76.7 ± 13.3 ; university degree: 68.4 ± 10.3 kg; $p=0.025$), % fat (primary studies: 30.9 ± 7.7 ; bachelor degree 27.4 ± 8.0 ; university degree: 24.8 ± 8.4 ; $p=0.005$), visceral fat (primary studies: 8.2 ± 3.0 ; bachelor degree 7.3 ± 3.8 ; university degree: 4.5 ± 3.2 ; $p<0.001$), waist circumference (primary studies: 91.6 ± 9.9 ; bachelor degree 90.4 ± 13.6 ; university degree: 81.2 ± 10.9 cm; $p<0.001$) as well as with higher TG (primary studies: 115.7 ± 73.1 ; bachelor degree 99.1 ± 53.5 ; university degree: 85.4 ± 44.4 mg/dL; $p=0.018$), total cholesterol (primary studies: 232.7 ± 42.6 ; bachelor degree 211.6 ± 33.7 ; university degree: 203.2 ± 140.0 mg/dL; $p<0.001$), LDL-C (primary studies: 146.1 ± 37.3 ; bachelor degree 108.0 ± 25.3 ; university degree: 119.0 ± 32.0 mg/dL; ($p<0.001$), and APOB concentrations (primary studies: 107.2 ± 23.4 ; bachelor degree 99.9 ± 24.2 ; university degree: 89.6 ± 23.7 mg/dL; $p<0.001$).

Adherence to a Mediterranean diet was associated with a lower prevalence of obesity ($p < 0.001$). Average red meat consumption was 7.4 ± 4.7 times/week, and was higher in men than in women ($p = 0.031$) and was associated with higher weight ($p = 0.001$) and prevalence of obesity ($p = 0.025$). Average fish consumption was 4.5 ± 2.6 time/week and was associated with lower concentrations of plasma glucose ($P = 0.016$) as well as with a lower prevalence of diabetes ($P = 0.017$) (Sotos-Prieto et al, 2011). Fruit consumption was negatively associated with BMI ($p=0.001$), weight ($p=0.017$), fat % ($p=0.036$), visceral fat ($p=0.011$), waist ($p=0.022$) and hip circumference (0.002) and obesity (non-obese: 31.4 ± 13.1 times/wk; obese: 19.7 ± 9.9 times/week, $p=0.022$). Nuts consumption was negatively correlated with fat %, waist circumference and BMI ($p < 0.05$). Several studies have found an association between adherence to a MD and beneficial effects on intermediate cardiovascular risk factors (Sotos-Prieto M et al, 2010; Tzima N et al, 2007, Schröder H et al, 2003).

Most of the genetic variants studied were significantly associated with anthropometric traits and TG concentrations, replicating associations described earlier and adding new information (*IKKE*, *SSTR2*, *GCKR*). For rs1466113 (G>C) in *SSTR2*, CC homozygotes had a significantly lower BMI than G-allele carriers ($29.9 \pm 4.5 \text{ kg/m}^2$ in CC vs $31.0 \pm 4.9 \text{ kg/m}^2$ in GG+GC; $P=0.035$). Likewise, the odds ratio (OR) for obesity was lower in CC homozygotes when compared with G-allele carriers, even after adjusting for potential confounders (OR: 0.60, 95%CI: 0.38-0.94; $P=0.028$). We also found significant differences in food (meats, dairy products and legumes) and nutrient (protein) intakes between CC homozygotes and G-allele carriers ($p > 0.05$). For rs7138803 in *FAIM2*, AA homozygotes had higher energy intake than G allele carriers (GA+GG) after adjusting for sex and age (AA 2107.5 ± 605.3 vs GA+GG 2261.3 ± 660.8 Kcal; $p=0.045$). rs7561317 in *TMEM18* was significantly associated with waist circumference (AA: 99.8 ± 12 ; AG: 103.5 ± 11.2 ; GG: 104.8 ± 12 cm; $p=0.030$), whereas rs2568958 in *NEGR1* was associated with body weight (AA: 78.2 ± 12.6 kg vs GG+GA: 76.5 ± 12 kg, $P=0.037$). rs2568958 showed an interaction with physical activity; sedentary individuals who were homozygous for the A allele had significantly higher body weight than AG and AA carriers combined (AA 85.5 ± 10.9 vs AG+GG: 74.3 ± 11.1 Kg; $p=0.015$), whereas these differences were not observed in active individuals (AA: 77.0 ± 12.2 vs AG+GG: 76.3 ± 11.7 Kg; $p=0.613$).

We confirmed an association of the *APOA2* polymorphism with BMI and replicated the interaction between -265T>C SNP in *APOA2* and saturated fat for body weight. The CC genotype was associated with a 6.8% greater BMI in those consuming a diet high in saturated fat (results, $P=0.018$), but not in those consuming a diet low in saturated fat ($P=0.316$) (Corella D et al, 2011).

Individuals carrying the AC or CC genotype in rs17021112 (in *IKKE*), had a higher BMI compared with AA homozygotes (AC: 31.6 ± 5.4 , CC: 41.3 ± 5.6 vs AA:

30.8±4.9 Kg/m², p=0.008). In women, body weight was also higher in AC and CC carriers than in AA homozygotes (AC: 78.8±11.8, CC: 93.1±16.1 vs AA: 77.1±12.4 kg, p=0.042). TT homozygotes in rs10863389 (gene) had a higher waist circumference (results, p=0.046) and rs108663430 (gene) showed a trend toward an association with BMI (p=0.069).

rs2167444 in *SCD1* was associated with plasma TG concentrations (TG: AA: 163.8±111, AT: 130.6±66.4, TT: 128.8±72.5 mg/dl; p=0.040). The -1131T>C and S19W SNPs in *APOA5* gene were also associated with TG concentrations (-1131TT: 127.9±68.4 vs -1131C +1131CC: 148.6±125.7 mg/dL, p=0.032). Moreover, CC carriers had lower APOA5 concentrations than TT carriers (CC: 83.7±6.7 vs TC: 184.2±94.9 vs TT: 239.9±94.9 ng/ml; p=0.020). However, opposite results were obtained for the S19W SNP and APOA5 concentrations. The WW genotype was associated with higher APOA5 concentrations compared with the SW and SS genotypes (WW: 712.9±200.2 vs SW: 284.1±147.2 vs SS: 183.6±90.9 ng/ml, P<0.001). Moreover, those with the SW or WW genotype showed higher TG concentrations than those with SS (SW: 133.3±76.5 vs WW: 313.4±277.3 vs SS: 127.9±67.6 mg/dL, P=0.008). Adherence to MD and tobacco modified the effect of -1131T>C on TG concentrations (P for interaction= 0,001, describe interaction)

For the Pro446Leu SNP in *GCKR*, L carriers of the *GCKR* had significantly higher TG concentrations when compared with PP homozygotes (PP: 119.1±4.8 vs PL+LL: 136.3±2.9 mg/dL, p=0.014). Conversely, individuals homozygous for the A allele in the *GCK* SNP had significantly lower TG concentrations (GG+GA: 130.7±2.7 vs AA: 103.6±16.1 mg/dL, p=0.033) and higher risk of diabetes (OR: 3.3; 95% CI 1.2-9.2) compared with AG and GG carriers. Joint effects for both SNPs (carriers of risk alleles for TG (PL+LL (*GCKR*)+ AA (*GCK*)) increased by a 37% TG concentrations (p=0.033). Adherence to MD modified the association between the *GCKR* polymorphism and TG concentrations, that is, adherence to a MD cancels out the genetic risk associated with the L allele (PP: 131.2±12.2 vs PL+LL: 134±7.5 mg/dL; p=0.917). Moreover, the *GCKR* SNP was associated with the consumption of olive oil (VOO) (PP+<4 table spoon (tbs) of VOO: 127.7±7.2, PL+LL+<4tbs: 144.4±6.4, PP+>4 tbs: 115.3±5.1, PL+LL+>4 tbs: 132±3.6; p=0.035), vegetables (PP+<2 serving (s)/day (d): 124.4±5.9, PL+LL+<2 s/d: 140.5±4.5, PP+>2 s/d: 114.2±5.3, PL+LL+>2 s/d: 130.3±3.8, p=0.012), red meat (PP+>1 s/d: 109.4±7.7, PL+LL+>1 s/d: 125.3±7.0, PP+<1 s/d: 120.2±5.1, PL+LL+<1 s/d: 136.0±3.3, p=0.017), carbohydrate rich beverages (PP+<1 s/d: 113.2±9.0, PL+LL+>1 s/d: 129.8±7.9, PP+≤1 s/d: 118.4±5.0, PL+LL+≤1 s/d: 135.1±3.3, p=0.036), and nuts (PP+<3 s/week (w): 116.1±5.2, PL+LL+<3 s/d: 132.5±3.5, PP+≥3 s/d: 122.5±6.6, PL+LL+≥3 s/d: 138.9±5.5, p=0.038).

For rs6950982 in *SERPINE*, GG homozygotes had significantly higher total cholesterol (AA+AG: 208±40 vs GG: 218±48 mg/dL, p=0.011), LDL-C (AA+AG:

128±35 vs GG: 136±44 mg/dL results, $p=0.031$) and TG (AA+AG: 128±69 vs GG: 154±111 mg/dL, $p=0.029$). Adherence to a MD modified the association between rs6950982 and TG concentrations (p for interaction=0.036).

In the intervention INDIMED study, compared with the control group the virgin olive oil, nuts and MD groups showed significant changes over time in weight (-0,67 Kg, $p=0.017$; -0,88 Kg, $p=0.004$; -1,78 Kg $p<0.001$), BMI (-0,25 Kg/m², $p=0.016$; -0,31 Kg/m², $p=0.005$, -0,66, $p<0.001$), waist (-1,83 cm, $p<0.001$, -2.22 cm, $p=0.006$, -3.64 cm, $p<0.001$) hip (-1.02 cm $p<0.001$, -0,93 cm $p<0.001$, -1.30 cm $p<0.001$) body fat (%) (-0,18 % $p=0.004$, -0,34% $p=0.0016$, -0,44% $p<0.001$) and total Cholesterol (-8,94 mg/dL $p=0.020$, -23.84 mg/dL $p<0.001$, -25.13 mg/dL $p<0.001$). The nuts and MD group also reduced visceral fat content (results, $p=0.003$, $p=0.003$) reduced systolic blood pressure (BP) (-5.57mmHg $p=0.004$, -8.86 mmHg $p<0.001$), reduced diastolic BP (-3.14 mmHg $p=0.001$, -4.48 mmHg $p<0.001$) and reduced urea excretion (-5 mg/dL $p<0.001$, -5.5 mg/dL $p=0.011$) LDL-c (-11.9 mg/dL $p=0.029$, -12.03 mg/dL $p<0.001$). The MD group also showed reduced alanine transaminase (ALT) and gamma-glutamyltransferase (GGT) over time when compared with controls (-4.56 mg/dL $p<0.001$, -4.47 mg/dL $p=0,012$) as well as reduced lipoprotein(a) in the virgin olive oil group (-4.47 mg/dL). Therefore, we corroborated that a traditional strict MD but also some of the most emblematic items: virgin olive oil and mixed nuts, could be a useful tool in the treatment of intermediate CVD risk factors. The polymorphisms studied in the bitter taste receptor gene are associated with bitter taste perception according to PTC/PROP compounds. It is noteworthy that individuals with the AVI genotype (non-taster) had higher energy consumption than individuals with the PAV genotype (super taster) (AVI/AVI: 2407.8±664.0; AVI/PAV: 2193.1±565.5 vs PAV/PAV: 1949.4±556.9 Kcal; $p=0.026$). However, although the genotype-perception of taste is quite clear (Khat NH et al, 2009, Tepper BJ et al, 2009), the association between genotype and food consumption is more difficult to establish due to the amount of environmental factors involved in food intake.

Finally, in the nutrigenomics study, we showed that in the three intervention groups, the *POLK* gene (involved in DNA repair) was down-regulated compared with the control group (p control=0.08, p virgin olive oil= 0.0005, p nuts= 0.002, p MD = 0.019), replicating previous studies examining effects of the consumption of virgin olive oil (Konstantinidou et al, 2009; Konstantinidou et al, 2010) and providing new evidence regarding the use of nuts and MD. Although expression of *SIRT1* have been described in calorie restricted animals and in humans (Tauriainen E et al, 2011; Crujeiras et al, 2008), we were the first to observe an increased expression of *SIRT1* following a dietary intervention (% increase, p control= 0.2706; p virgin olive oil= 0.0003; p nuts= 0.023, p MD = 0.021). This provides suggestive evidence for a beneficial effect of virgin olive oil consumption, nuts and MD in the regulation of gene expression associated with cardiovascular disease.

Conclusions: The CONCLUSIONS of this thesis are:

1. Higher adherence to Mediterranean diet was associated with a lower prevalence of obesity and other intermediate cardiovascular phenotypes in the high cardiovascular risk elderly population. We confirmed this positive association in the nutritional intervention study (INDIMED). In this study we found that nutritional intervention with virgin olive oil, mixed nuts and a Mediterranean diet can produce changes in food consumption patterns increasing adherence to Mediterranean diet. Moreover, higher adherence to Mediterranean diet and nutritional intervention for all groups except for the control group is significantly associated with favorable changes in anthropometric measures, plasma lipids and other biochemical parameters. Both, in INDIMED and PREDIMED study, higher typical Mediterranean food consumption such as fruits, vegetables and mixed nuts were associated with a healthier cardiovascular profile.

2. In the nutrigenetic study, most of the selected polymorphisms showed statistically significant associations with anthropometric parameters and plasma triglyceride concentrations, replicating association previously described in other populations and describing new ones for the first time. Common polymorphisms that were identified in Genome Wide Association studies for anthropometric and lipids traits showed associations with:
 - Body weight (rs1466113 in *SSTR2*, rs2568958 in *NEGR1*); BMI (rs5082 in *APOA2*), waist circumference (rs1466113 in *SSTR2*, rs7561317 in *TMEM18*, rs5082 in *APOA2*). Obesity risk (rs1466113 in *SSTR2*), overweight prevalence (rs2568958 in *NEGR1*)
 - TG concentrations (-1131 T> C and S19W in *APOA5*, rs1260326 (P446L) in *GCKR*).

Moreover, new pleiotropic effects were identified:

- Waist circumference (rs10863430 in *IKKE* gene) and BMI (rs17020112 in *IKKE* gene), hip circumference (rs5082 in *APOA2* gene), obesity risk (rs508384 in *SCD1* gene)
- Diabetes prevalence (rs10863430 *IKKE* gene)
- TG concentrations (rs695082 in *SERPINE1* gene, rs2167444 in *SCD1* gene), total cholesterol (rs695082 in *SERPINE1* gene), LDL-C (rs695082 in *SERPINE1* gene) hypertriglyceridemia status (rs508384 in *SCD1* gene)

3. Adherence to a Mediterranean diet and other environmental factors modified the genetic effects of the SNPs studied for obesity and CVD. Amongst the environmental factors, high adherence to a Mediterranean diet modified triglyceride concentrations for polymorphisms-1131T> C in *APOA5* gene, rs120326 in the *GCKR* gene, rs6950982 in the *SERPINE* gene and rs2167444 in the *SCD1* gene and the risk of obesity in the rs10863440 polymorphism in the *IKKE* gene. A smoking habit was associated with triglyceride concentrations for polymorphism 1131T> C in *APOA5* gene and the rs7138803 in the gene *FAIM2*. Physical activity condition also modulated genetic susceptibility to having higher BMI and TG concentrations in rs2568958 in *NGRE1* gene and S19W in *APOA5* gene. Genetic susceptibility to higher waist circumference as regards rs7561317 in *TMEM18* gene was modulated depending on nut consumption. Moreover, a rs5082 *APOA2* gene-saturated fatty acids interaction for BMI was found*. Some of these associations and interactions have been investigated in other European and American populations, replicating the results mainly for *GCK* and *GCKR* genes. More in-depth knowledge on the mechanisms underlying this interaction will no doubt contribute to the realization of more effective prevention strategies
4. In the association analysis of genetic polymorphisms and bitter taste receptor, we found a high correlation between genetics and taste perception. However, although the genotype-perception of taste is quite clear, the association genotype-food consumption is more diffuse given the amount of environmental factors involved in food intake.
5. The nutrigenomics study showed that a short-term dietary intervention with Mediterranean foods can significantly modify candidate atherosclerotic gene expression. Increased virgin olive oil, mixed nut intake and adherence to a Mediterranean diet may reduce CVR risk by down-regulating *POLK* gene expression (involved in DNA repair) and increasing *SIRT1* gene expression (association shown for the first time). This indicates and adds evidence to the beneficial effect of virgin olive oil consumption, mixed nuts and Mediterranean diet in the regulation of atherosclerotic gene expression.

INTRODUCCIÓN

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber
Albert Einstein

1.1 OBESIDAD Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. PANORÁMICA ACTUAL Y REPERCUSIÓN SOBRE LA SALUD

1.1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA OBESIDAD.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la obesidad ha sido descrita como una epidemia global (pandemia siglo XXI).

Esta enfermedad afecta a un gran porcentaje de la población de países desarrollados como el nuestro, abarcando todas las edades, sexos y condiciones sociales, pero también estas tasas están incrementándose en los países de economía en transición o en desarrollo, adquiriendo proporciones epidémicas con un total de 502 millones de obesos en todo el mundo (41% hombres y 59% mujeres), existiendo un 50% de la población mundial con problemas de exceso de peso y un 20% con obesidad (OMS, 1998, OMS, 2000). Información reciente indica que el número absoluto de obesos proyectados para el 2030 es de un total de 2,16 billones de personas con sobrepeso y 1,12 billones de personas con obesidad (Kelly T et al, 2008) (Figura 1.1).

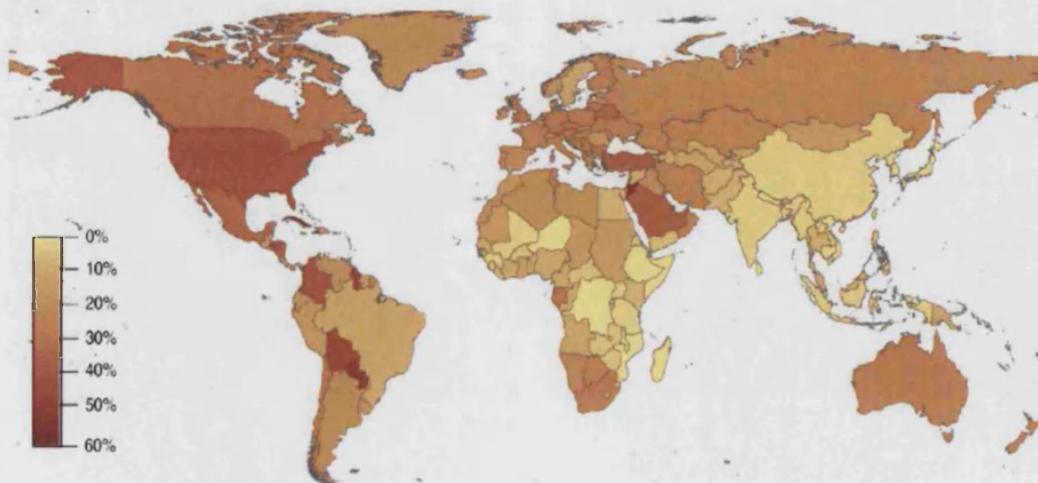


Figura 1 1Porcentaje de obesidad global en el mundo (Kelly et al. Int J Obes 2008)

En tres décadas -entre 1980 y 2008- la prevalencia de la obesidad se ha duplicado en el mundo y, en la actualidad, mas de una de cada 10 personas la

padece. Las complicaciones de la obesidad la han convertido en la segunda causa de mortalidad prematura y evitable después del tabaco (Salas Salvado-J et al, 2007). El gasto sanitario derivado de la obesidad en el mundo occidental oscila entre el 2-8% del presupuesto sanitario total, estimándose el coste sanitario anual medio un 44% mayor para un individuo con $IMC > 35 \text{ Kg/m}^2$ que para un sujeto con $IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$ (Belda O et al, 2005).

De acuerdo con el National Centers for Health Statistics (NCHS) la incidencia de la obesidad en adultos norteamericanos apenas cambió entre los años 1960 y 1976, pero se duplicó entre 1976 y 1999 (estudio NHANES) (Figura 1.2). En 2002, el 64 % de la población adulta de los EEUU presentaba sobrepeso y el 31% obesidad. Los resultados del estudio longitudinal Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) han puesto de manifiesto la tendencia ascendente de esta epidemia, sobre todo en raza negra (Friedman GD et al, 1988).

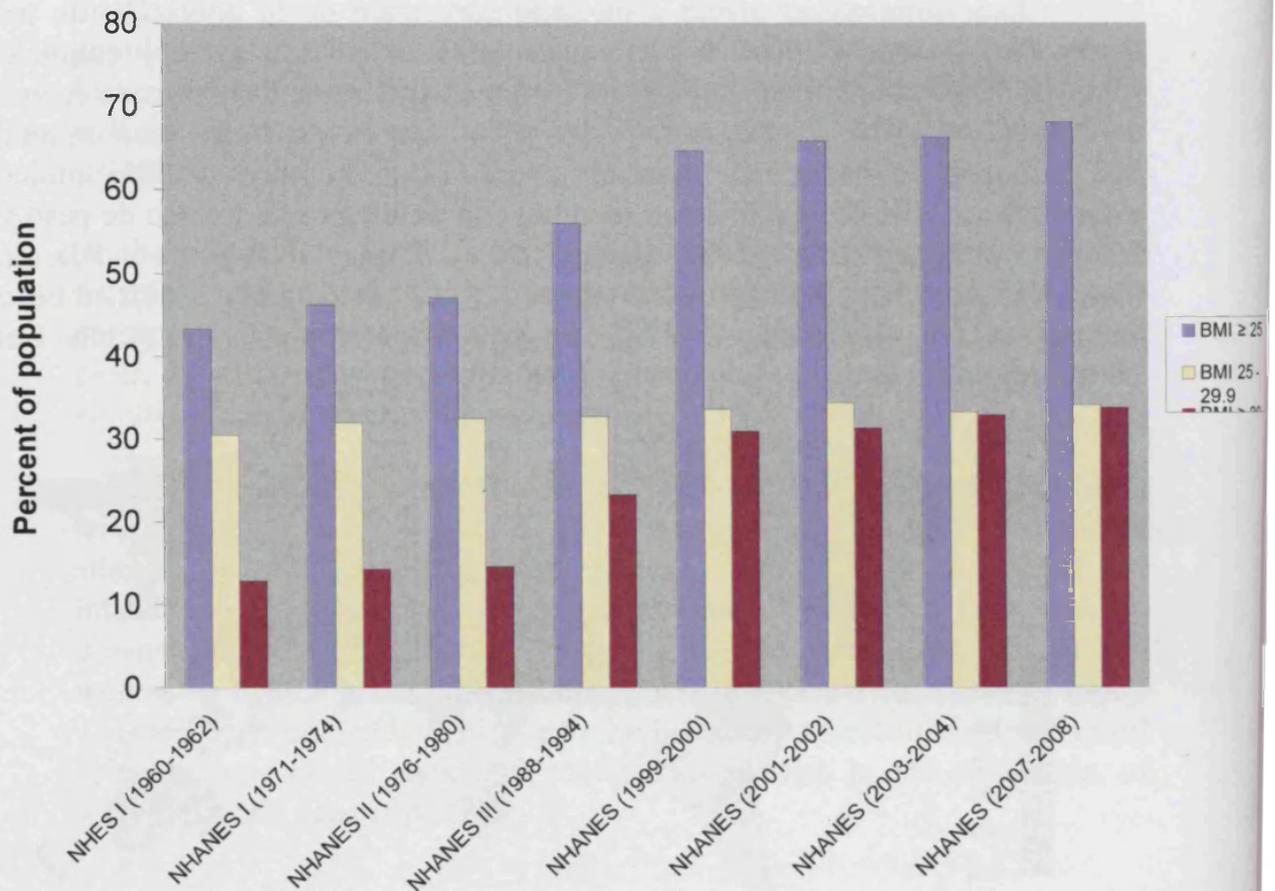


Figura 1.2 Tendencia de la obesidad en adultos según NHANES (Flegal et al. Int J Obes 1998. Ogden et al. JAMA 2006. Ogden et al. JAMA 2010).

Respecto a los países europeos, aunque también se ha observado la misma tendencia, la prevalencia tiene proporciones inferiores a las descritas en los Estados Unidos. Además, la prevalencia de esta enfermedad en Europa tiene una gran variabilidad entre países (WHO MONICA Project) oscilando ésta entre el 30 % en la población adulta de la antigua Yugoslavia al 5 % de Suiza (International obesity task force, 2003). En resumen se detecta una mayor prevalencia de la obesidad en los países del Este europeo frente al Oeste y mayor prevalencia en los países del Sur de Europa frente a los del Norte (Varo JJ et al 2002) (Figura 1.3).

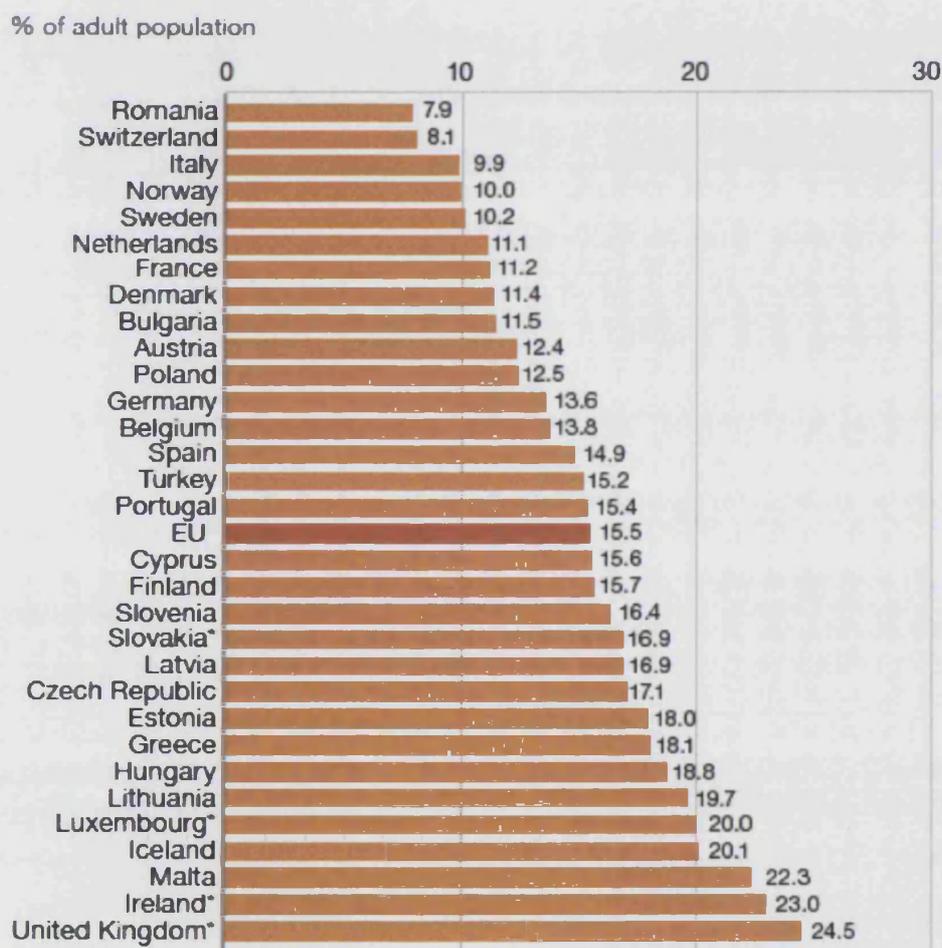


Figura 1.3 Tasas de obesidad en adultos en Europa, 2008. Fuente: OECD datos de salud 2010, Eurostat statistics database, WHO global infobase.

Además, el exceso de peso aumenta el riesgo de mortalidad. Así, entre un 7 y 8 % de las muertes en la UE son atribuidas a la obesidad y al sobrepeso siendo en España, este porcentaje algo mayor, y se sitúa entre el 8 y 9 % (8,5 %) (Calle EE et al, 1999, Adams KF et al, 2006) (Figure 1.4).

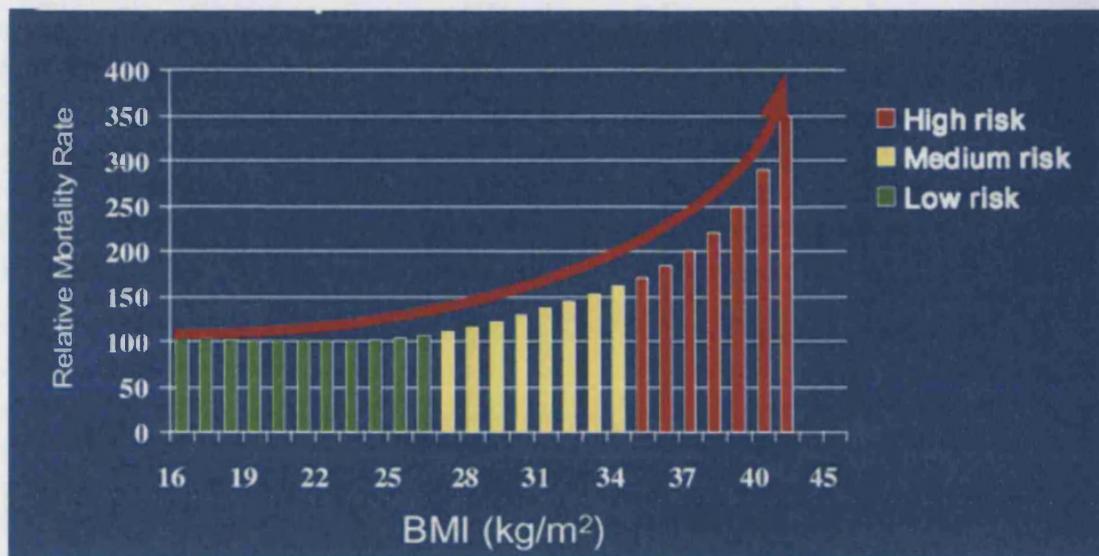


Figura 1.4 Incremento exponencial de riesgo de mortalidad por exceso de peso. Índice de Masa Corporal versus mortalidad. (Adams KF et al., 2006 NEJM).

La prevalencia de la obesidad en la población adulta española entre 25-64 años de acuerdo a los resultados del estudio DORICA (Aranceta et al, 2004) se estima en un 15,5% con una prevalencia más elevada en mujeres (17,5%) que en hombres (13,2%) registrándose una mayor proporción de obesos en las regiones del Noroeste, Murcia, Sur y Canarias (Figura 1.5). Datos provisionales del estudio DRECE (Dieta Riesgo de Enfermedades Cardiovasculares en España) han puesto de manifiesto un incremento del 34,5% en la prevalencia de obesidad en 14 años, pasando de un 17,4 % en 1992 a un 24 % en 2006 (Rubio Ma et al 2006). Los resultados del estudio enKid y actualmente del estudio ALADINO (ALimentación, Actividad física, Desarrollo INfantil y Obesidad) realizado por la Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2011); han puesto de manifiesto que la obesidad en la población española en edad infantil y juvenil está adquiriendo dimensiones que merecen una especial atención (prevalencia de exceso de peso del 31,4%) siendo la distribución geográfica similar a la descrita en la población adulta.

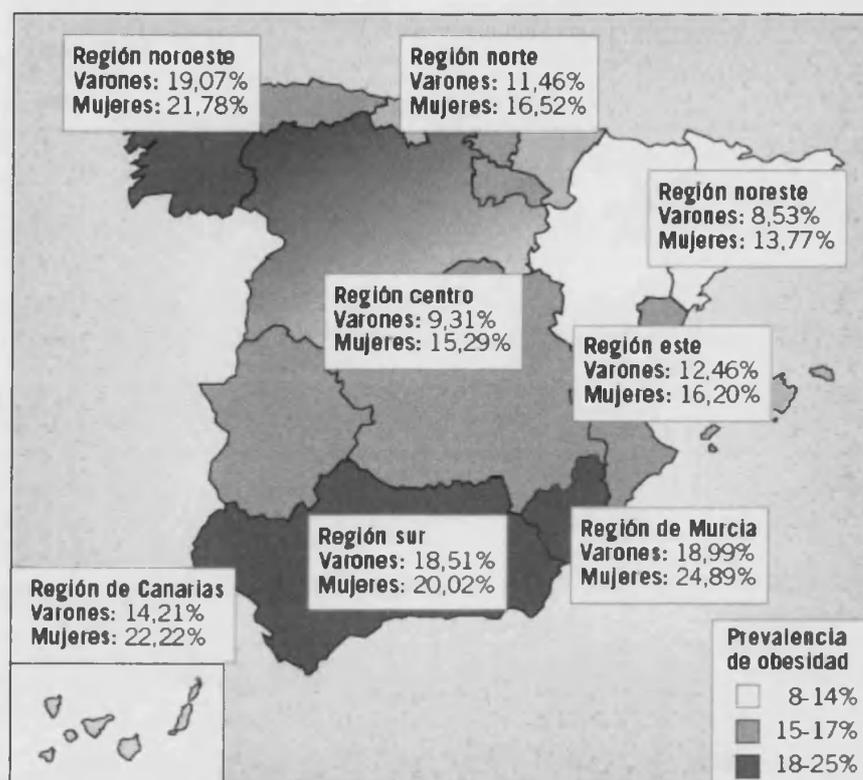


Figura 1.5 Distribución de la prevalencia de la obesidad por áreas geográficas y sexo. Estudio DORICA (Aranceta et al, 2004).

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son enfermedades del sistema circulatorio, de etiología y localización diversas y constituyen uno de los problemas de salud más prevalentes en la actualidad. De hecho las ECV son la primera causa de defunción en el mundo y se prevé que lo sigan siendo durante los próximos años debido al envejecimiento de la población y al aumento de su prevalencia en los países con menos recursos (OMS, 2003). Existen diversos tipos de ECV y se clasifican en cuatro tipos generales: enfermedades isquémicas del corazón, enfermedades cerebrovasculares (ACV), enfermedades vasculares periféricas y otras enfermedades (entre las que destacan las cardiopatías congénitas y la cardiopatía reumática). Las dos primeras son las de mayor importancia ya que son responsables de más del 60% de la mortalidad cardiovascular total. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2005 aproximadamente 17,5 millones de personas murieron a causa de ECV, representando el 30% de las muertes registradas en el mundo. De estas muertes, 7,6 millones fueron debidas a la cardiopatía coronaria y 5,7 a ACV. Se calcula que en 2015 morirán cerca de 20 millones de personas por ECV, sobre todo por cardiopatías y ACV, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte.

(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>). Por ello, los esfuerzos deben ir dirigidos no solo al tratamiento de las ECV sino a la prevención. La OMS, en la región europea, está alertando a los gobiernos para que intensifiquen los esfuerzos y desarrollen planes nacionales sobre Prevención Primaria de las ECV. Según las estadísticas europeas del 2008 para las ECV, las principales causas de muerte en Europa son las enfermedades del corazón y del sistema circulatorio. En Europa, las muertes debidas a estas enfermedades del corazón y del sistema circulatorio, cuentan con 4,3 millones cada año. Cerca de la mitad (48%) de todas las muertes son debidas a las ECV (54% de las muertes en mujeres y 43 % de las muertes en hombres) (Figura 1.6).

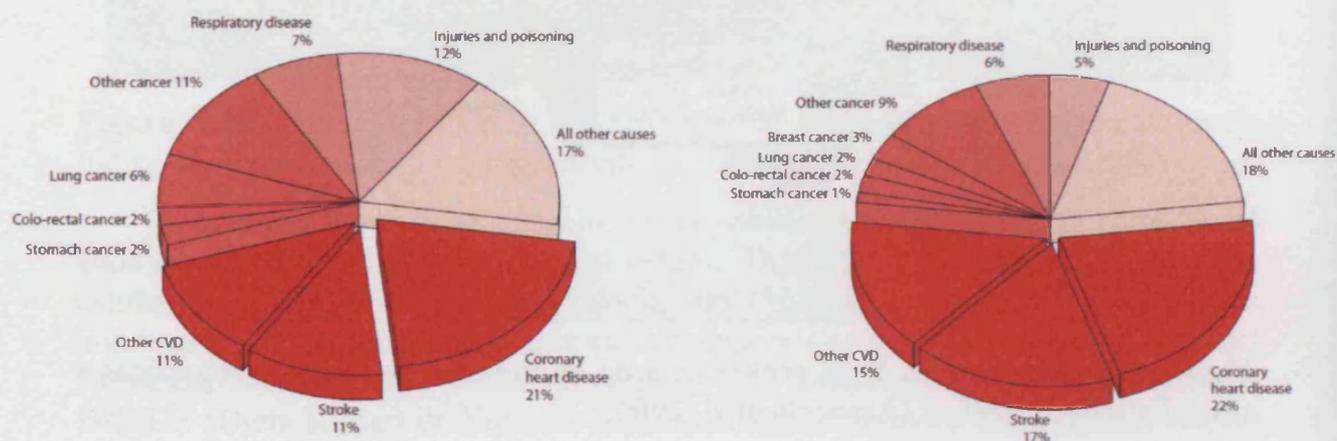


Figura 1.6 Porcentaje de causas de muerte en Europa en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) (Fuente: Steven et al, European Cardiovascular Disease Statistics, 2008).

En España según un Informe de la Sociedad Española de Cardiología (SEC) de 2009 sobre la incidencia de las ECV basado en las estadísticas del Instituto Nacional de Estadística (INE) sobre defunciones en 2007, las ECV se consolidan como primera causa de fallecimiento. Según las estadísticas del 2007, las ECV ocasionaron 124,126 muertes, lo que supone aproximadamente el 31% del total (el 28,6% varones y el 36,8% en mujeres) (INE, 2007). De igual modo, las dos grandes entidades que causan un mayor número de muertes de etiología cardiovascular son la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular. La tercera ECV que mas muertes ocasiona en España son las arritmias y otras ECV en las que se incluyen las enfermedades vasculares periféricas, después la insuficiencia cardíaca, las hipertensivas y las reumáticas (Figura 1.7).

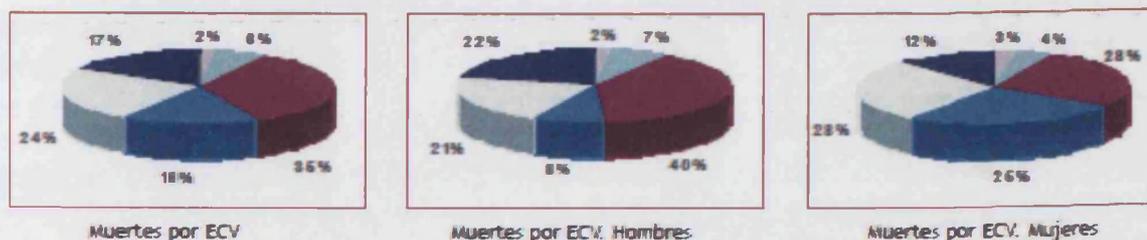


Figura 1.7 Porcentaje de muertes debidas a ECV y por sexo en España según el informe de la SEC, 2009.

La epidemia creciente de enfermedades crónicas está relacionada con cambios inapropiados en los hábitos alimentarios dirigidos hacia una dieta opulenta y desequilibrada, constituida por un consumo de alimentos muy energéticos con alto contenido de grasas saturadas además de los modos de vida, en particular, la reducción del gasto energético asociado a un estilo de vida sedentario y consumo de tabaco y alcohol, como consecuencia de los procesos de industrialización, urbanización, desarrollo económico y globalización de los mercados ocurridos en las últimas décadas (OMS/FAO, 2003). A este proceso se le conoce como transición nutricional.

Las ECV son complejas y los factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de las ECV se pueden clasificar en diferentes categorías, en función de si son modificables o no (Posner et al, 1991; Haskell et al, 2003) y de la forma en que contribuyen a la aparición de las ECV (Linton MF et al, 2003). Así, tenemos los no modificables como la edad, el sexo o los antecedentes familiares. Los factores que pueden modificarse son los niveles de colesterol, la hipertensión, el tabaquismo, la diabetes, el tipo de alimentación, la obesidad, el sedentarismo, el estrés y el consumo de anticonceptivos orales. Por otro lado, están los factores que se dan por circunstancias especiales, como el haber padecido con anterioridad un accidente cardiovascular, hipertrofia ventricular izquierda o apnea al sueño. Cuantos más factores de riesgo tenga una persona, mayores serán sus probabilidades de padecer una enfermedad cardiovascular. Algunos factores de riesgo pueden cambiarse, tratarse o modificarse y otros no. Pero el control del mayor número posible de factores de riesgo, mediante cambios en el estilo de vida y/o medicamentos, puede reducir el riesgo cardiovascular.

Entre los factores ambientales asociados a las enfermedades cardiovasculares destacan la dieta, el sedentarismo y el hábito tabáquico por su efecto sobre fenotipos intermedios y finales. La dieta es el que posee un mayor impacto sobre el metabolismo lipídico, estrés oxidativo y el desarrollo del proceso de aterosclerosis. (Ordovas et al, 2004).

El problema que ha surgido actualmente es la existencia de amplias controversias sobre cuál es la mejor dieta para la prevención y tratamiento de las ECV. Se han planteado diferentes propuestas como dieta baja en grasas, dieta baja

en hidratos de carbono y dieta rica en proteínas entre otras, todas ellas promovidas por la adquisición de conocimientos, modas, demandas o intereses comerciales (Ordovas et al, 2004).

1.1.3. OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS. IMPLICACIONES EN LA SALUD CARDIOVASCULAR

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un incremento de peso acompañado de un aumento de tejido adiposo, cuyo origen es multifactorial, ya que influyen tanto la herencia genética como factores ambientales relacionados con la nutrición y hábitos de vida. El desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético es responsable de que el exceso calórico ingerido se almacene como depósito de grasa (Loos RJ y Bouchard C, 2003). Esta enfermedad se acompaña de una serie de complicaciones que van a requerir un tratamiento de por vida, con mayor riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular y con un acortamiento de la esperanza de vida (Fontaine KR et al, 2003).

La morbilidad asociada al sobrepeso y a la obesidad se ha comprobado en muchas alteraciones de salud entre las que destacan la diabetes mellitus tipo 2, la dislipemia, la hipertensión, la enfermedad coronaria y cerebrovascular, la osteoartritis, la apnea del sueño, algunos tipos de cáncer, etc. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una relación entre la obesidad y el riesgo de enfermedad y discapacidad, poniendo de manifiesto que la grasa intraabdominal se relaciona con un elevado riesgo de morbimortalidad (Després JP, 2007).

Existen diferentes métodos de evaluación de la grasa corporal y la adiposidad que se pueden agrupar fundamentalmente en las técnicas de medición antropométrica y en otros sistemas, como el análisis de la composición corporal aunque por su complejidad técnica o por su coste, algunos solo se usan en investigación. Algunos de estos métodos son:

- **Peso, talla e IMC:** El índice de masa corporal, también conocido como índice de Quetelet o Body Mass Index, en inglés, se considera el método de referencia para el diagnóstico de la obesidad. Aunque existen distintos estudios que han mostrado una aceptable correlación entre IMC con la grasa corporal, hay que considerar las limitaciones en su medición en sujetos deportistas o musculosos o en ancianos (Fernández-Real JM et al, 2001). En España, la Sociedad Española para la el Estudio de la Obesidad (SEEDO) ofrece una clasificación más detallada delimitando distintos grados de sobrepeso y obesidad (Tabla 1.1). Es el índice más utilizado en la práctica.

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / [\text{Altura (m)}]^2$$

Tabla 1. 1 Clasificación del IMC según los criterios de SEEDO-2007 en adultos. (consenso SEEDO, 2007)

Categoría	IMC (kg/m ²)
	Valores Principales
Peso insuficiente	<18,50
Normal	18.5 - 24,9
Sobrepeso grado I	25,0-26,9
Sobrepeso grado II (preobesidad)	27,0-29,9
Obesidad de tipo I	30,0-34,9
Obesidad de tipo II	35,0-39,9
Obesidad tipo III (mórbida)	40,0-49,9
Obesidad de tipo IV (extrema)	≥50

En el estudio de la obesidad interesa saber la distribución de la grasa por su estrecha relación con las comorbilidades asociadas:

- Medida de la circunferencia o perímetro de la cintura

Se debe determinar con una cinta métrica flexible, milimetrada, con el paciente en bipedestación, sin ropa y relajado. Se debe localizar el borde superior de las crestas ilíacas y por encima de este punto rodear la cintura con la cinta métrica de manera paralela al suelo, asegurando que esté ajustada, pero sin comprimir la piel. La lectura se realizará al final de una espiración normal (Consenso SEEDO, 2007). Se considera un buen marcador del riesgo cardiovascular y metabólico. El valor de riesgo del perímetro de la cintura según las medidas del Adult Treatment Panel III (ATP-III) (Grundy SM et al, 2005) y la clasificación de la obesidad central según la International Diabetes Federation (IDF) (2005) en población europea (Alberti KG, 2005) se presentan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 Circunferencia de la cintura según los criterios de la ATP III y la IDF para definir obesidad central.

	ATP-III	IDF
Varón	≥ 102 cm	≥94 cm
Mujer	≥88	≥80

Así, según la distribución de la grasa corporal se puede diferenciar la obesidad ginoide (acumulación de la grasa en glúteos y caderas, más frecuente en mujeres) de la obesidad androide (más frecuente en varones, representado de forma física por una manzana y acumulo de la grasa visceral) donde se suele utilizar el perímetro de la cintura o el índice cintura/cadera de tal manera que se considera como punto de corte para este índice cuando este sea mayor a 0,85 en mujeres y de 1 en hombres. Las implicaciones sobre el sistema cardiovascular son distintas dependiendo de la distribución de la grasa tal y como se ha comentado anteriormente. Cuando la grasa corporal se halla sin predominio en ningún área anatómica concreta se conoce como obesidad de distribución homogénea o mixta (Vague J et al, 1987).

La grasa visceral localizada en la cintura aumenta en 3,4 veces el riesgo de padecer diabetes tipo 2; en 3,1 la hipertensión; la enfermedad cardiovascular en 2,7; y el cáncer de mama en 1,8 veces.

- **Impedancia bioléctrica o bioimpedancia:**

Es otro método para estimar la composición corporal. Esta técnica se basa en la resistencia que ofrece el agua y los tejidos corporales al paso de una corriente eléctrica, esta resistencia viene determinada por el contenido de agua y el contenido de electrolitos. Es fácil de realizar y no es una técnica invasiva. En varones adultos se considera dentro de la normalidad una composición grasa corporal entre el 12-20% del peso total mientras que en las mujeres entre el 20 y 30% del peso corporal. Se puede clasificar a los varones como obesos si presentan mas del 25% de grasa y a las mujeres mas del 33% (AACE/ACE Task Force 1998).

El uso del IMC como factor de riesgo cardiovascular ha sido debatido. El IMC falla al no considerar la distribución de la grasa corporal. El IMC no es un buen índice de la grasa visceral, la cual es la base de los desordenes metabólicos y por tanto del riesgo cardiovascular. Evidencia reciente sugiere que la circunferencia de la cintura puede ser una medida útil para evaluar el riesgo CV. Un metanálisis reciente mostró que el incremento de 1 cm en la circunferencia de la cintura incrementa el riesgo CV en 2 % (de Koning L et al, 2007).

Por otro lado, está bien establecido que los factores clásicos de riesgo cardiovascular (dislipidemia, tabaco, hipertensión, sexo, edad, historia familiar, diabetes) no pueden explicar la alta incidencia de las ECV. Más allá de los factores clásicos de ECV la obesidad parece ser también, una diana terapéutica con alta repercusión en las ECV. La obesidad ha sido asociada con resistencia a la insulina (IR), diabetes, disfunción del tejido adiposo, dislipidemia, función cardíaca, disfunción endotelial y arterosclerosis por distintos mecanismos (Marinou K et al, 2010). La obesidad induce a varias citokinas y marcadores inflamatorios que pueden contribuir a la ECV en gente con sobrepeso u obesidad. Si consideramos

además el tabaco, un factor clásico de RCV, en obesos en comparación con no obesos, disminuye la esperanza de vida. El tabaco en obesos incrementa los niveles del factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), suprimen la expresión de la adiponectina en los adipocitos lo cual predispone a la resistencia a la insulina. Incrementa el estrés oxidativo (producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)), lo cual induce la respuesta inflamatoria y por tanto la secreción de IL-6, y PCR (Figure 1.8) (Van Gaal LF et al, 2006)

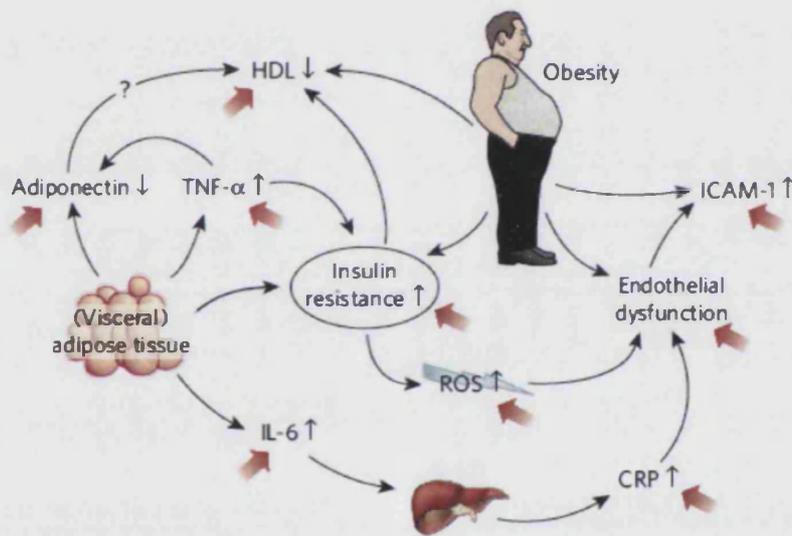


Figura 1.8 Representación esquemática de cómo la obesidad en fumadores afecta a las ECV (Van Gaal LF et al, 2006, Nature)

Por otra parte la dislipidemia en la obesidad se caracteriza por un incremento en los niveles de la VLDL, TG, colesterol total, incremento en las partículas pequeñas y densas LDL y menor HDL-C. Este perfil por sí solo es un gran promotor de daño vascular, ya que el gran flujo de ácidos grasos libres (AGL) que provocan la obesidad y la IR, tras la ingestión de alimentos, y además el incremento de la lipólisis y el no proporcional incremento de la lipogénesis que se produce en el estado de resistencia insulínica, pone al hígado frente a una gran disponibilidad de fuente energética, y estos AGL estimulan entonces la síntesis de VLDL, ricas en TG. Este aumento de las VLDL trae consigo una disminución de las HDL, porque en presencia de la proteína de transferencia de esterios de colesterol (CETP) está estimulada la transferencia de TG de las VLDL a las HDL en intercambio con el colesterol de estas. Las HDL resultantes, enriquecidas en TG, son un buen sustrato para la lipasa hepática que hidroliza los TG, y quedan unas HDL pequeñas (Van Gaal LF et al, 2006) (Figura 1.9).

Además del exceso de grasa corporal, la acumulación abdominal de grasa incrementa independientemente el RCV. La circunferencia de la cintura refleja la grasa abdominal y predice el riesgo de diabetes, infarto y mortalidad cardiovascular en individuos de edad media (Rexrode KM et al, 1998). La grasa visceral no solo está asociada con cambios cuantitativos en lípidos sino también con cambios cualitativos en lipoproteínas tales como las pequeñas partículas y densas LDL que conllevan a una mayor IR que la grasa subcutánea. La figura 1.9 muestra algunos de los mecanismos activados durante exceso de grasa visceral, obesidad e IR.

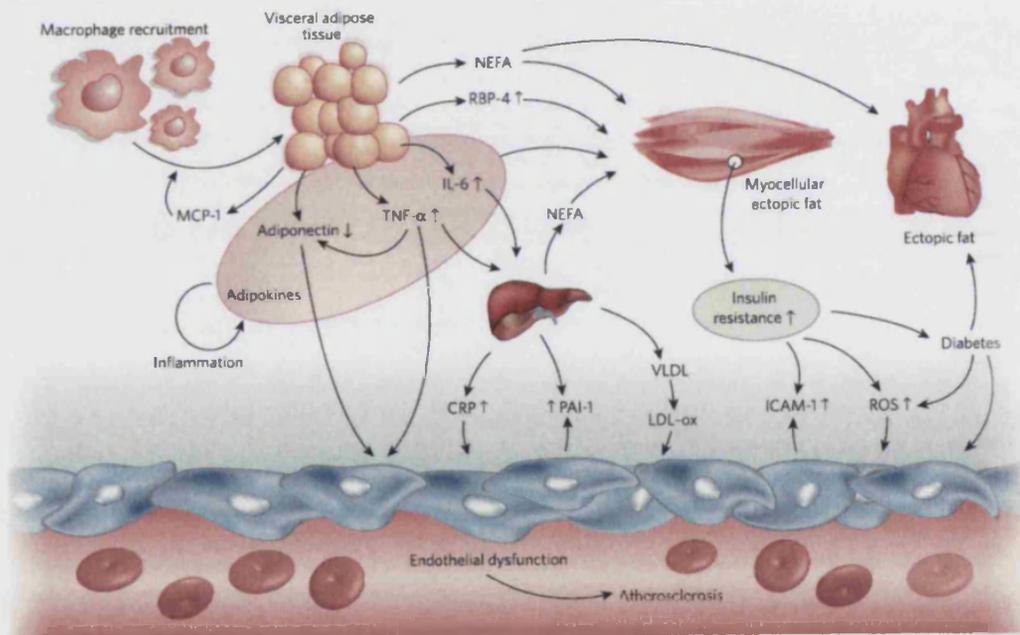


Figura 1.9 Tanto el exceso de grasa visceral como la insulino resistencia (IR) contribuyen a la ECV en la obesidad. La grasa visceral contribuye a la disfunción endotelial con un efecto directo en las adipocinas, las cuales son secretadas por el tejido adiposo. La IR inducida por las citocinas (IL-6, TNF-alfa, y adiponectina), los AGL y la RBP-4 inducen el estrés oxidativo y la subsecuente disfunción endotelial (PAI-1 y ICAM-1). Esto conlleva una disfunción endotelial y prematuro proceso aterosclerótico (Van Gaal LF et al, 2006, Nature)

Por otro lado, tanto estudios de intervención como estudios prospectivos han demostrado que la pérdida moderada de peso (10%) es efectiva en el tratamiento de la hipertensión, diabetes y dislipidemia (Mertens IL et al, 2000; Avenell A et al, 2004). Una revisión sistemática indicaba que la pérdida de peso de 10 kg estaba asociada con una disminución de la tensión diastólica de 3.6 mmHg y una pérdida del 10% de peso con una disminución de la tensión sistólica de 6.1 mmHg (Avenell A et al, 2004). La reducción de peso también tiene un efecto favorable en la

dislipidemia. Así, en general, una pérdida de peso entre 5-10% puede producir una reducción del 15% de LDL-c, 10-30 % en la concentración de TG, 8-10% incremento de HDL-C. (Avenell A et al, 2004)

1.1.4. ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES. IMPORTANCIA DEL METABOLISMO LIPÍDICO Y LAS CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS

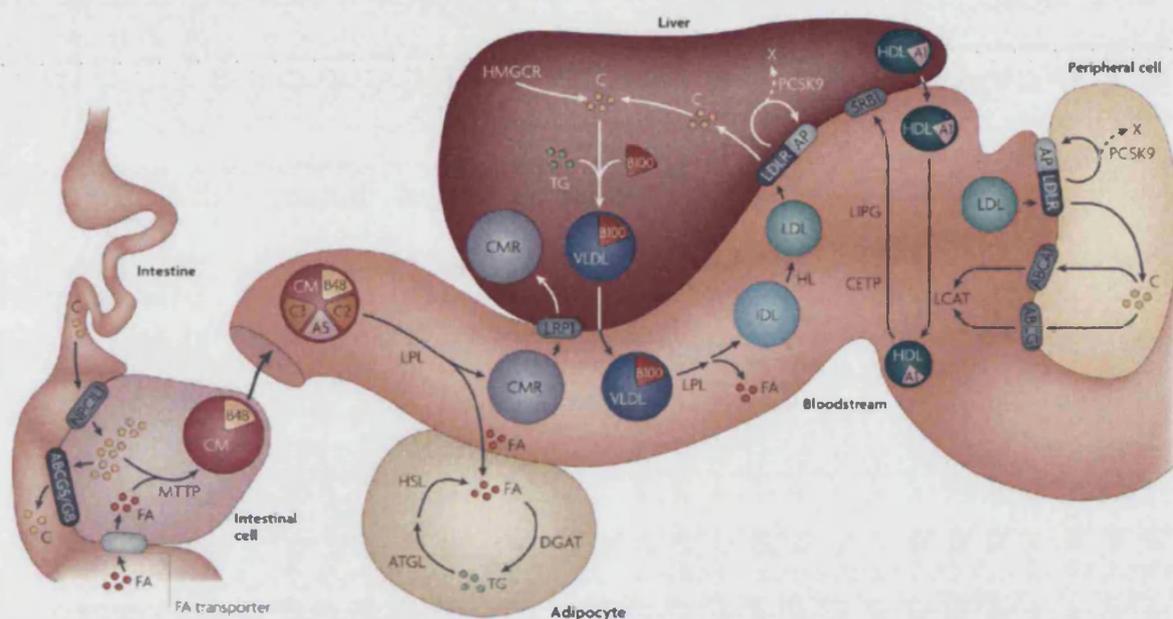
El metabolismo de las lipoproteínas comprende complejas rutas metabólicas. Las lipoproteínas son complejos macromoleculares de lípidos y proteínas que se originan principalmente en el hígado e intestino y están envueltas en el transporte y redistribución de los lípidos en el organismo. Están constituidas por triglicéridos y ésteres de colesterol, rodeados de fosfolípidos, colesterol no esterificado y proteínas. Las lipoproteínas plasmáticas sirven de transporte a los lípidos insolubles en el plasma y los transportan desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y desde estos devuelven el colesterol al hígado para que éste sea eliminado en forma de sales biliares. Fundamentalmente hay cuatro tipos de lipoproteínas en el plasma: 1) los quilomicrones, transportan principalmente triglicéridos, además de colesterol y vitaminas liposolubles, desde el intestino delgado al resto del organismo. 2) Las VLDL o lipoproteínas de muy baja densidad están compuestas también de triglicéridos y colesterol. Transportan los triglicéridos sintetizados en el hígado a partir de hidratos de carbono a otros tejidos. Cuando llegan a los mismos dejan los triglicéridos allí, con lo que queda una lipoproteína pobre en triglicéridos pero rica en colesterol, que se llama 3) LDL. El principal componente de la LDL es el colesterol. 4) Por último el HDL o lipoproteínas de alta densidad, transportan el colesterol en exceso desde las células de todo el organismo al hígado para ser eliminado con la bilis en las heces. La cascada del metabolismo lipídico se subdivide en tres pasos: ruta exógena, endógena y el transporte inverso del colesterol. Exógenamente la grasa proveniente de la dieta (aproximadamente representa entre el 30-40 % de la dieta) y el colesterol (cuya homeostasis está regulada por un equilibrio entre la absorción del colesterol dietético, la síntesis de nuevo y excreción fecal) es emulsionado por los ácidos biliares y absorbido en el intestino delgado en forma de quilomicrones (formados principalmente por TG, algo de colesterol y de APO B-48). Estos son secretados al conducto linfático donde son metabolizados por el enzima lipoproteín lipasa (LPL) formando ácidos grasos libres que son captados por las células. Los quilomicrones “remanentes” son retirados de la circulación por receptores hepáticos llamados receptores relacionado con la LDL (LDLR).

El colesterol del organismo tiene dos orígenes, endógeno y exógeno. Aunque casi todas las células tienen capacidad para sintetizar este esteroide, la mayor parte tiene origen hepático. El precursor para su síntesis es el acetil-CoA procedente de la mitocondria, el cual se transforma en citrato y difunde hacia el citosol donde

sufre una serie de reacciones hasta formar colesterol. La síntesis endógena de colesterol está regulada por el enzima HMGCoA-reductasa. El colesterol total (CT), triglicéridos (TG), fosfolípidos y apolipoproteínas producidas en el hepatocito son llevados a la circulación formando parte de las VLDL, los cuales son estimulados por carbohidratos, grasas, alcohol y enfermedades como la diabetes mellitus. La hidrólisis de la VLDL se lleva a cabo por la LPL formando ácidos grasos libres y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Estos a su vez son captados en el hepatocito por receptores de Apolipoproteínas B y E o por acción de la hepático triglicérido lipasa (HTGL) para formar LDL (Corella et al, 2005).

Las LDL, cuando están en exceso depositan el colesterol en las paredes de las arterias y, mediante un proceso complicado, provocan una lesión, llamada ateroma o placa ateromatosa. Estas placas son las que producen una alteración denominada arterioesclerosis, obstaculizando el flujo de saNEGR e impidiendo el buen riego de los tejidos, lo que da lugar a la enfermedad cardiovascular. Cuanto más alta es la concentración de LDL más alto es el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por el contrario las HDL actúan impidiendo los depósitos de grasa en las paredes arteriales al retirar el colesterol en exceso desde los tejidos y facilitando su excreción por la bilis a las heces. Por tanto, protegen de la enfermedad cardiovascular.

Por otro lado, la mayoría de nuestro conocimiento sobre la relación entre las concentraciones de lípidos y las enfermedades cardiovasculares provienen de estudios realizados en estado de ayunas. En estado postprandial los lípidos son ingeridos para posteriormente ser absorbidos e ingresar en el organismo en forma de quilomicrones, tal y como se ha explicado anteriormente. Estos se dirigen al tejido adiposo donde se depositan los triglicéridos que contienen. Además, en el hígado, a partir de la glucosa de la dieta, se forman triglicéridos. Estos lípidos de síntesis endógena se liberan al torrente circulatorio incorporándose a las VLDL que alcanzan el tejido adiposo depositando los TG y formando LDL ricas en colesterol. Niveles aumentados de triglicéridos en el estado postprandial, son hidrolizados por la enzima lipoproteína lipasa. El aumento de los productos de degradación, o remanentes de partículas de lipoproteínas son altamente aterogénicas y cuando se exponen al endotelio vascular pueden ser causa de la arteriosclerosis asociada con este estado. Además, la hipergliceridemia está asociada con aumento de partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos, llevando a la formación de pequeñas partículas densas de LDL lipoproteína. A medida que las partículas disminuyen de tamaño, el número de ellas aumenta. Un número aumentado de apolipoproteína B contenida en las partículas ha sido asociado con aumento del riesgo de ECV. Además, la disminución de los niveles de proteína lipasa asociada con el estado diabético o de resistencia a la insulina puede contribuir también a la elevación de los triglicéridos (Araki et al, 2004) (Figura 1.10 y 1.11).



Nature Reviews | Genetics

Figura 1.10 Metabolismo de las lipoproteínas como papel principal de la aterogénesis. (Hegele RA. Nature Genetics, 2009)

Por tanto, cuando existe hipertrigliceridemia se altera la composición de estas lipoproteínas y no todas las VLDL llegan a LDL y pueden ser procesadas por el receptor. Al convertirse en partículas anormales, deben ser fagocitadas por la vía alternativa de los macrófagos, convirtiéndose, por tanto, en células espumosas que tienen un papel destacado en la patogenia de la arterosclerosis. Una de las patologías destacadas de la elevación de los triglicéridos en sangre, es la hipertrigliceridemia familiar. Esta se caracteriza por la acumulación en plasma de lipoproteínas VLDL sintetizadas en el hígado de mayor tamaño de lo normal y con mayor contenido en triglicéridos, pero no necesariamente de un aumento significativo de apolipoproteína B100. En la hipertrigliceridemia familiar, las VLDL grandes son metabolizadas de forma deficiente por la enzima LPL. Además, el alargamiento de la vida media de las VLDL favorece la transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL hacia las VLDL, proceso mediado por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP), y que explica las concentraciones bajas de colesterol de HDL característica de esta enfermedad. La lipólisis defectuosa de las VLDL provoca una menor formación de las LDL con lo que el colesterol LDL de los pacientes con hipercolesterolemia familiar es habitualmente bajo. Este hecho ayuda a diferenciar esta alteración de la hiperlipemia familiar combinada, en la que el colesterol LDL suele hallarse elevado.

Más recientemente se ha descubierto una nueva apolipoproteína, la apolipoproteína A5, y su implicación en el metabolismo de los triglicéridos. De

hecho, algunos estudios indican que APOA5 reduce la concentración sérica de TG por estimulación de lipoproteína lipasa mediada por la hidrólisis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TG) y por inhibición de la producción de VLDL-TG en hígado (Schaap et al, 2004; Fruchart-Najib et al, 2004; Merkel et al, 2005). Por lo que concentraciones bajas en suero o incluso alteraciones genéticas en el gen de la APOA5 que codifica dicha proteína, pueden estar relacionadas con concentraciones de triglicéridos alterada.

Por otro lado, la relación inversa entre las concentraciones de HDL-C y el riesgo de enfermedad cardiovascular ya se ha consolidado como un dato clásico sustentado en estudios epidemiológicos y clínicos (Sharret et al, 2001; Assman et al, 1996). Incluso se ha llegado a considerar que cifras bajas de HDL-C puede predecir mejor el riesgo de enfermedad cardiovascular que altas de LDL-C (Sacks et al, 2002). Además, tal y como se ha observado en el estudio Copenhagen City Heart Study y en el Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study, cuando coexiste hipertrigliceridemia con bajos niveles de HDL-C conlleva un riesgo mayor que cuando la hipertrigliceridemia se asocia con valores intermedios de HDL-C.

Actualmente se está concediendo una gran importancia a las concentraciones elevadas de triglicéridos como factor de riesgo cardiovascular y se están potenciando iniciativas para aumentar la detección y control de la hipertrigliceridemia en España. Un ejemplo de ello es el recientemente creado Registro de Hipertrigliceridemia auspiciado por la Sociedad Española de Arteriosclerosis. Dicho registro comenzó a funcionar en 2007 y a final de 2008 se cerró la admisión de nuevos casos estando actualmente en periodo de análisis de los pacientes incluidos.

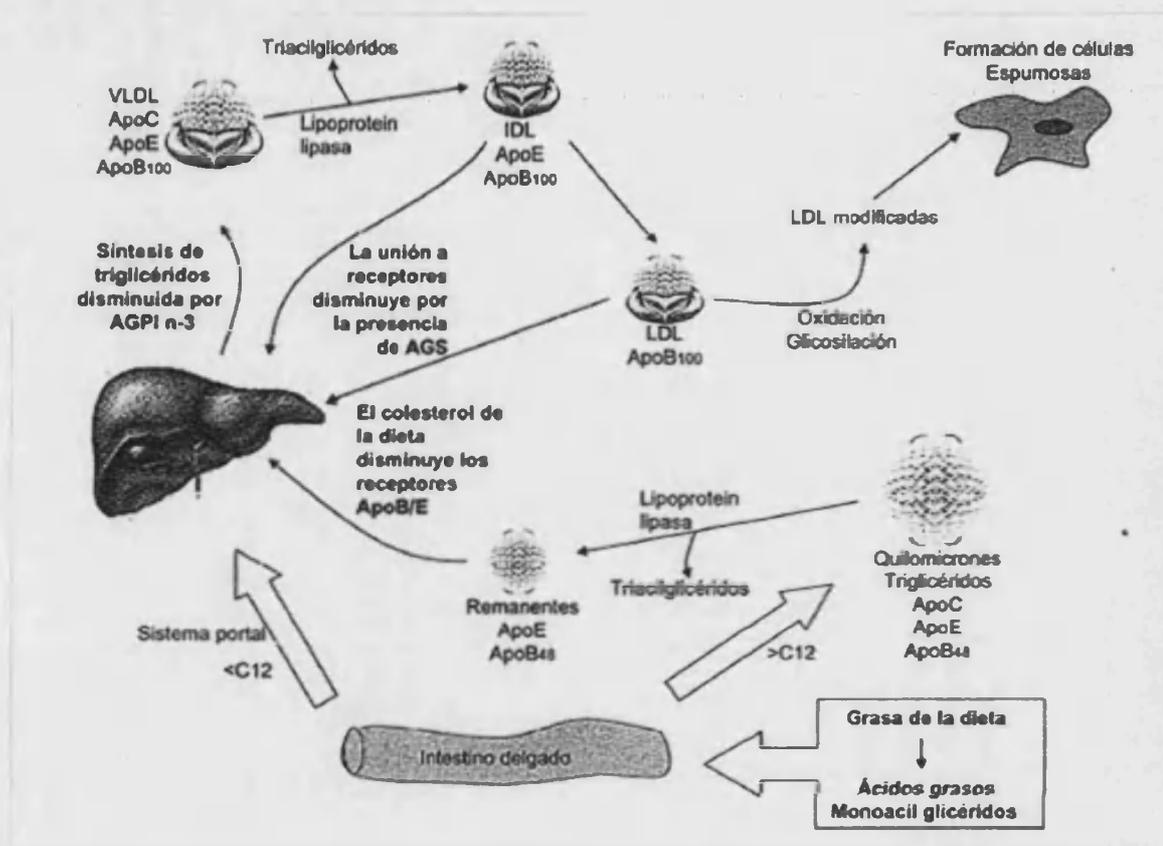


Figura 1.11 Metabolismo de las lipoproteínas (Mesa García et al, 2006)

1.2. FACTORES AMBIENTALES DE LA OBESIDAD Y ECV

1.2.1. DIETA

1.2.1.1. DIETA EN LA OBESIDAD

En el tratamiento de la obesidad el plan de alimentación y la actividad física son pilares fundamentales para conseguir un balance energético negativo. La restricción energética de 500 a 1.000 kcal/día respecto a la dieta habitual se traduce en una pérdida ponderal de 0,5-1,0 kg/semana, lo que representa un promedio de un 8-10% del peso corporal inicial a lo largo de 6 meses (Salas-Salvado J et al, 2007). Esta restricción no debería comportar un aporte calórico por debajo de 1.000-1.200 kcal/día en mujeres y 1.200-1.600 kcal/día en varones. Dado que el objetivo es mantener la reducción ponderal a largo plazo, el tratamiento dietético deberá mantenerse de por vida. En cuanto a la distribución de macronutrientes, existen notables divergencias entre los porcentajes más apropiados que administrar para conseguir una pérdida de peso eficaz a largo plazo. Las dietas bajas en hidratos de carbono han gozado de gran popularidad por su eficacia a la hora de adelgazar rápidamente. La cetosis asociada a estas dietas conduce a diuresis

excesiva por pérdida de sodio, con disminución acusada de agua intra y extracelular, que se traduce en una disminución llamativa de peso. Recientemente, ensayos clínicos controlados han verificado que este tipo de dietas son muy eficaces en la pérdida de peso a corto plazo (6 meses) sin repercusión en el perfil lipídico ni en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, a largo plazo (12 meses) la eficacia resulta similar a la de las dietas bajas en grasas (Nordmann et al, 2006). Tampoco con las dietas bajas en grasa (< 30% de la energía) se consigue una pérdida de peso a largo plazo superior a la de otras dietas. Por otro lado, en el caso de la mayoría de las dietas extremas es muy importante el número de pacientes que las abandonan con el tiempo. Por ello, el objetivo de la planificación alimentaria es conseguir que el paciente se ciña a ella durante el mayor tiempo posible y que la variedad de alimentos que se ofrezcan permita establecer una planificación educativa con suficiente margen para que la persona asimile las modificaciones propuestas y cumpla el plan dietético con el mínimo esfuerzo.

1.2.1.2. DIETA EN LA ENFERMEDAD CARDIOVACULAR

La dieta es el factor ambiental que posee un mayor impacto sobre el metabolismo lipídico, estrés oxidativo y el desarrollo del proceso de aterosclerosis (Grundt SM, 2001). Sin embargo, existe una amplia controversia acerca de cual es la dieta óptima para la prevención y tratamiento de las ECV (Chahoud G et al, 2004).

Tradicionalmente la American Heart Association (AHA) ha basado sus recomendaciones dietéticas para la prevención primaria de riesgo cardiovascular en una dieta baja en grasa (Krauss MR et al, 2000). Esta dieta también se basa en la reducción de todos los tipos de grasa de modo, que la contribución de la grasa total de calorías ingeridas debe ser menor al 30% y de la grasa saturada menor al 10 % y, además, una ingesta de colesterol diaria menor a 300 mg. Este tipo de dieta produce una disminución del CT y del LDL-C, aunque también disminuye o no produce variación en el HDL-C y aumenta o no cambia las concentraciones de TG (Obarzanek U et al, 2001; Lichtensein AH et al, 2002; Howard BV et al, 2006. Otros resultados también han mostrado que aumenta la carga glicémica lo que podría influir en el desarrollo de obesidad o diabetes (Menski RP et al, 1992). En 2005 surgió una nueva versión con un nuevo formato de la pirámide de la USDA en el que los grupos de alimentos se presentan en vertical e incorpora el concepto de que la dieta debe adecuarse a las necesidades individuales (USDA, 2005).

Tras las recomendaciones de la AHA han surgido numerosos tipos de dietas tales como las dietas ricas en proteínas, bajas en carbohidratos, dieta mediterránea, etc., promovidas por la adquisición de modas, conocimiento o intereses. La que mas interés ha despertado por su gran relevancia en cuanto al papel protector en las ECV es la dieta mediterránea como alternativa más saludable para la prevención

primaria y secundaria de ECV. Para la dieta mediterránea se dedica un apartado posterior en esta tesis.

1.2.2. ACTIVIDAD FÍSICA

1.2.2.1. ACTIVIDAD FÍSICA EN LA OBESIDAD

En la lucha por el control del peso y la buena salud en general, se da mucha importancia al tipo y cantidad de alimentos y bebidas que se consumen. Se ha prestado menos atención a la cantidad de energía que gastaríamos si fuéramos físicamente activos. Pero ambos aspectos están estrechamente ligados. Se ha demostrado que aproximadamente el 70% de la población en los países occidentales no es lo suficientemente activa como para poder gozar de una buena salud y mantener el peso.

Para mantener el peso es necesario que haya un equilibrio entre la energía que se gasta y la energía que se consume. La obesidad se desarrolla cuando se consume más de lo que se gasta durante un determinado periodo de tiempo. Se piensa que la obesidad es consecuencia directa de los cambios que se han dado en nuestro entorno, entre ellos la disponibilidad de instrumentos que ahorran trabajo, el transporte motorizado, entretenimientos sedentarios como ver la televisión, y un acceso más fácil a alimentos ricos en calorías a un menor precio. Existen varios estudios que demuestran que se puede prevenir la obesidad llevando un estilo de vida activo y manteniéndose en forma. En particular, parece que la actividad evita el aumento de peso que se suele dar en personas de mediana edad.

Por otra parte, las personas obesas o con sobrepeso pueden adelgazar practicando ejercicio, si lo combinan con una dieta hipocalórica (baja en calorías), pudiendo mejorar su composición corporal, ya que se conserva el tejido muscular y aumenta la pérdida de grasa (Slentz CA et al, 2004; Ross R et al, 2000). La actividad física también es efectiva para reducir la grasa abdominal, que se asocia con un incremento del riesgo de padecer diabetes o enfermedades cardíacas (Fogelholm, M et al, 2000; Ross R et al, 2000; Slentz CA et al, 2004). Además, las personas que hacen regularmente ejercicio tienen más posibilidades de mantener la pérdida de peso a largo plazo (Fogelholm, M et al, 2000; Ross R et al, 2000)

Otra ventaja que tiene la actividad física para las personas obesas es su efecto sobre su perfil de riesgo. Se ha comprobado que las personas obesas que logran mantenerse activas y en forma reducen el riesgo a padecer afecciones cardíacas y diabetes, hasta niveles parecidos a los de las personas no obesas (Schrauwen P, 2007). Esto demostraría que no es poco saludable estar obeso, siempre que se esté en forma.

En cuanto a las recomendaciones de actividad física en el paciente obeso, existe evidencia de que 30 minutos diarios de actividad física de intensidad moderada podría mejorar la salud, pero la cantidad de actividad necesaria para el control del peso debería ser más de 30 minutos/día (Jakicic JM et al, 2005).

1.2.2.2. ACTIVIDAD FÍSICA EN LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades coronarias son la principal causa de muerte en Europa. Llevar un estilo de vida activo, con un nivel moderadamente alto de ejercicios aeróbicos, puede reducir las posibilidades de contraer enfermedades cardíacas graves o morir por su causa (Andersen LB et al, 2000, Bijnen FC, et al, 1999). Los beneficios que el ejercicio aporta a la salud, pueden notarse si se realizan actividades físicas moderadas, y son más evidentes en las personas sedentarias que cambian sus hábitos y se vuelven más activas (Boraita A, 2008). Actividades, como caminar, montar en bicicleta con regularidad o realizar cuatro horas a la semana de ejercicio físico, reducen el riesgo de padecer afecciones cardíacas (Wessel TR et al, 2004; Yusuf S et al, 2004). También se ha comprobado que la actividad física ayuda a recuperarse de las enfermedades cardíacas, mediante programas de rehabilitación que se basan en el ejercicio, y resultan eficaces para reducir el peligro de muerte (Berlin JA et al, 1990; Bijnen FC et al, 1999). El ejercicio disminuye la incidencia de muerte por cualquier causa como la de origen cardiovascular (Wannamethee SG et al, 2000; Clark AM et al, 2005). Los efectos de la actividad física en los accidentes cerebrovasculares están menos claros, ya que las conclusiones de los diferentes estudios son contradictorias (Lee CD et al, 2003).

Por otro lado, el ejercicio físico, también se asocia con mejor perfil lipídico (reducción del LDL-C, TG, aumento del HDL-C (Boraita A, 2004, Leon AS et al, 2001; Leon AS et al, 2002). Además estudios de intervención han puesto de manifiesto que el aumento de la actividad física ejerce efectos en la calidad de vida y la supervivencia ya que mejora la fuerza y la resistencia muscular, favorece el manejo del estrés, ayuda a conciliar el sueño y a combatir la ansiedad o la depresión (Lawlor, DA et al, 2001; Boraita A, 2008).

Por todo ello, las recomendaciones para realizar ejercicio físico han pasado a ser un elemento fundamental en las campañas educativas para prevenir las ECV tanto en adultos como mayores de 65 años o adultos entre 50 y 64 años y en niños. Una de las preguntas más cuestionadas es qué tipo, duración de actividad física es el más recomendable para prevenir las ECV (Aros F et al, 2000; Pate RR et al, 1995). Existen muchos estudios que han intentado identificar la intensidad y el tiempo de la actividad física más adecuada. Las recomendaciones más aceptadas son las realizadas por la *American College of Sport Medicine* y la *American Heart*

Association que establecen la intensidad, duración, frecuencia, tipo de actividad para promover y mantener la salud, reducir las enfermedades crónicas y las muertes prematuras en función del grupo de edad.

1.2.3 OTROS FACTORES

1.2.3.1 TABACO

El tabaquismo, es un hábito tóxico socialmente adquirido que interviene en varias enfermedades. Se conoce desde hace años que el tabaco incrementa hasta cuatro veces el riesgo de padecer ECV; además de ejercer un efecto potenciador de otros factores de riesgo cardiovascular como la hipercolesterolemia o la hipertensión (Chen Z et al, 2002) además de disminuir la esperanza de vida en obesos y producir alteraciones metabólicas (Van Gaal LF et al, 2006).

En el humo del tabaco, existen más de 4.000 sustancias en fase gaseosa o en forma de partículas como los hidrocarburos poliaromáticos, aldehídos, n-nitrosaminas y otros compuestos inorgánicos y orgánicos. La nicotina es un alcaloide líquido, incoloro, volátil, soluble y extremadamente tóxico que es capaz de elevar la presión arterial y aumentar el gasto cardíaco, incrementar los ácidos grasos libres en el suero y la secreción de cortisol. La nicotina y el monóxido de carbono, han sido los más vinculados a la lesión inicial del endotelio; además producen un aumento del hematocrito y de la viscosidad sanguínea, aumentando el riesgo isquémico. El tabaquismo se ha asociado además a una reducción de los niveles de HDL-C (colesterol bueno), incremento de los triglicéridos séricos, del fibrinógeno plasmático. Asimismo, produce un incremento de la adhesividad y estimula la vasoconstricción coronaria. Los pacientes fumadores pueden presentar una rotura "prematura" de la placa aterosclerótica (Leone A et al, 2010). El hábito de fumar constituye un factor de riesgo independiente de primer orden para el IAM y podría considerarse como el principal factor modificable de los asociados a cardiopatía coronaria (Leone A et al, 2010)

1.2.3.2 FACTORES SOCIODEMOGRÁFICOS

Más de 80% de las defunciones causadas por las ECV en el mundo se producen en los países de ingresos bajos y medianos. Los habitantes de dichos países están más expuestos a los factores de riesgo que desembocan en las ECV y otras enfermedades no transmisibles y carecen de acceso a los métodos preventivos que se aplican en los países de ingresos altos. Los habitantes de los países de ingresos bajos y medianos aquejados de ECV y otras enfermedades no transmisibles tienen un menor acceso a servicios de asistencia sanitaria eficientes y equitativos que respondan a sus necesidades (en particular, los servicios de detección temprana) lo cual conlleva un mayor riesgo de ECV (OMS, 2011). Además, existe un incremento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad entre los

grupos con menor poder adquisitivo y con menor nivel educativo (Jones-Smith JC et al, 2011).

1.2.3.3 DEPRIVACIÓN DEL SUEÑO

El sueño es esencial para la vida y es la base de numerosas funciones fisiológicas y psicológicas, como la reparación de los tejidos, el crecimiento, la consolidación de la memoria y el aprendizaje. Aunque no todas las personas adultas necesitan el mismo número de horas de sueño, los expertos consideran que dormir menos de 7 horas por noche de forma continuada puede tener consecuencias negativas para el organismo y el cerebro. Los estudios epidemiológicos y de laboratorio realizados indican que la falta de sueño puede desempeñar un papel en el aumento de la prevalencia de la obesidad y las ECV (Huang W et al, 2011; Cizza G et al, 2011). La privación de sueño está relacionada con diversos cambios adversos de la actividad metabólica: aumentan los niveles de cortisol (una hormona implicada en la respuesta al estrés) en sangre, la respuesta inmune se ve afectada, disminuye la capacidad del organismo de procesar glucosa y el control del apetito se altera. Esta constatación sugiere que la privación de sueño es un factor de riesgo de padecer obesidad.

1.2.3.4 ESTRÉS

El estrés y las conductas Tipo A se han clasificado como factores de riesgo que, en mayor o menor medida, favorecen la aparición de trastornos cardiovasculares. El estrés obliga al corazón a trabajar más intensamente. Las coronarias, que nutren al músculo cardíaco, requieren mayor aporte energético. Además, la sangre se espesa y las arterias se vuelven menos reactivas o elásticas; se acumulan así sustancias nocivas en su pared, de forma que la sangre circula con mayor dificultad. A su vez, la fibrinólisis, que es el mecanismo defensivo que destruye los trombos, pierde efectividad. Por tanto, nuestro sistema cardiovascular se hace vulnerable ante cualquier obstrucción y/o trombosis aguda o crónica de la placa aterosclerótica (Chandola T et al, 2008). Además, se ha visto que el estrés crónico está directamente asociado con la aparición de la obesidad, fundamentalmente con la obesidad abdominal. Aunque pueden ser varios los mecanismos implicados en la obesidad asociada al estrés, es fundamentalmente una hormona, el cortisol, el principal nexo de unión entre estrés y obesidad (Rosmond R, 2005).

1.3. FACTORES GENÉTICOS DE LA OBESIDAD Y ECV

1.3.1. FACTORES GENÉTICOS DE LA OBESIDAD

Existen evidencias cada vez mayores de que variaciones en el IMC están genéticamente determinadas (Chung y Leibel, 2008). La importancia de la contribución genética en la obesidad ha dado lugar a la búsqueda de los genes responsables que permitan entender mejor las rutas metabólicas y las redes implicadas en el control de la composición corporal en humanos. Los análisis genéticos clásicos llevados a cabo en familias y gemelos han mostrado claramente que existe una contribución genética a la obesidad (Maes et al, 1997; Stunkard et al, 1990). Algunas de las estimaciones más directas de la importancia relativa de las influencias genéticas sobre el IMC se derivaron de estos estudios iniciales llevados a cabo en gemelos. Así, los coeficientes de correlación de los valores de IMC de gemelos idénticos criados por separado fueron de 0,70 para hombres y de 0,66 para las mujeres. Estas estimaciones fueron ligeramente inferiores a la de los gemelos criados juntos (Stunkard AJ et al, 1990). Compartir el mismo ambiente de la niñez no contribuyó a la similitud del IMC de gemelos en la etapa adulta. Las influencias genéticas sobre el IMC en estos estudios quedaron claramente manifiestas. Por otra parte el IMC de niños adoptados es más similar al de sus padres biológicos, aunque no tengan contacto directo con ellos, que al de sus padres adoptivos (Cummings DE y Schwartz MW, 2003; Hinney A et al, 2010). En la actualidad, se estima que los factores genéticos contribuyen en un 40-70% en la variación de la adiposidad en humanos (Chung y Leibel, 2008).

Sin embargo, el primordial papel de los factores genéticos en la regulación del peso corporal parece, en principio, difícil de compaginar con el incremento de la obesidad en humanos durante los últimos años. Claramente, la adiposidad no es un parámetro predeterminado solo genéticamente. La evidencia científica parece indicar que la obesidad es una enfermedad poligénica cuya expresión va a ser modulada por numerosos genes, que interactúan entre ellos y con condicionantes ambientales como el tipo de alimentos, el ejercicio físico, etc.

El alarmante incremento de la obesidad ha propiciado el estudio y la búsqueda de los genes responsables de la obesidad. Existen dos estrategias básicas para el estudio genético de la obesidad en humanos: estudios de asociación en genes candidatos y análisis de ligamiento. Otra estrategia que ha sido desarrollada más recientemente es la basada en los estudios de asociación del genoma completo "Genome Wide Association Studies (GWAs)". Los estudios de asociación son importantes en la identificación de genes candidatos que tienen una pequeña contribución a la obesidad. Los **estudios de ligamiento** están basados en la identificación de algunas zonas cromosómicas, o locis a través del abordaje de genes candidatos o barridos genómicos (marcadores tipo microsatélite a lo largo de

todo el genoma). Los estudios de ligamiento se basan en la búsqueda de “loci” de enfermedad mediante la cosegregación de marcadores genéticos distribuidos a través del genoma junto con la enfermedad entre familias. Así, tal y como se resume en la última versión del Mapa Genético de la Obesidad Humana, hay 253 QTLs (regiones) identificados en 61 genome wide scan. 52 de estos intervalos genómicos han sido replicados en dos o más estudios. Hasta la fecha, 127 genes han sido asociados con fenotipos relacionados con la obesidad (Rakinen T et al, 2006). Sin embargo, los análisis de ligamiento han resultado útiles para la identificación de genes de enfermedades de transmisión mendeliana en varias generaciones pero no son tan efectivos para la identificación de genes que participan en enfermedades complejas como la obesidad (Marti et al, 2004).

Recientes progresos en la tecnología de genotipado con las plataformas de genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido junto con los avances en el conocimiento de las variaciones genéticas en el genoma humano por el Consorcio Internacional Hap Map han conducido a **estudios de asociación del genoma completo o Genome Wide Association Studies (GWAs)** para el estudio de enfermedades complejas. Así, en el primer GWA de obesidad, Herbert et al, 2006 genotipó 116,204 SNP entre 694 individuos de la cohorte del estudio Framingham identificando un SNP cerca del gen *INSIG2* asociado con la obesidad en la adolescencia. Desde esa fecha se han identificado miles de SNPs que podrían contribuir a la obesidad, sin embargo se necesitan estudios de replicación en varias cohortes que establezcan asociaciones sólidas.

Además de la contribución genética a la obesidad, los cambios en los estilos de vida cada vez mas occidentalizados, son una buena ilustración del concepto interacción gen-ambiente. Parece claro que junto con la genética, los dramáticos cambios en los estilos dietéticos estén jugando un papel importante en el exceso de adiposidad. Cada vez son más numerosos los artículos que se publican acerca del estudio de posibles variantes asociadas a la obesidad y su posible modulación genética. El estudio de la nutrigenética o la interacción gen-ambiente es la que nos permitirá en un futuro el tratamiento de la obesidad de una manera personalizada.

La búsqueda de los genes de la obesidad humana comenzó hace varias décadas pero los esfuerzos se han intensificado en los últimos años con la culminación del Proyecto Genoma Humano en 2003 y los avances en biología molecular, tecnología de genotipado y métodos de epidemiología genética. Con la secuenciación del genoma se determinó la secuencia de más del 90% de los 3200 millones de nucleótidos en el genoma humano y se desarrolló el mapa de los aproximadamente 40000 genes que lo forman estimándose que unos 1400 genes son causantes de enfermedades monogénicas (Jimenez-Sanchez G et al, 2001). Además se demostró que el 99,9% de la secuencia es compartida por los seres humanos, y solo el 0,1% presenta una variabilidad individual.

La identificación de genes que causan enfermedades a través de análisis de genética molecular es relativamente sencilla para las enfermedades de origen **monogénico** ya que siguen un patrón de herencia mendeliano simple donde un solo gen es causante la enfermedad. Sin embargo, la complejidad reside en determinar los genes responsables de **enfermedades poligénicas** (diferentes genes en distintas posiciones del genoma ejercen su influencia sobre una enfermedad).

A través de estudios tanto en gemelos como en niños en adopción se han estudiado defectos genéticos relacionados con el desarrollo de la obesidad. En la investigación de la genética de la obesidad en humanos se pueden identificar tres tipos de estrategias: estudio de síndromes pleiotrópicos mendelianos con manifestación clínica de obesidad, búsqueda de mutaciones que produzcan obesidad de tipo monogénico y estudio de las causas de obesidad de origen poligénico. Este último se puede realizar mediante la búsqueda de genes candidatos o mediante técnicas de barrido genómico o por GWAs como se ha explicado anteriormente.

1.3.1.1 GENES DE IMPLICADOS EN LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

1.3.1.1.1 SÍNDROMES PLEITRÓPICOS O TRASTORNOS SINDRÓMICOS DE LA OBESIDAD

Estos síndromes son el resultado de anormalidades cromosómicas, muy poco frecuentes con un patrón de herencia mendeliano, caracterizado por fenotipos muy severos. Se clasifican en tres tipos: autosómicos dominantes (como el síndrome de Prader-Willi atribuido a una deleción en el cromosoma 15 y caracterizado por hipotonía, retraso en el crecimiento, baja estatura, obesidad), autosómicos recesivos (Alston, Bradet-Biedl, Cohen) y síndromes ligados al cromosoma X (Bojeson, Simpson, Wilson-Turner) (Cruz M y Bosch J 1998).

1.3.1.1.2. FORMAS MONOGENICAS DE LA OBESIDAD HUMANA

Las mutaciones que causan obesidad monogénica son muy raras. Aproximadamente 20 genes diferentes han sido implicados en las causas monogénicas de la obesidad y sólo son responsables de menos del 5% de todas los casos de obesidad severa (Ochoa MC, 2004). Sin embargo, hasta la fecha se ha confirmado que 11 genes son los que se han asociado con esta forma de obesidad, la mayoría de los cuales están involucrados en el control central del apetito y en alteraciones de la leptina y la melanocortina (*CRHR1*, *CRHR2*, *MCRH1*, *LEP*, *LEPR*, *MC3R*, *MCR4*, *NTRK2*, *POMC*, *PCSK1*, *SIM1*).

1.3.1.1.3. FORMAS POLIGÉNICAS DE LA OBESIDAD

La obesidad es claramente un rasgo heredable aunque el grado exacto de heredabilidad es todavía debatido. Sin embargo, durante las últimas décadas se han

hecho grandes esfuerzos por identificar los genes de la obesidad. A diferencia de las formas monogénicas de la obesidad, la obesidad común es causa de la interacción de múltiples genes. Las variaciones genéticas entre individuos obesos y su relación con el entorno hacen que en la mayor parte de los casos de obesidad estén implicadas pequeñas alteraciones en distintos genes relacionados con el gasto energético y el control del peso corporal y su relación directa con un entorno permisivo que fomenta y propicia la expresión del fenotipo obeso. Los análisis de ligamiento y la asociación con genes candidatos han sido las primeras aproximaciones para la identificación de genes susceptibles de la obesidad. Recientemente, se están obteniendo resultados de los estudios de GWA.

Análisis de ligamiento

Se buscan regiones cromosómicas relacionadas con la obesidad por posición (se ha explicado anteriormente).

Estudios de asociación en genes candidatos

Consisten en comparar las frecuencias alélicas y/o genotípicas entre grupos de sujetos divergentes para un fenotipo dado o comprobar las diferencias fenotípicas entre individuos de genotipos diferentes para un polimorfismo de un gen candidato. Hasta ahora se han descrito 127 genes candidatos aunque la mayoría de los resultados no han sido replicados. Sólo 22 genes han sido confirmados por al menos 5 estudios positivos con diferentes grados de variación en cuanto a la significación estadística (Rankinen T et al, 2006).

Algunos de estos genes son los involucrados en la regulación del gasto energético como los receptores adrenérgicos o el gen del coactivador 1 del PPAR γ

Estudios de asociación del genoma completo (GWAS: Genome Wide Association Studies).

Tal y como hemos comentado anteriormente los estudios de asociación del genoma completo han aparecido en este siglo. En los últimos años, estos estudios han revolucionado el campo de la epidemiología genética y ha resultado en una cadena de descubrimientos con más de 300 asociaciones replicadas para más de 70 enfermedades comunes. Este tipo de estudios requieren el genotipado de cientos y miles de variantes genéticas, normalmente, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) a través del genoma. Cada SNP es evaluado para la asociación con el rasgo o la enfermedad de interés. En estos estudios resulta fundamental trabajar con una muestra de tamaño adecuado, dada la importancia del poder estadístico para evaluar las asociaciones de fenotipos comunes con moderada heredabilidad. En la actualidad se están haciendo grandes esfuerzos en obtener metaanálisis de los estudios de asociación genética. Este tipo de estudios requieren la asociación del resumen estadístico de cada SNP, directamente genotipado o imputado (basado en la observación de la estructura haplotípica de los SNP genotipados y la del panel de

referencia (población CEU HapMap), los genotipos de aproximadamente 2,5 millones SNPs son inferidos para cada uno de los individuos de cada estudio separadamente usando uno de los programas de imputación de disposición pública) de cada individuo para calcular la significación global de las asociaciones. Las asociaciones que se conocen de los estudios de asociación genética se tienen que replicar en subsecuentes estudios independientes para validar la observación inicial. Se ha recomendado el uso nominal de un umbral para el p-valor de $< 5,0 \times 10^{-8}$ que corresponde al 5% de la tasa de error tipo I, aunque se han usado otros umbrales mas liberales.

En el 2007 se llevaron a cabo tres estudios de asociación genética, confirmando cada uno de ellos el gen *FTO* como el primer gen asociado a la obesidad y al depósito de grasa. El primer estudio fue llevado a cabo para la Diabetes tipo 2, identificándose un grupo de SNP en el primer intrón del gen *FTO* asociado a esta patología. Tras ajustar por IMC esta asociación desapareció sugiriendo que esta asociación estaba mediada por el IMC (Frayling TM et al, 2007). El paso de replicación incluyó 13 cohortes con más de 38,759 adultos y niños donde se validó el gen *FTO* asociado con el IMC y el riesgo de obesidad (Hinney A et al, 2007; Scuteri A et al, 2007).

A pesar de que el tamaño de muestra de los primeros estudios fue suficiente para alcanzar un poder estadístico adecuado, se requirió un gran esfuerzo colaborativo para combinar los estudios de asociación e incrementar el tamaño de muestra que permitiera identificar variantes comunes con efecto pequeño. Así, el Consorcio Internacional de Investigación Genómica en Rasgos Antropométricos (GIANT) intenta aunar a grupos de toda Europa y Estados Unidos que específicamente se centren en el estudio de variables antropométricas. En el primer metaanálisis (16,976 individuos) llevado a cabo se identificó un nuevo locus cerca del gen *MC4R* (ampliamente conocido por su efecto biológico) (Loos RJ et al, 2008). En el siguiente estudio se duplicó el tamaño de muestra (32,387 individuos Europeos de 15 cohortes) donde se replicaron firmemente 8 loci. Estos incluían los previos *FTO* y *MC4R* y seis nuevos loci (*NEGRE1*, *TMEM18*, *SH2B1*, *KCTD15*, *GNPDA2*, *MTCH2*) (Willer CJ et al, 2009) (Figura 1.12).

En conclusión, hasta ahora se han identificado 15 nuevos loci asociados con obesidad y variables relacionadas. Sin embargo, la identidad exacta de la susceptibilidad genética de cada variante en cada locus es a menudo incierta. Señalar las variantes causales será una tarea primordial antes de poder dirigir la investigación hacia el desarrollo de nuevas terapias.

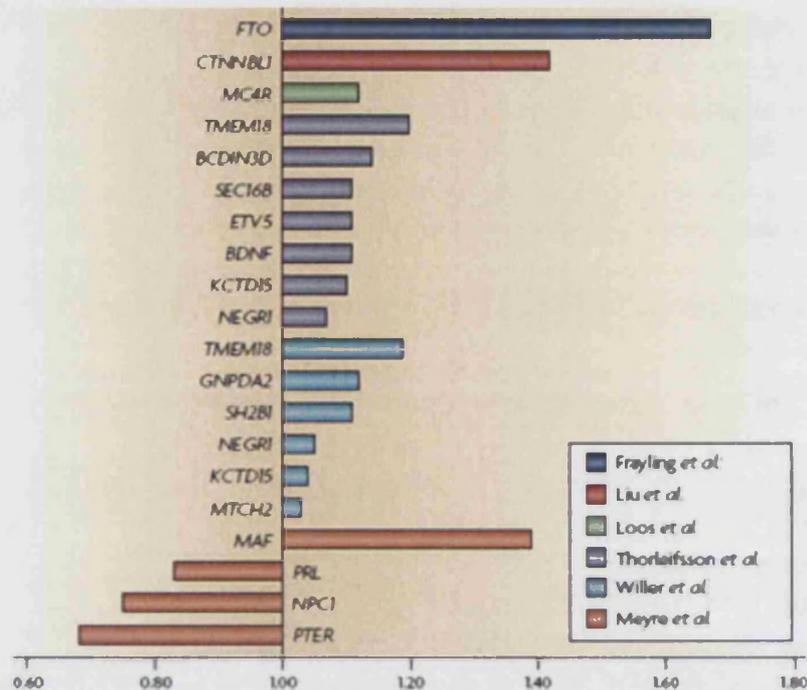


Figura 1.12 Tamaño del efecto para el riesgo de obesidad en el descubrimiento de los loci de susceptibilidad genética para la obesidad para los estudios de asociación genética para el IMC y el riesgo de obesidad extrema. El tamaño del efecto se representa por el incremento de la odds ratio de obesidad para cada alelo de riesgo adicional. (Frayling et al, 2007; Loos et al, 2008; Willer et al, 2009; Thorleifsson et al, 2009; Meyre et al, 2009).

Los genes que se abordarán en esta tesis y que están seleccionados de los estudios de GWAs son los que se detallan a continuación:

1.3.1.2 GENES DE ESTUDIO IMPLICADOS EN LA OBESIDAD Y MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

1.3.1.2.1 GEN DEL RECEPTOR DE LA SOMATOSTATINA 2 (SSR2)

El gen *SSRT2* o gen del receptor de la somatostatina 2 se encuentra en el cromosoma 17 en la posición 17q24. Codifica para el receptor de la somatostatina 2, un neuropéptido que existe en dos formas activas, somatostatina-14 y somatostatina-28. En el organismo, las somatostatinas son producidas principalmente por células endocrinas gastrointestinales e inmunes, además de por ciertos tumores. Desde su descubrimiento hace tres décadas como un inhibidor de la liberación de la hormona del crecimiento por la glándula pituitaria, la somatostatina ha atraído la atención dado su papel funcional en la regulación de una amplia variedad de funciones fisiológicas en el cerebro, pituitaria, páncreas, tracto gastrointestinal, glándulas adrenales, tiroides, riñón y sistema inmune (Patel

et al, 1999). Sus acciones incluyen la inhibición de la secreción endocrina, exocrina así como la inhibición de la motilidad intestinal, la absorción de nutrientes e iones, la contractibilidad vascular y la modulación de neurotransmisión. Sus efectos están mediados por los receptores de la membrana plasmática que están ampliamente distribuidos en muchos tejidos, desde el sistema nervioso central al páncreas o intestino. (Epelbaum et al, 1994; Patel YC et al., 1999). Se conocen 5 receptores de la somatostatina (1-5). Los genes que codifican para los mismos son intrones, con la excepción de *sst2*. Existen dos isoformas de *sst2*: una variante de 366 aminoácidos (*sst2A*) y una variante más corta de 23 residuos (*sst2B*) observado principalmente en ratas y ratones. Los subtipos *sst* pertenecen a la familia de receptores de G-protein coupled compuesto por siete spanning transembrana (Meyerhof W., 1998).

Además, el gen de la *SSTR2* ha sido un gen de estudio en el análisis de genes candidatos en la etiología de la obesidad. Esto se debe a que, como se ha dicho anteriormente, inhibe la acción de las hormonas gastrointestinales, específicamente la gastrina y el ácido gástrico y reduce la tasa de absorción de nutrientes (Fung LC et al., 1997). Asimismo, también inhibe la liberación de insulina, glucagón, y la secreción de hormona del crecimiento. Por otro lado, estudios de privación de comida en ratas muestra un reducción del 80 % en la expresión de *SSTR2* en la pituitaria comparado con ratas alimentadas, sugiriendo que la expresión de *SSTR2* podría desempeñar una función en los mecanismos de alimentación en ratas (Bruno et al., 1994)

Polimorfismos del *SSRT2*

Entre los polimorfismos que han resultado relevantes en el estudio de validación del Affymetrix GeneChip® de 100K en la población de Framingham se encuentra uno en el gen *SSRT2* (Fox et al, 2007). Se trata del rs1466113 en el cual se ha encontrado asociación con variables antropométricas, circunferencia de la cintura e IMC (Fox et al, 2007). No obstante, al ser un polimorfismo novedoso, todavía no hay ningún estudio que haya obtenido resultados similares. Por ello, su estudio puede ser interesante en poblaciones grandes con factores de riesgo que ayuden a ampliar información acerca de las posibles asociaciones de este polimorfismo.

1.3.1.2.2 MOLÉCULA FAS INHIBIDORA DE APOPTOSIS (*FAIM2*), REGULADOR DE CRECIMIENTO NEURONAL 1 (*NEGR1*), PROTEÍNA TRANSMEMBRANA 18 (*TMEM18*)

Estudios recientes de asociación genética (GWAs) llevados a cabo en poblaciones adultas para evaluar posibles genes candidatos en relación al IMC o estudios llevados a cabo con un diseño de casos y controles para la obesidad extrema han encontrado varios locus relevantes en la regulación del peso corporal.

Los locus identificados, están localizados cerca de los genes *FAIM2* (molécula FAS inhibidora de apoptosis), *NEGR1* (regulador de crecimiento neuronal 1) y *TMEM18* (proteína transmembrana 18) entre otros (Willer et al, 2009; Thorleifsson et al, 2009).

Polimorfismos del *FAIM2*, *NEGR1*, *TMEM18*

De todos los SNPs estudiados en los recientes genes relacionados con obesidad y medidas relacionadas el rs7138803 (en *FAIM2*) en el cromosoma 12, el rs7561317 (en el gen *TMEM18*) en el cromosoma 2 y el rs2568958 (en el gen *NEGR1*) en el cromosoma 1 han dado asociación positiva con el IMC y otras variables antropométricas. Sin embargo, estudios de replicación son necesarios para aumentar la evidencia científica de los mismos.

1.3.1.2.3 STEAORIL COENZIMA A DESATURASA (*SCD1*)

Steaoril coenzima A desaturasa (*SCD*) es una enzima lipogénica del retículo endoplásmico que cataliza la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) desde ácidos grasos saturados, que son tanto sintetizados de novo como derivados de la dieta (Miyazaki et al, 2003) (Figura 1.13). La actividad del *SCD1* requiere la presencia de NADH y dos proteínas para introducir un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 de la cadena de ácidos grasos saturados acyl-coA.

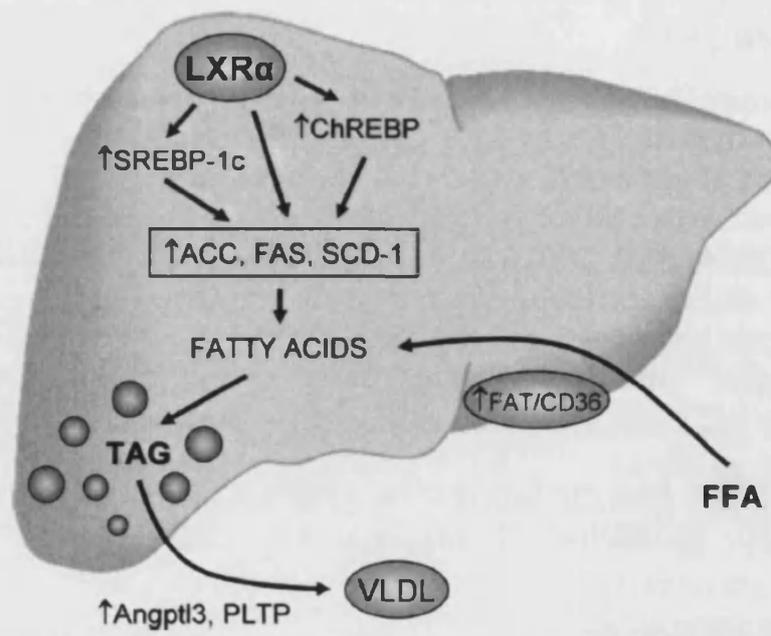


Figura 1.13 Función del SCD-1 en el metabolismo de lípidos en el hígado.

Existen dos genes humanos, *SCD1* y el *SCD5* (Liu G, 2010). *SCD1* es la isoenzima más predominante en humanos y es principalmente expresado en hígado, tejido adiposo, glándulas sebáceas (Kaestner KH et al, 1989) y en células adipocitarias aunque más recientemente se ha visto que la expresión del *SCD1* es 3 veces más alta en el músculo esquelético de obesos extremos en comparación con sujetos delgados (Hulver et al, 2005). El gen *SCD1* tiene 6 exones, se encuentra en el cromosoma 10 en una zona ligada a la diabetes tipo 2. La mayoría de la información referente a su función viene de estudios realizados en ratones. Así, ratones deficientes en *SCD1* tienen aumentado el gasto energético, reducida la adiposidad, incrementado la sensibilidad a la insulina y son resistentes a la obesidad inducida por la dieta. (Ntambi JM et al, 2002) (Rahman DM et al, 2003). Además, la deficiencia de *SCD1* también mejora la tolerancia a la glucosa y la señalización de la insulina. Sin embargo, la información referente al *SCD1* en la obesidad y los desordenes lipídicos en humanos es preliminar en comparación con la bibliografía en ratones. Se han encontrado asociaciones significativas entre la actividad del *SCD1* y las concentraciones de triglicéridos en sujetos con hipertrigliceridemia (Attie AD et al, 2002) o en la dislipemia familiar combinada (Mar-Heyming et al, 2008). A pesar de la sólida relación entre la actividad de *SCD1* y metabolismo lipídico, síndrome metabólico y gasto energético, paradójicamente la baja actividad de *SCD1* en el hígado ha sido asociada con hígado graso y resistencia a la insulina en humanos obesos (Stefan et al, 2008). Por todo ello, se ha propuesto el gen *SCD1* como un gen candidato para estudiar en relación con la obesidad, el síndrome metabólico y los desordenes lipídicos. Sin embargo, serían necesarios estudios de intervención en humanos para establecer una relación más sólida.

Polimorfismos del *SCD1*

Existen pocos estudios que hayan analizado la asociación entre polimorfismos genéticos en este gen y obesidad, diabetes tipo 2 o fenotipos relacionados en humanos. Warensjö et al, (2007) estudió varios polimorfismos en este gen en una cohorte de hombres Suecos de edad avanzada. Este estudio mostró que los sujetos homocigotos para el alelo mutado de rs10883463, rs7849, rs2167444, y rs508384 tenían una disminución de IMC y la circunferencia de la cintura además de una mejora en la sensibilidad a la insulina. En el primer estudio realizado en este gen en humanos llevado a cabo por Liew et al (2004) encontraron que no había asociación entre las variantes alélicas estudiadas y la diabetes en 608 diabéticos y 600 controles. Dada la inconsistencia y la escasez de estudios analizando posibles variantes genéticas en el gen *SCD1* y su asociación con los fenotipos de interés sería interesante explorar este gen en otras poblaciones para poder obtener resultados más consistentes.

1.3.1.2.4 GEN DE LA SIRTUINA (*SIRT1*)

Sirtuina 1, también conocida como sirtuina 1 desacetilasa dependiente de NAD, es una proteína que en humanos está codificada por el gen *SIRT1* (Silent mating type information regulation 2 homolog 1 (*S.cerevisiae*) refiriéndose al hecho de que su homólogo en levaduras es Sir2 (Frye; 1999). *SIRT1* es una enzima que contribuye a la regulación celular estando relacionado con la longevidad.

El gen de la *SIRT1* está localizado en la posición 10q21.3 y tiene 9 exones. *SIRT1* está implicada en el control de muchos procesos fisiológicos. Así, *SIRT1* tiene una función destacada en el metabolismo de la glucosa y de la grasa (Picard et al, 2004). El incremento de la actividad hepática de la *SIRT1* aumenta la gluconeogénesis e inhibe la glucólisis (Rodgers et al 2005). En el páncreas, estimula la secreción de la insulina en respuesta a la glucosa (Moynihan et al 2005) y en el tejido adiposo *SIRT1* interacciona con el PPAR- γ para reprimir su actividad transcripcional conduciendo a la inhibición de la adipogénesis en el ayuno (Bordone et al, 2006). También, en el músculo esquelético de ratones obesos se ha visto que *SIRT1* aumenta la sensibilidad a la insulina por efecto del resveratrol (Lagouge et al, 2006). Su actividad es regulada durante la restricción calórica (figura 1.14) e interesantemente, una modesta sobreexpresión de *SIRT1* protege a los ratones de una dieta rica en grasas (Pfluger et al, 2008). Sin embargo, su función en humanos está menos definida.

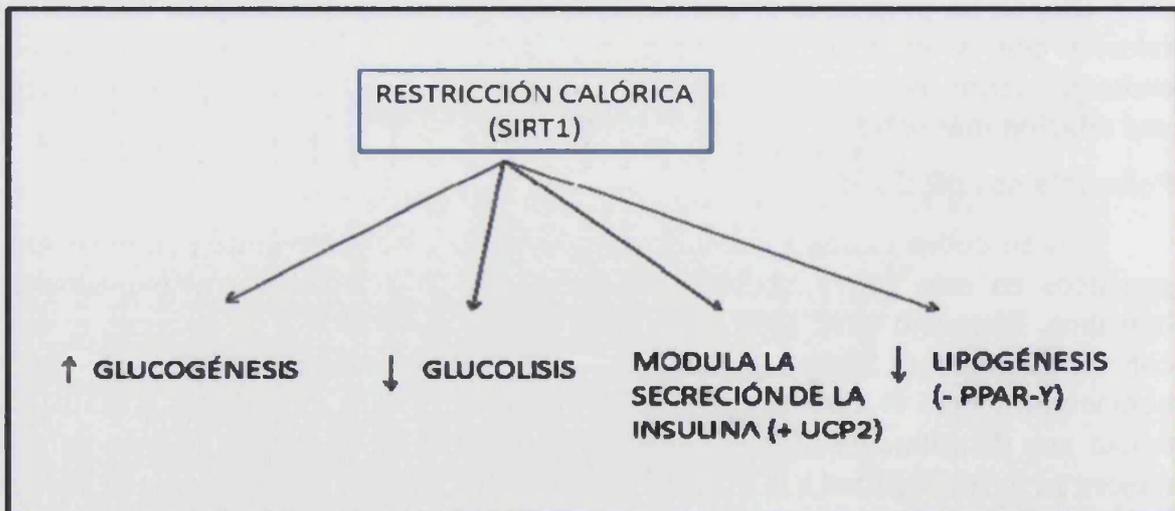


Figura 1.14 Función de la *SIRT1* en condiciones de restricción calórica.

Por tanto y teniendo en cuenta todas las funciones en la que está implicada *SIRT1*, el gen *SIRT1* es un gen candidato para el estudio de posibles asociaciones con el fenotipo de la obesidad y relacionados. Aunque son pocos los estudios que han analizado las variantes genéticas de este gen, algunos autores han mostrado resultados interesantes, aunque algunos discordantes.

Polimorfismos del *SIRT1*

Son varios los estudios que han analizado distintos polimorfismos en el gen *SIRT1*, si bien los resultados han sido contradictorios.

Peeters et al (2008) fueron los primeros en analizar variaciones en este gen reportando asociaciones significativas entre rs7069102 y la obesidad en hombres.

Posteriormente, un estudio de intervención no encontró asociación en 4 SNPs del gen *SIRT1* en sujetos con sobrepeso, ni a nivel basal ni después de la intervención (Weyrich et al 2009).

Más recientemente, el grupo de Zillikens et al, (2010) ha publicado varios artículos donde ha encontrado interacciones gen*ambiente significativas en relación al IMC y la diabetes (Zillikens et al 2009) con la vitamina E la niacina y el tabaco. No obstante, todavía no ha habido replicación de los mismos SNPs en otras poblaciones salvo la llevada a cabo en la cohorte holandesa por el grupo antes mencionado. Por ello, el análisis de algunas variantes genéticas en otras poblaciones puede ser interesante.

1.3.1.2.5 APOLIPOPROTEÍNA A2 (*APOA2*)

La apoA2 es la segunda apolipoproteína más importante de las lipoproteínas de alta densidad o HDL-c sin embargo no está claro en qué funciones participa de las muchas que se atribuyen a estas lipoproteínas. El gen que codifica para esta apolipoproteína es el *APOA2* y está localizado en el cromosoma 1.

En cuanto a la evidencia del papel de apoA2 en el metabolismo de los TG y los ácidos grasos libres, algunos estudios muestran una relación positiva entre la apoA2 y la síntesis de LDL-apoB en humanos (Marzal-Casacuberta et al 1996). Además, muchos estudios, pero no todos, han sugerido que un incremento de los niveles de apoA2 está relacionado con la arterosclerosis (Alaupovic et al 1996), mientras que estudios pequeños de casos y controles han demostrado una relación inversa entre enfermedad cardiovascular y los niveles de ApoA2 (Roselli et al 2003, Birjmohun et al 2007). A pesar de que algunos estudios hayan encontrado una sobre expresión de *APOA2* en hipertrigliceridemia, obesidad e insulinoresistencia (Castellani et al 2001; Castellani et al 2008), su papel en humanos es controvertido. Recientemente, el grupo de Julve et al, (2010) ha sugerido que la ApoA2 desempeña un papel crucial en el catabolismo de los triglicéridos mediante la regulación de la actividad de la lipoproteína lipasa al menos en parte por una modulación del proteoma de HDL.

Polimorfismos de la *APOA2*

El polimorfismo más estudiado en el gen de la *APOA2* ha sido el rs5082 en la región promotora del gen -265T>C. Este polimorfismo ha demostrado ser funcional en dos investigaciones independientes (van 't Hooft et al, 2001), y ha sido asociado significativamente con la obesidad y medidas relacionadas en algunos estudios llevados a cabo en humanos (Corella et al, 2007, Duesing K et al, 2009). Un estudio previo llevado a cabo en americanos de raza blanca observó un patrón recesivo de dicho polimorfismo y una asociación con el IMC. Estudios posteriores en el estudio Framingham y de los puertorriqueños de Boston encontraron una interacción gen dieta con el consumo de grasas saturadas modulando el IMC (Corella et al, 2009). Por tanto, el estudio de este polimorfismo ha despertado un gran interés por su posible papel para modular el IMC según la ingesta de grasa. Sin embargo todavía está menos claro si los niveles de *APOA2* en suero disminuyen o no en este polimorfismo.

1.3.1.2.6 INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA EPSILON CINASA KB (*IKKE*)

El gen *IKKE*, también conocido como *IKK-ε* (inhibitor- κ B kinase epsilon protein) está localizado en el cromosoma 1 y tiene 20 exones. Es esencial en la regulación antiviral aunque también ha sido identificado como un oncogen en el cáncer de pecho.

Recientemente, Chiang-Hey et al (2009) han identificado el gen *IKKE* como posible gen diana para la obesidad. El grupo mostró que comparando ratones knockout para *IKKE* con ratones con normales tras ser alimentados con una dieta rica en grasa, los ratones knock out estaban protegidos de la obesidad, inflamación crónica en el hígado, esteatosis hepática y resistencia a la insulina. Además encontraron que los ratones knock out mostraban un incremento en el gasto energético. Por tanto, este gen podría estar relacionado con la obesidad y la inflamación dado que algunos estudios previos han indicado que la ruta del *IKK/NF-KB* está implicada en la resistencia a la insulina y la inflamación (Sriwijitkamol A et al, 2006, Wunderlich, F.T et al, 2008).

Polimorfismos del *IKKE*

Hasta ahora no se han encontrado estudios que analicen la posible implicación de variantes genéticas en este gen con fenotipos relacionados con la obesidad en humanos. Por lo tanto, dado su papel biológico, podría ser interesante buscar polimorfismos diana o tag-SNPs usando herramientas bioinformáticas para comprobar si variaciones en este gen podrían estar asociadas con variables antropométricas y relacionadas

1.3.2. FACTORES GENÉTICOS DE LAS ECV. METABOLISMO LIPÍDICO

1.3.2.1. GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En el estudio de los genes candidatos para el metabolismo de lípidos, dado que los TG en ayunas son estables, los GWAs pueden combinar resultados de múltiples estudios epidemiológicos para la identificación de locis genéticos.

El análisis llevado a cabo por el estudio del Consortium Global Genético de Lípidos (GLGC) ha proporcionado una lista de locis, identificando 32 locis alrededor de variantes comunes que contribuyen a la variación de la concentración de TG (Teslovich T et al, 2010) (Figura 1.15). El descubrimiento de los SNPs en cada uno de estos loci asociados con las concentraciones de TG explica el 9,6% del total de la variación de TG en plasma correspondiente al 25-30% del total de la contribución genética a la variabilidad de la concentración de TG. El restante porcentaje que explica dicha variabilidad está todavía en especulación.

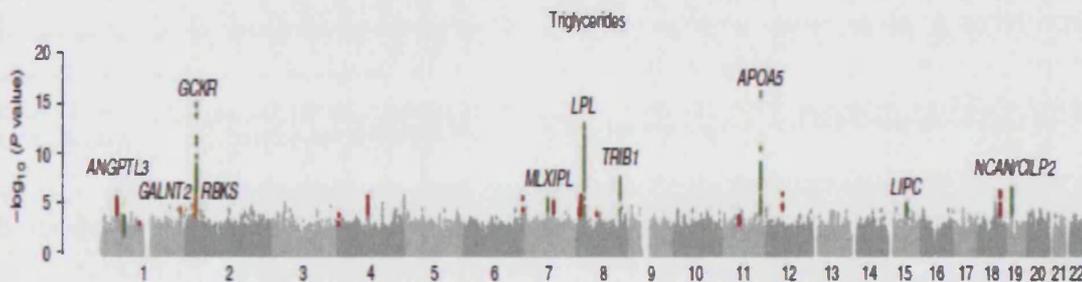


Figura 1.15 Genes identificados mediante GWAs asociados con las concentraciones de TG. (Willer CJ et al, 2008)

Por otro lado, el valor de la trigliceridemia en la predicción del riesgo cardiovascular (RCV) independiente de los principales factores de riesgo (colesterol total (CT), LDL-C, presión arterial, fumar, etc.) ha permanecido confuso durante los últimos años. Sin embargo, la acumulación de evidencia científica sugiere que la elevación de la concentración de TG es un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular (ECV) (McBride et al, 2008; Ferns et al, 2008; Malloy et al, 2008; Eberly et al, 2001). Un meta-análisis de 21 poblaciones basados en estudios prospectivos con un total de 65,863 hombres y 11,089 mujeres en el que se estudió la asociación entre los TG y ECV en población general, encontró que la elevación de 89 mg/dL en la concentración de TG estaba asociada con un incremento del 12 % del RCV en hombres y un 37% en mujeres tras ajustar por CT, LDL-C, HDL-C, IMC, presión arterial y diabetes (Abdel-Maksoud et al, 2002). Esta elevación de la concentración de TG está asociada con

diversos factores, como son el estilo de vida, entre los que destaca la dieta, otras enfermedades (DM2, SM, obesidad), medicación, y factores genéticos. Por ello, resulta crucial evaluar, identificar y controlar el efecto conjunto de los efectos ambientales y genéticos de la enfermedad teniendo en cuenta los distintos factores ambientales que puedan influir y como interacciones o modulaciones gen-ambiente influyen en la susceptibilidad individual a presentar marcadores fenotípicos más desfavorables.

La epidemiología cardiovascular clásica no incorporaba en sus estudios el componente genético de la enfermedad a nivel molecular porque se carecía de información sobre ello. En la actualidad, y tras la secuenciación del genoma humano, ha surgido una nueva disciplina, epidemiología genómica cardiovascular que tiene como objetivo la integración de la información genética y ambiental en el estudio de la etiología de las ECV (Little et al, 2003). La epidemiología genómica cardiovascular se plantea generar nuevo conocimiento sobre la contribución genética y ambiental a los distintos fenotipos cardiovasculares. Estos fenotipos, pueden ser clasificados en dos grandes grupos: 1) los denominados fenotipos intermedios, que a su vez se consideran factores de riesgo de los fenotipos finales de ECV. Entre estos fenotipos intermedios se incluyen las concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas (colesterol total, triglicéridos, colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), etc.), glucemia, insulinemia, homocisteinemia, presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), obesidad, sobrepeso, metabolitos del estrés oxidativo, distintas concentraciones de hormonas, etc.; 2) los denominados fenotipos finales. Estos fenotipos finales son los distintos grupos de ECV (cardiopatía isquémica, enfermedades cerebrovasculares y enfermedad vascular periférica).

Existen diversos polimorfismos de genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico y con factores etiológicos de la enfermedad cardiovascular asociados con un aumento del riesgo de desarrollarla. Entre los genes relacionados con el metabolismo lipídico destacan los de la *APOE*, *APOB*, *APOC3*, *APOA1*, *APOA2*, *APOA4*, *APOA5*, lipoproteína lipasa; proteína transportadora de ésteres de colesterol (Ordovas et al, 2004); *GCK* y *GCKR* entre otros (Orho-Melander et al, 2008, Vaxillaire et al, 2009) (Figura 1.16). De todos los genes implicados en el metabolismo lipídico, los que más interés han despertado en la actualidad son los relacionados con el metabolismo de los triglicéridos. De todos ellos, algunos de los que presentan más relevancia son la *APOA5*, *GCK*, *GCKR*.

Aunque se han descrito más de 4000 genes vinculados con las ECV, esta cifra disminuye considerablemente si tenemos en cuenta los genes implicados en enfermedades multifactoriales del sistema cardiovascular, y todavía más si tenemos en cuenta los que han descrito interacción con algún componente de la dieta. La presencia de múltiples factores de riesgo, genes responsables de la aparición de

determinados parámetros biológicos, etc, complican el abordaje del problema. La mayoría de esfuerzos actuales están dirigidos a conocer los factores genéticos que aumentan la susceptibilidad de sufrir determinadas patologías cardiovasculares. Así, la epidemiología genética de las enfermedades cardiovasculares se centra sobre todo en algunos aspectos como son: la prevalencia del gen en diferentes poblaciones; magnitud del riesgo cardiovascular, forma en que las variantes genéticas contribuyen a la presentación de la enfermedad, evaluación de la magnitud del riesgo de enfermedad asociado con las interacciones gen-gen y gen-ambiente y evaluación del impacto de los análisis genéticos en la prevención y tratamiento de diversas enfermedades (Stavljenić-Rukavina).

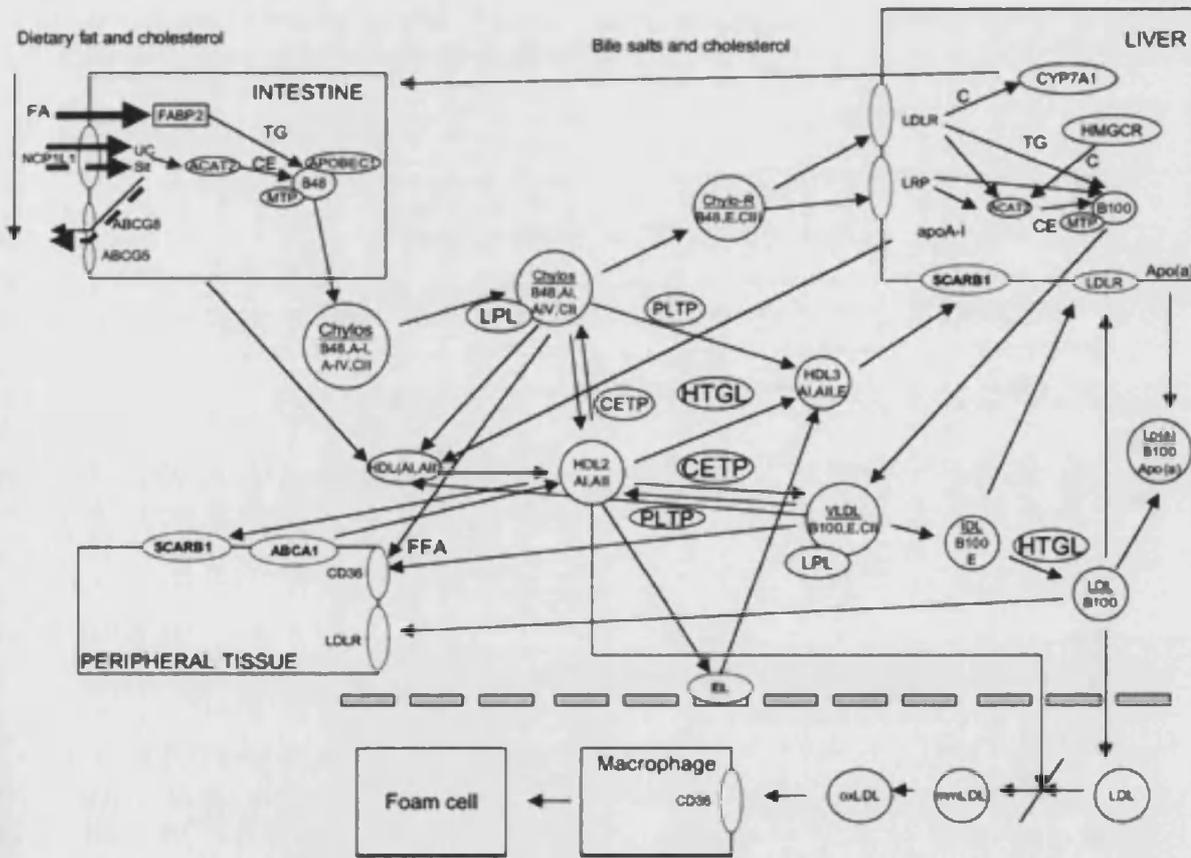


Figura 1.16 Metabolismo lipídico (Corella y Ordovas, 2005)

1.3.2.2. GENES DE ESTUDIO IMPLICADOS EN LAS CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

1.3.2.2.1 APOLIPOPROTEÍNA A5

El gen de la *APOA5* fue identificado en 2001 por Pennacchio et al, por análisis genómicos comparativos de ratón y humanos (Pennacchio et al, 2001). El gen de la *APOA5* está localizado aproximadamente a 30 Kb de distancia del “cluster” de genes bien caracterizados *APOA1/C3/A4* en el cromosoma 11q23. Consiste en 4 exones que codifican 366 aminoácidos con un 71 % de identidad a *apoa5* de ratón y un 27 % de identidad al gen *APOA4* humano (Pennacchio et al, 2001). La figura 1.17 muestra la estructura del gen de la *APOA5*. La expresión del gen de la *APOA5* está modulada por varios factores. Es sobreexpresada en respuesta a factores de transcripción que afectan al metabolismo de TG como el PPAR- α (Priour et al, 2003; Vu-Dac et al, 2003), el receptor nuclear y el ROR α 1 y 4 (Genoux et al, 2005) y los ligandos del receptor X del hígado (T0901317) pueden regular la expresión a través de SREBP-1c (Jakel et al, 2004).

La proteína para la que codifica, apolipoproteína A5 (*APOA5*), está presente en bajas concentraciones en suero humano (rango de 25 a 400 $\mu\text{g/L}$), lo que dificulta su medición en plasma mediante técnicas de inmunoanálisis, y desde su descubrimiento, ha sido asociada con hipertrigliceridemia (Pennacchio et al, 2001; Van der Vliet et al, 2001). Está fundamentalmente expresada en hígado donde se secreta a la circulación estando presente en las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las VLDL y partículas de quilomicrones (Pennacchio et al, 2001; O'Brien et al, 2005; Fruchart-Najib et al, 2004). La maduración de esta proteína ocurre por pérdida de 23 aa correspondientes al péptido señal (Alborn et al, 2006). En cuanto a su estructura destaca un importante componente alfa hélice en un contexto de predominio hidrofóbico (Weinberg et al, 2003) donde el extremo C-terminal tiene un papel importante en la unión de la proteína a los lípidos (Beckstead et al, 2007). La creación de modelos Knock-out y transgénicos para el gen *apoa5* en roedores, así como el doble transgénico y Knock-out para *apoa5-apoc3* mostró que la *apoa5* y la *apoc3* podrían desempeñar un papel opuesto en la regulación de los niveles de lípidos, principalmente los TG. Algunos estudios indican que la *APOA5* reduce la concentración sérica de TG por estimulación de lipoteínlipasa mediada por la hidrólisis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TG) y por inhibición de la producción de VLDL-TG en hígado (Schaap et al, 2004; Fruchart-Najib et al, 2004; Merkel et al, 2005). Así, se ha sugerido que *APOA5* juega un papel importante en la hidrólisis de los componentes lipídicos de las lipoproteínas, siendo esta proteína clave en la unión a los proteoglicanos de membrana plasmática de la célula endotelial, permitiendo así la actividad lipolítica endotelial sobre las VLDLs, merced a que esta unión mediada por *APOA5* mantiene las VLDL en vecindad a la LPL endotelial (Merkel et al, 2005).

Polimorfismos de la *APOA5* (-1131C>T y S19W)

De manera consistente en varias poblaciones, se ha encontrado que los niveles de triglicéridos en plasma dependen de las variaciones en el gen *APOA5*. Se han identificado más de 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en dicho gen. Varios estudios indican una fuerte asociación entre los polimorfismos más comunes (-12238T>C, -1131T>C, IVS 3 + 476 G>A, - 3>G, 56C>G (o S19W), 442C>T, 553G>T, 1259T>C) de la *APOA5* y la concentración de lípidos en plasma (Pennacchio et al, 2001, Kao et al, 2003; Chien et al, 2008; Penachillo et al., 2002; Kisfali et al, 2008) (Figura 1.17).

En este sentido la variante del gen de la *APOA5* más estudiada es la -1131T>C (también denominada en algunos estudios SNP3). Su asociación con los niveles de triglicéridos ha sido confirmada en varios estudios étnicos que incluían Caucásicos (Martin et al, 2003), Japoneses (Endo et al, 2002), Chinos (Lai et al, 2003) y Taiwanesees (Chien et al, 2007). En otro estudio se observó que los portadores del polimorfismo tenían mayor riesgo genético de hipertrigliceridemia en niños japoneses, respecto a los no portadores (Endo et al, 2002). Además, los portadores homocigotos para el alelo C junto con el polimorfismo 553 G>T presentaron una concentración muy superior de TG que los portadores del alelo común (Chien et al, 2007). También se ha visto que muchos de ellos se heredan unidos formando bloques haplotípicos, distinguiéndose dos haplotipos independientes identificados por los tag SNPs o SNPs indicadores denominados -1131C>T y S19W. Varios estudios de cohorte en personas caucásicas han mostrado que los dos haplotipos, definidos por los SNPs -1131C>T y S19W están asociados independientemente con las concentraciones de TG. Por otra parte, la variante S19W de la *APOA5* confiere un mayor riesgo para la hiperlipidemia, específicamente en estado de homocigosis (Pennacchio et al, 2001). Además, el alelo -1131C se asocia con menores concentraciones de *APOA5* y mayores concentraciones de TG mientras que el alelo 19W está asociado con mas *APOA5* y mayores concentraciones de TG para personas homocigóticas con el alelo menos común (Chandak et al, 2006). Sin embargo, la frecuencia alélica de los polimorfismos varía entre etnias.

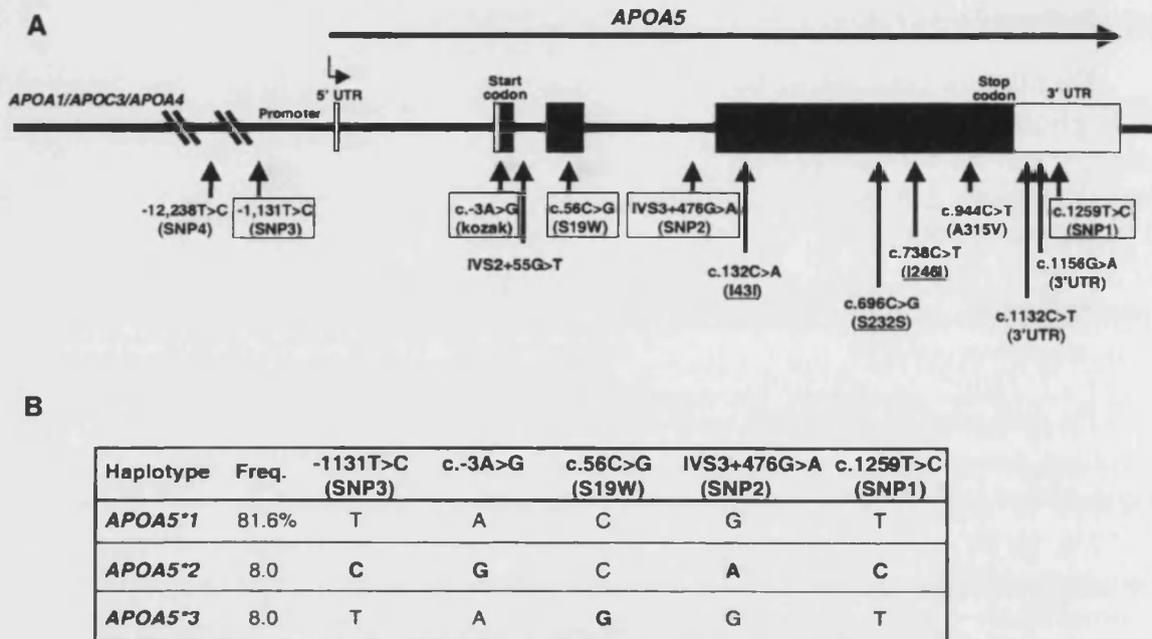


Figura 1.17 Estructura del gen de la *APOA5* y constitución de los principales haplotipos. (Tomado de Pennacchio et al, 2002)

1.3.2.2.2 GEN DE LA PROTEÍNA REGULADORA DE GLUCOKINASA (*GCKR*) Y DE LA GLUCOKINASA (*GCK*)

La fosforilación de la glucosa en el carbono 6 es el primer paso en la glucólisis. Esta reacción está catalizada por una familia de enzimas llamadas hexocinasas. El gen de la glucocinasa (*GCK*) codifica para una proteína, la glucocinasa (*GCK*), la cual es la clave en la fosforilación enzimática de la glucosa en el primer paso limitante de la glicólisis y se localiza en el cromosoma 7p15-p13. Regula la secreción de insulina desde las células β del páncreas por estímulo de la glucosa y el metabolismo de la glucosa en el hígado (Matschinsky, 1990; Zelent D et al, 2005; Matschinsky, 2005) (Figura 1.18). Su actividad está regulada por la proteína reguladora de glucocinasa (*GCKR*), la cual actúa como un inhibidor competitivo con respecto a la glucosa. El gen *GCKR* consta de 19 exones y se localiza en el cromosoma 2p23.2-3 (Hayward et al, 1996) una región genómica previamente ligada al metabolismo lipídico y a la circulación de los mismos en sangre (Comuzzie et al, 1997). Ratones deficientes en *GCKR* mostraron una reducción de la expresión de *GCK* pero mantuvieron una actividad normal de *GCK* y una discapacidad para el aclaramiento de la glucosa (Grimsby et al, 2000). Además, una sobreexpresión de *GCKR* mediado por adenovirus en hígado de ratón incrementó la actividad de *GCK* y disminuyó la glucosa en ayunas, y una sobreexpresión de *GCK* en hígado condujo a una disminución de la glucosa e

incrementó las concentraciones de triglicéridos (Slosberg et al, 2001, Farre et al, 1999). Por lo tanto, la evidencia experimental sugiere que la perturbación de la ruta del GCKR tiene efectos opuestos en el metabolismo de la glucosa y el de triglicéridos. Las observaciones en relación a la funcionalidad de GCK y GCKR han sugerido que variaciones genéticas en el GCKR podrían ser diabetogénicas u obesogénicas si ellas tienen implicaciones funcionales para la síntesis de GCKR que podría resultar en un incremento del efecto inhibitorio en GCK.

Polimorfismos del GCK (rs1799884) y del GCKR (rs1260326)

Recientemente, estudios de asociación genética han identificado el gen de *GCKR* como un gen candidato en las concentraciones de triglicéridos en europeos. Orho-Melander et al, (2008) llevaron a cabo estudios de asociación en 12 cohortes independientes con más de 45000 individuos y encontraron asociaciones, con efectos opuestos en las concentraciones de TG y de glucosa, así como una asociación con la proteína C reactiva al analizar el polimorfismo rs780094. Investigaciones posteriores han encontrado asociaciones similares para las concentraciones de triglicéridos y glucosa al estudiar dicho polimorfismo (Qi et al, 2009; Sparsø et al, 2009; Perez-Martinez et al, 2008). Sin embargo, estudios de mapeo genético revelan la variante rs1260326 (Pro446Leu) como la señal de mayor asociación en esta región (Orho-Melander et al, 2008). El estudio prospectivo DESIR investigó la asociación de este polimorfismo en 4833 individuos con el metabolismo de la glucosa y triglicéridos y observaron que los portadores de la mutación, del alelo T, mostraron menor glucosa en ayunas (-1.43 %), menores niveles de insulina (-4.23%) y contrariamente, mayores niveles de triglicéridos (3.41%) durante los 9 años de estudio (Vaxillaire et al, 2009).

Además, la variante común (rs1799884 o -30G>A) en la zona promotora del gen *GCK* ha sido asociada con el incremento del riesgo de diabetes (Vaxillaire et al, 2009), hiperglucemia (Vaxillaire et al, 2009; März et al, 2004; Rose et al, 2005) y deterioro de la función de las células β (Vaxillaire et al, 2009; März et al, 2004; Rose et al, 2005; Yamada et al, 1997; Stone et al, 1996) así como menores concentraciones de TG.

Asimismo, se ha estudiado el efecto combinado de estos polimorfismos en determinación de las concentraciones de triglicéridos y glucosa. Así, se ha observado un efecto aditivo de los alelos *GCKR* rs1260326 (T) y *GCK* (-30G) de conferir menor glucosa en ayunas, insulinemia y riesgo de hiperglucemia, mientras que unos mayores niveles de TG y riesgo de dislipidemia (Vaxillaire et al, 2009).

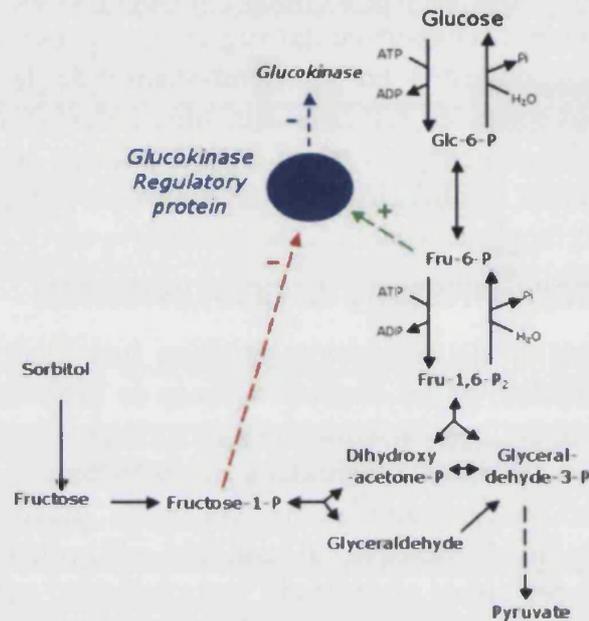


Figura 1.18 Control de la actividad de la glucocinasa por la proteína reguladora de glucocinasa y por metabolitos (www.icp.ucl.ac.be/grm/Images/glucokinase.jpg).

1.3.2.2.3 INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DE PLASMINÓGENO TIPO 1 (*SERPINE1*)

El gen de la *SERPINE1* es conocido también como el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1), inhibidor de la proteinasa serina, clase E miembro 1. Se encuentra en el cromosoma 7 y se localiza en 7q21.3-q22. Contiene 9 exones y 8 intrones (Strandberg et al, 1998). Codifica para una proteína, el PAI-1, que es una glicoproteína compuesta de 379 aminoácidos. Es el principal inhibidor del activador de plasminógeno (PAI), regula la fibrinólisis y la plasmina mediada por la activación de la matriz metaloproteinasas. El sistema plasminógeno/plasmina fue reconocido por primera vez por su actividad degradatoria de fibrina y es el principal sistema eficiente fibrinolítico in vivo. La tasa limitante de la generación de plasmina es la cantidad de activadores de plasminógeno (PAs) de tejido tipo (t-PA) o urikinasa tipo (u-PA) (Rondeau et al, 1995). Esta cantidad está regulada por el control de la síntesis y liberación de formas proenzimáticas de PA, la activación extracelular de estas proenzimas y su inhibición por inhibidores específicos como el PAI-1, PAI-2 y PAI-3 (Eitzman et al, 1997) (figura 1.19). Estos inhibidores pertenecen a la familia de SERPIN, SERine Protease INhibitor. El PAI-1 es una glicoproteína de 50 kD, es el principal PAI secretado in vivo y es un inhibidor irreversible de t-PA y u-PA, pero no de plasmina. El PAI-1 modula la adhesión celular y la migración a través de su capacidad de unión a la vitronectina. No se expresa fisiológicamente en los riñones, se sintetiza y es secretado por las células endoteliales, hepatocitos y plaquetas (Gladson et al, 1989) y su síntesis está

regulada por varios mediadores fisiológicos, incluyendo endotoxinas, interleukina 1, factor de crecimiento de fibroblasto 2 lípidos. Su papel fisiológico no está relacionado solo con la fibrinólisis, sino también con la fibrinogénesis, angiogénesis o invasión tumoral.

Polimorfismos de la *SERPINE1*

Se han descrito varios polimorfismos en el gen de la *SERPINE1*. Sin embargo, las investigaciones se han centrado sobre todo en el polimorfismo 4G/5G inserción/delección en la región promotora en la posición -675 del gen. En paciente sépticos se ha observado que los sujetos con genotipo 4G/4G no son más susceptibles a la infección, sin embargo los infectados tenían mayor riesgo de desarrollar sepsis (Wetendorp et al, 1999). Otros estudios, en pacientes politraumatizados, pacientes homocigotos 4G/4G desarrollaron sepsis y más de la mitad no sobrevivieron (Mengest et al, 2001). Además, es importante considerar que las alteraciones de la coagulación pueden considerarse un factor de riesgo en los procesos isquémicos. Zhang et al, (2008) en un estudio con pacientes con enfermedad coronaria y sujetos sanos como controles, observaron que la frecuencia del genotipo 4G/5G era más elevada en los pacientes con enfermedad coronaria concluyendo que dicho polimorfismo estaba asociado con el pronóstico de pacientes con enfermedad cardiovascular. Asimismo, en un estudio llevado a cabo en 188 sujetos delgados y 70 con sobrepeso, el polimorfismo -675 4G/5G estuvo ligado a la obesidad con un marcado riesgo para la misma (Hoffstedt et al, 2002) y son varios los estudios que han asociado al polimorfismo 4G/5G del PAI-1 como un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares en la población general (Kohler et al, 2000).

En la actualidad, estudios de barrido genómicos amplios indican una posible asociación entre el plimorfismo rs6950982 cerca del gen de la *SERPINE1* y la tensión arterial, (Levy et al, 2007). No obstante, dada su novedad, son necesarios más estudios en este sentido.

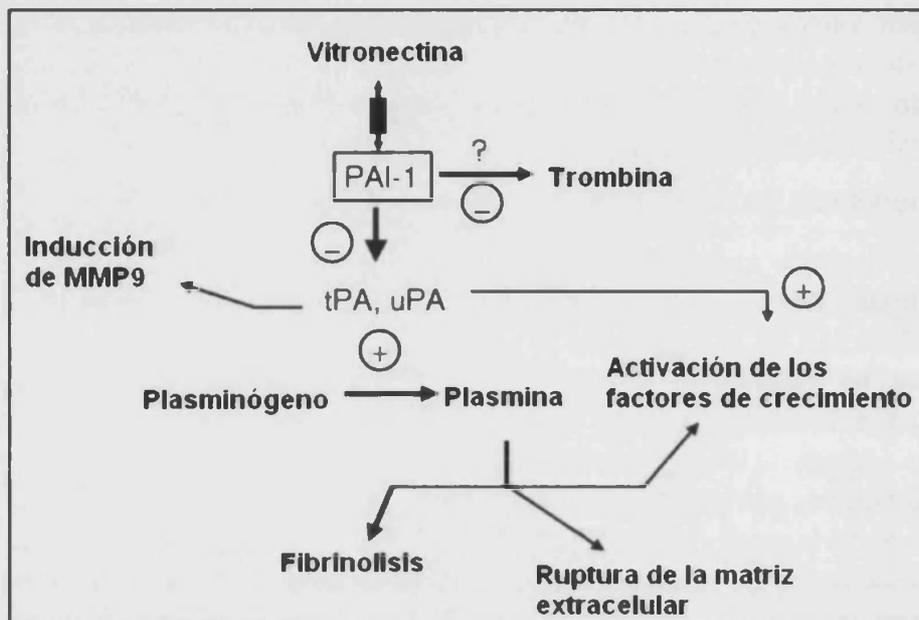


Figura 1.19 Diagrama esquemático de las acciones del PAI-1 como molécula fibrogénica (tomado de Hertig A et al, 2004).

1.4. LA DIETA MEDITERRÁNEA

El concepto de dieta mediterránea refleja los patrones dietéticos característicos de la cuenca mediterránea en los años 60. Se inició con el estudio de los Siete Países, llevado a cabo por Ancel Keys y colaboradores para caracterizar la relación entre dieta y la incidencia y mortalidad por enfermedad coronaria (keys, 1970). Así, varios estudios han asociado una mayor longevidad, menor mortalidad y morbilidad a la dieta mediterránea (Keys et al, 1986; de Lorgeril et al, 1999; Singh et al, 2002; Trichopoulou et al, 2003; Knoops et al, 2004). En la actualidad, numerosas investigaciones clínicas, epidemiológicas y bioquímicas proporcionan bases sólidas sobre los beneficios de la dieta mediterránea. Sin embargo, estos efectos se atribuyen a la dieta mediterránea tradicional y no a los patrones occidentalizados a los que tienden los países del sur de Europa (Serra-Majem et al, 2004). A pesar de que hay diversas variantes de la dieta mediterránea, los componentes alimentarios comúnmente asumidos son: alto consumo de vegetales, fruta, legumbres, cereales enteros y frutos secos, moderado consumo de pescado, leche y productos lácteos, bajo consumo de carne roja y productos cárnicos, aceite de oliva como principal fuente de lípidos y moderada ingesta de alcohol, preferentemente en forma de vino en las comidas (Willett, 1995).

La mayoría de los artículos publicados sobre dieta mediterránea son estudios observacionales. Sin embargo, hay pocos estudios aleatorizados controlados y de

intervención dietética que proporcionen evidencia suficiente para proponer recomendaciones dietéticas a la población sobre los efectos beneficiosos de la dieta mediterránea en la prevención de enfermedades cardiovasculares.

1.4.1. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN ENTRE LA DIETA MEDITERRÁNEA Y LOS FENOTIPOS INTERMEDIOS Y FINALES DE ECV

1.4.1.1 FENOTIPOS INTERMEDIOS

Muchos de los beneficios de la dieta mediterránea se han atribuido a su elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y vitaminas. De hecho el aceite de oliva es uno de los elementos más emblemáticos de esta dieta y sus efectos beneficiosos se han relacionado con su alto contenido en AGM (ácido oleico), así como en los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen.

En este contexto, en el que las ECV van en aumento, se ha propuesto la Dieta Mediterránea tradicional como uno de los mejores patrones dietéticos a seguir dada la evidencia reconocida de la misma para disminuir el riesgo cardiovascular al actuar favorablemente sobre los fenotipos intermedios de riesgo (perfil lipídico, hipertensión, marcadores de inflamación). Así, varios estudios transversales (Panagiotakos et al, 2006; Tzima et al, 2007; Pitsavos et al, 2007) de características similares, con un tamaño de muestra entre 1,762 y 2,032 participantes y evaluación de adherencia a la Dieta Mediterránea (DM), llevados a cabo en Grecia (estudio ATTICA) mostraron que individuos con exceso de peso, sobrepeso (Índice de masa corporal (IMC) 25-29,9 Kg/m²) u obesidad (IMC>30), en el tercil más alto de la puntuación a la DM presentaban menores concentraciones de colesterol total (-13 %; p=0,001), tras ajustar por edad, sexo e IMC respecto al primer tercil. Además a mayor adherencia a la DM menor tensión arterial sistólica (p<0,001) (Tzima et al, 2007; Panagiotakos et al, 2006), así como una disminución del 70% en la prevalencia de hipertensión arterial (Alvarez León et al, 2006) y una disminución significativa de los marcadores de inflamación. Esta reducción en el colesterol también ha sido puesta de manifiesto en algunos ensayos clínicos aleatorizados controlados de intervención, de mayor evidencia científica (nivel I) (Estruch et al, 2006; Vincent-Baudry et al, 2005 (estudio Medi-RIVAGE); Ambring et al, 2004). En este sentido, Estruch et al, (2006) llevaron a cabo un estudio de 3 meses de duración, con individuos, que presentaban diabetes mellitus o uno o más factores de riesgo cardiovascular, los cuales fueron asignados a tres grupos de intervención (n=257-8/grupo): 2 con DM y el grupo control con dieta baja en grasa. Una de las DM estuvo suplementada con aceite de oliva virgen extra (un litro a la semana) y la otra con frutos secos (30 g día, 15 g de almendras + 15 g de nueces) (Estudio PREDIMED). En cuanto al perfil lipídico, ambas DM (DM + aceite de oliva; DM + frutos secos) consiguieron un aumento significativo en los niveles de HDL-C

($p < 0,001$ y $p = 0,006$, respectivamente), así como una reducción significativa ($p < 0,001$ y $p = 0,002$, respectivamente) en el índice aterogénico (relación colesterol total/HDL-C) frente al grupo control. También se observó algo similar para la tensión arterial y los marcadores de inflamación VCAM, ICAM y la glucemia basal (-0,39 mmol/L y -0,30 mmol/L, respectivamente). Sin embargo, sólo la DM suplementada con frutos secos consiguió reducir de forma significativa los niveles de colesterol total ($p = 0,040$) y triglicéridos ($p = 0,022$), respecto al control. Ninguna de las dos dietas mediterráneas redujo de forma significativa los niveles de LDL-C frente a la dieta control baja en grasa.

Igualmente los resultados indicaron una mejora en el perfil lipídico en un estudio aleatorizado cruzado de 4 semanas de duración cada fase (Ambring et al, 2004), llevado a cabo con 22 personas sanas (12H/10M) con el objetivo de establecer si la inclusión de una dieta basada en la mediterránea, rica en ácidos grasos omega 3, esteroles y fibra pero baja en grasa saturada (1869 kcal/d: 48% de la energía carbohidratos, 16% proteína, 34% grasa y 40 g de fibra), ejercía efectos beneficiosos frente a una dieta habitual sueca (2090 kcal/d: 48% carbohidratos, 15% proteínas, 36% grasa, 19 g fibra). Los resultados mostraron una disminución significativa del colesterol total, LDL-C, TG (17%, 22%, 17%) en el grupo que recibió DM durante 4 semanas, respecto a la dieta sueca ($p < 0,05$ en todas las variables) si bien no se obtuvieron diferencias significativas en la glucemia e insulinemia.

La relación entre el consumo de frutos secos y reducción en el riesgo de ECV ha sido establecido en numerosos estudios epidemiológicos. Así, Ros et al, (2004), llevaron a cabo un estudio en Barcelona aleatorizado cruzado en personas con moderada hipercolesterolemia, con el objetivo de establecer si una dieta conteniendo nueces (18% de la energía), las cuales son fuente de antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados, podría mejorar marcadores relacionados con la función endotelial respecto a otra dieta típica mediterránea con similar aporte de energía, grasa, proteínas, hidratos de carbono, pero con aporte de grasa monoinsaturada, tras el seguimiento de cada dieta durante 4 semanas. Al igual que Estruch et al, (2006), observaron una disminución significativa del colesterol total ($p = 0,017$), pero también del LDL-C ($p = 0,010$) con la dieta que aportaba nueces. Sin embargo, no encontraron diferencias en los niveles de TG y HDL-C, aunque sí una tendencia a la disminución en el ratio LDL:HDL colesterol ($p = 0,061$).

También, en relación con el aceite de oliva virgen, respecto a los AGM como intervención dietética única, son pocos los estudios controlados con distribución aleatoria que hayan analizado su eficacia en la prevención primaria de enfermedades cardiovasculares u otras patologías crónicas prevalentes. No obstante en un ensayo clínico no aleatorizado las concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva (PCR), un marcador independiente de riesgo cardiovascular, disminuyeron significativamente (6%; $p < 0,02$) tras dos horas de ingesta de una DM rica en ácidos

grasos monoinsaturados (Blum et al, 2006). Los autores concluyen que este puede ser un mecanismo por el cual la DM tiene efectos protectores frente a la aterosclerosis.

Por otro lado, Psaltopoulou et al, (2004) en un estudio transversal de la cohorte griega del estudio EPIC (European Prospective Investigation of Cancer), evaluaron si la DM en conjunto o el aceite de oliva en particular reducían la presión arterial en 20,343 personas sin diagnóstico de hipertensión arterial. En este estudio, la puntuación a la DM se asoció de forma inversa y significativa con la tensión arterial, tanto sistólica como diastólica, al igual que la ingesta de aceite de oliva, frutas y vegetales.

1.4.1.2 FENOTIPOS FINALES

Entre los estudios que se centran en los fenotipos finales de enfermedad merece destacar El Lyon Diet Heart Study (de Loregeril et al, 1999) que demuestra la eficacia de la DM en la prevención secundaria de las enfermedades cardiovasculares. No obstante, el grupo de intervención con DM recibió una margarina rica en ácido alfa linolénico, hecho que hace distorsionar la interpretación de los resultados, ya que esta margarina no es un nutriente tradicional de los países mediterráneos. Algo parecido ocurre con el Indo-Mediterranean diet Heart study (Singh et al, 2002) donde el grupo de intervención incrementa el consumo de ácido alfa linolénico a través de mostaza y aceite de soja.

Otros dos grandes estudios europeos de cohorte destacados son el EPIC (European Prospective Investigation into Cancer) griego (Trichopoulou et al, 2003; Slimani et al, 2002) que investiga la relación entre la nutrición y el cáncer en 519.978 participantes de 23 centros localizados en 20 países europeos; y el estudio HALE (Healthy Ageing: a Longitudinal study in Europe) (Knoops et al, 2004) que sugieren que una alta adherencia a la DM se asocia con una reducción tanto de la mortalidad global como de la mortalidad cardiovascular.

En conclusión, hasta el momento son pocos los estudios que han evaluado la eficacia de una intervención con una alimentación de tipo mediterráneo para evaluar su eficacia en la prevención primaria de enfermedad cardiovascular. Ante esta necesidad surgió el estudio PREDIMED, con resultados optimistas hasta el momento donde se ha realizado una intervención aleatorizada con DM suplementada con frutos secos o aceite de oliva.

1.5 LA GENÓMICA NUTRICIONAL EN LA ERA ACTUAL

En la actualidad y desde que finalizó el Proyecto del Genoma Humano en Abril de 2003, conocemos la información completa del genoma. Sin embargo, se desconoce el papel de la gran mayoría de los genes que intervienen en el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares y fenotipos relacionados. Es por esta razón por la que resulta de gran relevancia conocer el efecto que tienen las variaciones genéticas en cada uno de los genes identificados involucrados en el metabolismo lipídico, obesidad, glucemia etc. y su interacción tanto con otros genes como con factores ambientales.

Considerando uno de los factores ambientales más importantes la dieta, recientemente, los investigadores han comenzado a estudiar la nutrición molecular para entender mejor los mecanismos implicados en la **interacción gen-dieta** y personalizar las dietas en función de la variabilidad genética. En este sentido, se ha demostrado que el genoma humano es sensible al entorno nutricional en un doble sentido: los nutrientes pueden regular los genes y, además, los genes influyen en el efecto de la dieta (Loktionov A et al 2003). El concepto de interacción gen-dieta describe la modulación del efecto de un componente dietético sobre un fenotipo específico (concentraciones de lípidos en plasma, obesidad, etc.) por un polimorfismo genético (Ordovas JM y Corella D, 2004). Un mejor conocimiento de estas interacciones es lo que permitirá conocer los diferentes requerimientos individuales para prevenir enfermedades cardiovasculares. Este nuevo campo de investigación ha avanzado muy rápido en las últimas décadas gracias en parte a la gran revolución tecnológica a nivel molecular lo que ha conducido al rápido desarrollo de conceptos como es el término de **genómica nutricional**. La genómica nutricional es la ciencia que estudia la interacción funcional entre los alimentos y sus componentes con el genoma de los individuos a nivel molecular, celular y sistémico cuyo objetivo es utilizar una dieta personalizada para prevenir o tratar la enfermedad. Este término de genómica nutricional o nutrigenómica fue acuñado por primera vez en 1999 por DellaPenna en un trabajo relacionado con la bioquímica de las plantas, la genómica y la nutrición para poder mejorar la salud humana. El término de *genómica nutricional* engloba el término de nutrigenética y nutrigenómica (Ordovas JM y Corella D, 2004):

- **Nutrigenética:** estudia la distinta respuesta de los individuos a la dieta en función de sus variaciones específicas en el genoma, es decir, la respuesta fenotípica a la dieta en función del genotipo. Su objetivo fundamental es generar recomendaciones específicas sobre la mejor composición de la dieta tras la identificación de variantes genéticas para el óptimo beneficio de cada individuo. Se ha denominado también como nutrición personalizada o dieta a la carta.

- **Nutrigenómica** se centra en el estudio de los mecanismos moleculares que explican la distinta respuesta fenotípica a la dieta de cada individuo en función de las variaciones en el genoma (genotipo). Esta se centraría mas en estudiar la interacción entre nutrientes y expresión génica.

Como consecuencia de esta revolución tecnológica han aparecido las nuevas “ómicas” que integran, además de las dos anteriores y dentro de esta última otras disciplinas como la **transcriptómica** (permite cuantificar el nivel de expresión de genes, empleando técnicas que permiten analizar miles de moléculas de mRNA al mismo tiempo, mediante una técnica basada en micromatrices), la **metabolómica** (técnicas dedicadas al estudio completo del sistema constituido por el conjunto de moléculas que constituyen los intermediarios metabólicos, metabolitos, hormonas y otras moléculas señal, y los metabolitos secundarios, que se pueden encontrar en un sistema biológico), **proteómica** (estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función siendo posible identificar proteínas que permitieran diagnosticar una enfermedad o pronosticar la evolución de la misma), la **Biología de Sistemas** (integración de datos proteómicos, genéticos, metabolómicos a nivel sistémico) o la **Bioinformática** (cuyo objetivo es la interpretación de los datos para proporcionar mecanismos biológicos que expliquen las observaciones experimentales). Como consecuencia de la aparición de estos nuevos conceptos han aparecido términos como la nutritranscriptómica (estudio de la expresión del ARN mensajero a nivel celular bajo unas condiciones nutricionales), la nutriproteómica (análisis de larga escala de la estructura y función de la proteína así como de las interacciones proteína-proteína en una célula, para identificar dianas moleculares de componentes de la dieta) o la nutrimetabolómica (medida de todos los metabolitos como respuesta del organismo a estímulos nutricionales) (Panagiotou G y Nielsen J, 2009) (Figura 1.20).

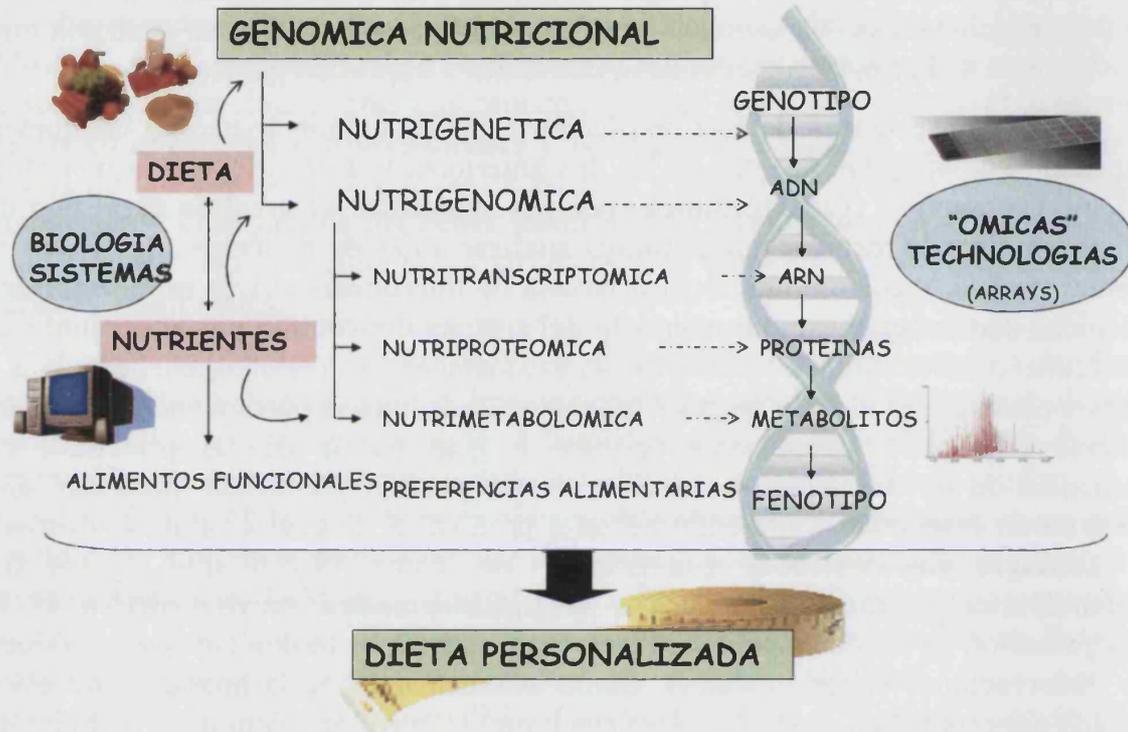


Figura 1.20 Nutrición Personalizada. El término de genómica nutricional se refiere a la nutrigenómica y nutrigenética. La aplicación de la nueva tecnología para la búsqueda del conocimiento de la secuencia del genoma humano ha conducido al estudio de las nuevas "ómicas" para entender las bases moleculares de la enfermedad. Estas disciplinas son la transcriptómica, proteómica y metabolómica que permiten obtener información acerca de fenotipos característicos. Toda esta información contribuirá a crear dietas personalizadas (Tomada del libro: Sustainable Agriculture and New Biotechnologies (ISBN: 9781439825044) capítulo Sustainable Agriculture and New Biotechnologies).

1.5.1 NUTRIGENÉTICA EN LA OBESIDAD Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: DIETA MEDITERRÁNEA Y GENES

En las últimas décadas, el patrón de alimentación ha cambiado considerablemente hacia hábitos menos saludables con una ingesta excesiva de calorías y grasas saturadas. Esto, como factor de riesgo de las ECV, ha contribuido al incremento de sus cifras. Como consecuencia, una de las preguntas más formuladas por los investigadores ha sido qué dieta podría ser la mejor para prevenir los fenotipos alterados que aparecen en las ECV. Grandes debates se han generado en torno a las virtudes de las dietas bajas en carbohidratos y altas en

grasas, las dietas bajas en grasas y altas en carbohidratos, las dietas altas en proteínas o el patrón de Dieta Mediterránea en el control del peso corporal y factores de riesgo cardiovascular relacionados (Sahi I et al, 2008; Larsen TM et al, 2010; Sacks FM et al, 2009). Dada la gran diversidad que existen en cuanto a las recomendaciones y sus efectos varios autores insisten en que no existe una dieta perfecta sino que esta dieta variará en función de las características individuales, ya que es bien conocido que una dieta no resulta igual de eficaz para dos individuos. Mientras algunos individuos parecen no tener respuesta a una intervención dietética (hiporespondedores) otros, tienen una alta respuesta (hiperrespondedores) (Katan MB et al, 1986). Se ha sugerido y existe gran evidencia al respecto que esta variabilidad inter individual en la respuesta a modificaciones dietéticas está determinada por factores genéticos especialmente para los fenotipos relacionados con el metabolismo lipídico (Loktionov A, 2003). La mayoría de los estudios llevados a cabo para determinar si los factores genéticos podrían explicar estas diferencias se basan en el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) así como factores dietéticos relacionados entre los que ganan especial relevancia los integrantes en la Dieta Mediterránea. En la Tabla 1.3 se muestran algunos de los principales estudios llevados a cabo para evaluar modulaciones genéticas según distintos tipos de dietas o macronutrientes.

1.5.1.1 RESULTADOS DE ESTUDIOS DE INTERVENCIÓN

Los estudios de intervención en los que los sujetos reciben una ingesta dietética controlada proporcionan la información más valiosa para el estudio de asociación gen-nutriente-fenotipo. Sin embargo, los estudios de intervención tienen algunas limitaciones como son el bajo número de participantes. El tamaño de muestra es importante en los estudios nutrigenéticos porque de otro modo, existe falta de poder estadístico para valorar las principales asociaciones, además de que la prevalencia de algunos polimorfismos es pequeña y se requiere un tamaño de muestra elevado para estudiar dichas asociaciones. Otra limitación es la escasa duración de los mismos. Una revisión llevada a cabo por Masson et al, (2003), concluyó que hay evidencia para sugerir que variaciones en el gen de la *APOA1*, *APOA4*, *APOB* y *APOE* contribuyen a la heterogeneidad de la respuesta lipídica a intervenciones dietéticas y que todos estos genes están regulados directa o indirectamente por PPARA u otros receptores nucleares. Nuevos ejemplos que confirman la importancia de la interacción gen-dieta en el campo de la nutrigenética son el estudio del gen de la perilipina (*PLIN*) (Corella D et al, 2005; Smith Ce et al, 2010) y SR-BI (Perez-Martinez P et al, 2005).

Recientemente se han publicado algunos estudios que han investigado la modulación genética de la dieta mediterránea en el estudio de intervención que en esta tesis presentamos, el estudio PREDIMED, pero en otro centro, Pamplona. Así, un estudio que analiza un polimorfismo del gen *FTO* (asociado con obesidad)

muestra que el alelo A del polimorfismo rs9939609 en el gen *FTO* no estuvo asociado a nivel basal con peso corporal pero tras 3 años de intervención nutricional con dieta Mediterránea los portadores del alelo A tuvieron una menor ganancia de peso corporal que los sujetos con el alelo ancestral (Razquin C et al, 2010 A). También los sujetos CC para el polimorfismo -174G/C en el gen de la interleukina 6 tuvieron una menor ganancia de peso a los tres años, solo en aquellos sujetos que siguieron una dieta mediterránea suplementada con frutos secos y aceite de oliva virgen (Razquin et al, 2010 B).

1.5.1.2 RESULTADOS DE ESTUDIOS OBSERVACIONALES

Los estudios observacionales tienen la ventaja de que incorporan un número elevado de participantes y la habilidad para estimar los hábitos dietéticos. Además, cuentan con la ventaja de que por el principio de la randomización mendeliana, la distribución de las variantes genéticas en la población es independiente de los comportamientos alimentarios. Aunque en la actualidad están aumentando el número de estudios que analizan interacciones gen-dieta, son pocos los estudios que han investigado la interacción entre SNPs en genes candidatos y factores de riesgo cardiovascular analizando el consumo de una Dieta Mediterránea o la ingestas de ácidos grasos monoinsaturados/poliinsaturados/saturados (AGMI, AGPI, AGS).

Uno de los genes más estudiados ha sido el polimorfismo Pro12Ala en el gen *PPARG* y la ingesta de AGMI. Los sujetos obesos con el alelo Ala12 tienen mayor índice HOMA cuando ingieren bajas cantidades de AGMI. También, un estudio cuyo objetivo fue estudiar si la ingesta dietética modulaba la asociación de variaciones en el gen de la *APOA5* y el peso corporal en la población de Framingham, encontró una interacción significativa entre el polimorfismo del promotor -1131T>C y la ingesta de grasa, particularmente los AGMI (Corella D et al 2007). El estudio del polimorfismo C677T en el gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) es otro ejemplo de modulación de la oxidación de LDL por la Dieta Mediterránea (Pitsavos et al, 2006). Recientemente se ha publicado una relevante interacción gen-dieta en una variante del promotor de la *APOA2*. En este estudio participaron 3,462 voluntarios de tres poblaciones diferentes y se estudió la interacción entre el polimorfismo -265T>C en el gen de la *APOA2* la ingesta de alimentos, y el IMC. Los participantes portadores de la mutación que ingerían cantidades abundantes de grasa saturada presentaban mayor prevalencia de obesidad mientras que esto no ocurría si la fuente de ácidos grasos era monoinsaturada/poliinsaturada. Estos resultados se replicaron por primera vez en tres poblaciones independientes (Corella D et al, 2009). Posteriormente, estos autores replicaron esta interacción en población mediterránea y China (Corella D et al, 2010) confirmando, la importancia de las modulaciones genéticas por factores

dietéticos y la necesidad de replicar los resultados obtenidos en este campo de investigación

Tabla 1.3 Estudios nutrigenéticos (interacción gen-dieta) de intervención nutricional u observacionales llevados a cabo para el estudio de la obesidad, metabolismo de lípidos y parámetros relacionados.

Autor	Fenotipo	Gen	Interacción gen -dieta
<i>Variables antropométricas</i>			
Luan et al, 2001	IMC	Pro12Ala PPARG	Portadores de Ala tenían IMC mayor que Pro, pero cuando el ratio AGPI:AGS fue alto se obtuvieron resultados opuestos.
Memisoglu et al, 2003	IMC	Pro12Ala PPARG	Entre los individuos Pro/Pro los que estaban en el quintil superior de ingesta de grasa tenían mayor IMC en comparación con los del quintil inferior. En 12Ala no hubo asociación.
Robitaille et al, 2007	Circunferencia de la cintura	Pro12Ala PPARA	Interacción Pro12Ala con la ingesta de grasa modulando la circunferencia de la cintura.
Corella et al, 2009	IMC y Obesidad	-265 T>C APOA2	Participantes portadores de la mutación que ingerían cantidades abundantes de grasa saturada presentaban mayor prevalencia de obesidad
Corella et al, 2010	IMC y obesidad	-265 T>C APOA2	Interacción -265CC con la ingesta de AGS modulando el riesgo de obesidad.
Corella et al 2010	IMC y obesidad	rs9939609 FTO	Interacción rs9939609 con nivel educativo. Los portadores del alelo A tenían mayor riesgo de obesidad e IMC solo si no tenían estudios universitarios.
Razquin et al, 2010	Peso	rs9939609 FTO	El alelo A estuvo asociado con mayor peso al inicio del estudio. Tras 3 años de intervención con dieta Mediterránea los portadores de A tuvieron menor ganancia de peso
Razquin et al, 2010	Peso	+45T/G, +276G/T Adiponectina	Genotipo GG (+45T/G) estuvo asociado con mayor ganancia de peso tras tres años de intervención. TT (+276G/T) estuvo asociado con mayor ganancia de peso corporal en hombres. La dieta mediterránea suplementada con AOV y FS revirtió estos efectos.
Razquin et al, 2010	Peso	-174G/C IL-6	Sujetos CC que siguieron una dieta mediterránea suplementada en AOV tuvieron menor ganancia de peso tras 3 años de intervención

Tabla 1.3 Estudios nutrigenéticos (interacción gen-dieta) de intervención nutricional u observacionales llevados a cabo para el estudio la obesidad, metabolismo de lípidos y parámetros relacionados (continuación).

Autor	Fenotipo	Gen	Interacción gen -dieta
<i>Metabolismo lipídico</i>			
Lopez-Miranda et al, 1994	LDL-C	-75G>A APOA1	Evaluó la influencia de la respuesta postprandial del LDL-C a la ingesta de AGMI. Tras el consumo alto de AGMI los portadores de A aumentaron la LDL-C pero no los GG
Jansen et al, 1997	LDL-	<i>Thr347Ser</i> <i>APOA4</i>	Los portadores de 347Ser presentaron mayor disminución de LDL-C postprandial cuando cambiaron de una dieta rica en AGS a dieta del programa nacional de educación en colesterol
Campos et al, 2001	VLDL, HDL-C	<i>APOE</i>	Mayor VLDL y menor HDL-C en E2 con un consumo alto de grasa saturada.
Corella et al, 2001	LDL-C	<i>APOE</i>	E2 menor LDL-C en aquellos considerados como bebedores moderados de alcohol que en los no bebedores y mayor LDL-C en bebedores con el alelo E4.
Brown et al, 2003	CT y LDL-C	T455C y T625 <i>APOC3</i>	Homocigotos -45T-625T la ingesta de grasa saturada estuvo asociada a incremento de LDL-c.
Tai et al, 2005	TG y APOCIII	L162V <i>PPARA</i>	162V mayores concentraciones de TG y APOC3 solo en personas con bajo consumo de AGPI.
Robitaille et al 2007	Lípidos plasmáticos	Leu72M et Grelina	Interacción Leu 72Met con la ingesta de grasa modulando concentraciones de TG.
Ordovas 2002	HDL-C	-514C>T <i>LIPC</i>	El alelo T estuvo asociado con mayores HDL-C en sujetos que consumían <30% de la energía de la grasa.

Aunque la evidencia actual tanto de estudios nutrigenéticos y nutrigenómicos experimentales como observacionales no son suficientes para comenzar a realizar recomendaciones nutricionales personalizadas basadas en la información genética, existe un gran número de SNPs que modulan la respuesta individual a la dieta como prueba de cómo las interacciones gen dieta pueden modular la influencia del metabolismo lipídico en particular (más evidencia) y otros fenotipos. Resulta crucial que los estudios que han hallado interacciones de este tipo sean replicados

para aumentar la evidencia científica y así poder establecer recomendaciones personalizadas sólidas.

1.5.2 NUTRIGENÓMICA EN LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES: DIETA MEDITERRÁNEA Y EXPRESIÓN GENÉTICA

Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, existe una evidencia creciente de que la DM, cuyo factor emblemático es el AOV, tiene un efecto beneficioso en las enfermedades asociadas con el daño oxidativo, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y envejecimiento, metabolismo lipídico, entre otras.

El aceite de oliva virgen es un alimento funcional que contiene unos niveles elevados de ácidos grasos monoinsaturados y un número de componentes minoritarios. Estos son conocidos como componentes fenólicos. Estos componentes fenólicos tienen una función reconocida y beneficiosa para las concentraciones de lípidos en plasma y el daño oxidativo (especialmente relacionado con las enfermedades cardiovasculares). Se cree que los beneficios derivados del consumo de AOV son debidos a la interacción de sus nutrientes y componentes minoritarios con genes.

Distintos estudios han mostrado cambios en la expresión de genes mediados por el consumo de AOV. (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Estudios nutrigenómicos relacionados

Autor	N/duración	Intervención	Cambios de expresión	Ruta implicada
Konstantinidou et al, 2010	90 (20-50 años) 3 meses	1) DM +AOV	<i>INF-y</i> <i>ARHGAP15</i> <i>IL7R</i>	Inflamación
		2) DM+ AOV lavado	<i>ADRB2</i> <i>POLK</i>	Estrés oxidativo
		3) Control		
Konstantinidou et al, 2009	6 Estudio postprandial (0-6h)	50 ml AOV (26,082 genes)	<i>USP48</i> <i>OGT</i> <i>AKAP13</i> <i>IL10</i> <i>DCLRE1C</i> <i>POLK</i>	Procesos celulares Inflamación Daño ADN

Khymenets et al, 2009	6 H(262-28 años; 4 M (20-44) 3 semanas	AOV (25 ml/día)	<i>ADAM17, ALDH1A, BIRC1, ERCC5, LIAS, OGT,PPARB P,TNFSF10, USP48, XRCC5</i>	Mecanismos implicados en la arterosclerosis
Camargo et al, 2010	20 con SM (56 años, 9 H, 11 M) Estado postprandial	Desayuno con AOV (40 ml) o CH	<i>EGR1 IL1B, IL6 CCL3 CXCL1 CXCL2 CXCL3 CXCR4 TRIB1, NFKBIA</i>	Inflamación
Llorente-Cortes et al, 2009	48 (55-80 años)	DM+AOV DM+FS Control	<i>COX-2 LRP1 MCP-1 CD36 TFPI</i>	Inflamación, formación de células espumosas, trombosis
De Mello et al, 2008	VD 34sobrepeso SM 33 semanas	Reducción de peso (n=24) Grupo control (n=10)	<i>TLR4 TLR2 CCL5 TNFRSF1A IKBKB</i>	Relacionados con la sensibilidad a la insulina
Crujeiras et al, 2008	12 Obesos (37,7 años) 8 semanas	Dieta hipocaloric a	<i>SIRT1 SIRT2 NDUFS2</i>	

N: tamaño de muestra, DM: Dieta Mediterránea, AOV: aceite de oliva virgen, FS: frutos secos.

1.5.3 INCONVENIENTES METODOLÓGICOS DE LOS ESTUDIOS DE GENÓMICA NUTRICIONAL.

A pesar del creciente número de resultados relacionados con la genómica nutricional, el progreso en este campo de investigación está obstaculizado por la insuficiencia de los métodos experimentales actuales para abordar eficazmente la

complejidad biológica de los fenotipos, la ingestas dietéticas, poder estadístico, antecedentes de los participantes, etc.

1.5.3.1 ESTUDIOS NUTRIGENÉTICOS

Para incrementar la validez de los estudios individuales en nutrigenética uno de los aspectos cruciales es la replicación. Y para ello, es crítico controlar la información potencial y los sesgos de selección para evitar que se impida la correcta replicación de estudios. Sin embargo, existen algunas limitaciones en este campo de investigación:

- Dificultad para llevar a cabo estudios de intervención dietética
- Estudios observacionales es muy importante recoger de manera adecuada la información nutricional para minimizar los sesgos de información. Se requiere una estandarización y el uso de biomarcadores específicos para mejorar el estudio de las interacciones gen-dieta.
- Falta de poder estadístico en los estudios de intervención, por la dificultad de incluir un número elevado de participantes.
- Falta de interpretación y uso correcto de los métodos estadísticos.
- Validez de las determinaciones genéticas.

Para evitar limitaciones en cuanto a los métodos clásicos de medida de ingesta dietética, se están realizando muchos esfuerzos para conseguir estandarización de los datos entre estudios. Para ello el proyecto PHENX (Medidas de consenso para fenotipos y exposiciones) (Instituto de Investigación Nacional del genoma humano) (www.phenx.org) tiene como objetivo facilitar la integración de los estudios epidemiológicos y genéticos para estandarizar protocolos en los estudios de asociación del genoma completo (GWAs) que permitan realizar análisis validos de comparación en los estudios transversales.

1.5.3.2 ESTUDIOS DE NUTRIGENÓMICA

Los métodos de análisis de expresión génica a partir de fragmentos de cDNA son difíciles de llevar a cabo por la falta de reproducibilidad. Los datos post análisis y la normalización han sido siempre una fuente de variación entre los estudios, independientemente de la plataforma transcriptómica usada. La organización de "Datos de Expresión Génica por Microarray" (Microarray Gene expression Data) ha establecido unas guías para la interpretación y anotación de los datos para los microarrays (guías MIAMI, Minimum Information for Biological and Biochemical Investigations). Aunque en la actualidad las plataformas utilizadas (Affimetrix, Illumina, ABI) están bastante bien customizadas la interpretación de los datos todavía es un gran reto y uno de los principales problemas de estos

estudios. Los estudios de intervención dietética en humanos están aumentando en la última década y la procedencia de la muestra utilizada es también otra limitación para la comparación de resultados. El material de ARN en los estudio de intervención derivan fundamentalmente de sangre total o de células mononucleares periféricas aunque algunas muestras proceden también de biopsias. Esta diversidad complica de nuevo las comparaciones e interpretaciones entre estudios. Aunque en la actualidad la tecnología de alto rendimiento basada en arrays de expresión génica está mejorando constantemente con análisis más adecuados y herramientas para la interpretación de los datos, todavía hay existen inconvenientes técnicos y biológicos (recogida de la muestra y tratamiento).

1.6 GENÉTICA DEL SABOR. PREFERENCIAS ALIMENTARIAS

La alimentación es un proceso fisiológico influenciado por factores genéticos y factores medioambientales. Para comprender la influencia genética en la variación normal o patológica del comportamiento alimentario hay que entender las bases fisiológicas. En la aceptación de los alimentos desempeña un papel fundamental las sensaciones o percepciones del sabor. Las sensaciones químicas (sabor, olor, irritación química) son los guardianes nutricionales del cuerpo, los cuales determinan qué alimentos deberíamos ingerir y cuales deberíamos rechazar. Todos estamos familiarizados con la observación de que el mismo alimento puede saber muy diferente por dos individuos. A pesar de que esta diferencia puede ser cultural y medioambiental existe también, una carga genética en cuanto a la preferencia por el sabor. La habilidad para distinguir alimentos nutritivos de perjudiciales fue una característica crítica para la supervivencia de los humanos, que tenían que enfrentarse a la tarea de seleccionar sus alimentos de una gran variedad de fuentes naturales. El consumidor habitual no se enfrenta a esta amenaza; sin embargo, el sabor permanece siendo una fuente determinante en la elección de los alimentos y es una de las razones más importantes para elegir un alimento (Glanz k et al, 1998).

Fisiología del sabor

Hay cinco modalidades de sabor que pueden ser detectados por la mayoría de los mamíferos: dulce, salado, ácido, amargo y umami (Dulac C, 2000, Kinamon SC, 2000) (Figura 1.21). Para nuestros antecesores la habilidad de distinguir el sabor fue muy importante para diferenciar sustancias tóxicas de los alimentos. La percepción de cualidades específicas del sabor es dependiente del contexto y la concentración. Por ejemplo, el dulce es percibido como bueno y es ampliamente aceptado, mientras que el amargo es asociado con el rechazo de alimentos. El umami, o el sabor del glutamato monosódico, aunque proporciona una señal del contenido de aminoácidos, es agradable en general y es menos aceptado cuando se

disuelve en agua que al tomarse en sopa. El salado es agradable y deseable a bajas y moderadas concentraciones, y es rechazado a altas concentraciones. El ácido tiene una relación concentración-agrado similar al salado. El amargo es el sabor opuesto al dulce y se asume que es desagradable a todas las concentraciones, sin embargo, en la práctica los humanos consumen alimentos y bebidas amargas.

La percepción del sabor comienza en la lengua y en el paladar, a la vez que las sustancias químicas de los alimentos interactúan con los receptores del sabor. Los receptores del sabor pueden distinguirse en tipo I, II y III. Las papilas gustativas se encuentran distribuidas a través de la lengua en estructuras llamadas papilas que pueden ser de tres tipos: fungiformes, foliáceas o circunvaladas (Cardello AV, 1978) (Figura 1.21). La densidad de la papila fungiforme en la lengua está relacionada con la percepción del sabor, de manera que a mayor densidad con mayor intensidad perciben las personas, por ejemplo, una determinada concentración de azúcar (Miller IJ et al, 1990). Esta relación también ocurre con el sabor amargo (Bartoshuk LM et al, 1994)

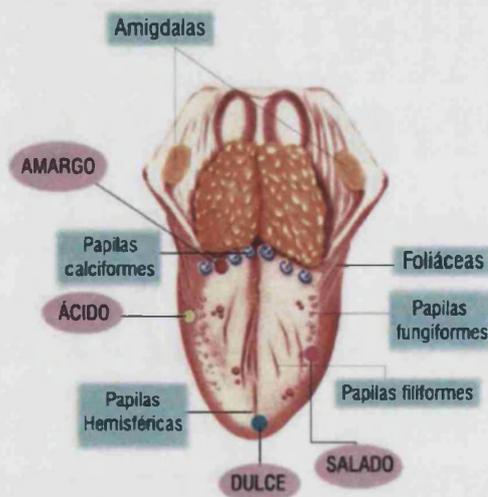


Figura 1.21 Localización de los receptores de los diferentes sabores en la lengua y distribución de las papilas gustativas en la lengua (http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/073/htm/sec_10.htm)

Aspectos genéticos del sabor

El comportamiento alimentario es un rasgo heredable (cantidad de calorías consumidas, frecuencia, porciones, etc.). Se estima que la heredabilidad genética va de un 20 a un 40 % (Rankinen T y Bouchard C, 2006). Tal y como se ha comentado anteriormente existe una variabilidad genética en cuanto a las preferencias del sabor.

El primer descubrimiento de la base genética del sabor fue un hallazgo accidental de Arthur L Fox mientras trabajaba en "Dipont Chemical Company". Fox descubrió una gran variedad en la respuesta entre sus compañeros, al compuesto químico "feniltiocarbamida" (PTC) y algo similar con el 6-n-propiltiouracil (PROP) con el que trabajaba en el laboratorio (Bartoshuk LM, 2000). En una reunión de la Asociación Americana para el avance de Ciencia, en 1931, él y un colega evaluaron a la audiencia y encontraron que el 28 % de la misma no percibía el PTC, el 65% podía y el resto no pudieron ser clasificados. Subsecuentemente, los "catadores" fueron divididos en aquellos que eran muy sensibles, conocidos como "super catadores" (25 % de la población) y aquellos que también eran sensibles pero no en tal grado, llamados catadores (50% de la población).

Amargo

El sabor amargo ha sido el más estudiado de todos los sabores a través de los dos compuestos sintéticos mencionados anteriormente, la feniltiocarbamida (PTC) y el 6-n-propiltiouracil (PROP). Estos compuestos no se encuentran en los alimentos, pero químicamente están estrechamente relacionados con los encontrados en los vegetales, lo que podría tener una relación con la elección de alimentos en función de ser o no ser catador y, por tanto, en la percepción de estos compuestos del sabor amargo. En la última década, la literatura científica ha aumentado dirigida a conocer el papel de este fenotipo en relación a los patrones de selección de alimentos. Así, no es sorprendente que los supercatadores tiendan a no gustarles los vegetales tales como las crucíferas, que contienen compuestos amargos secundarios. Sin embargo existen resultados conflictivos, algunos debidos a la falta de estandarización en los métodos de screening para PTC/PROP, lo que hace difícil la comparación entre estudios. Por otro lado, la mayoría de los estudios evalúan la relación entre PROP y los comportamientos alimentarios ignorando los factores conocidos determinantes en la selección de alimentos como las actitudes hacia la salud y la nutrición, las neofobias, etc.

En cuanto la fisiología del sabor amargo, se ha visto que existen diferencias fisiológicas, ya que los no catadores tienen una menor densidad de las papilas fungiformes mientras que los supercatadores poseen la densidad más alta (Essick GK et al 2003). Estas características pueden explicar parte de las diferencias en la percepción de sabores.

Los componentes heredables de la percepción al sabor amargo de los compuestos PROP y PTC son fáciles de medir gracias a la gran variedad de respuesta que existe entre la población (Guo SW, Reed DR, 2001). Algunos individuos pueden percibirlo, mientras que otros no. Aproximadamente el 70% de los caucásicos de Europa del este son considerados como catadores, mientras que el 30% como no catadores. La frecuencia de no catadores varía entre poblaciones,

desde 7% hasta >40% (Krebs JR, 2009). Así, en China, Japón y África subsahariana la frecuencia es menor (10-30%) y es superior al 50 % en algunos subgrupos de india (Guo SW, Reed DR, 2001). Las razones de esta diversidad no están claras. La sensibilidad a estos dos compuestos también depende de la edad y el sexo. No se han encontrado diferencias por sexo en niños jóvenes (Mennella JA, 2010; Keller KL, Tepper BJ, 2004; Keller KL et al 2010). Sin embargo, cerca de la pubertad, comparativamente, más hombres son no catadores y más mujeres catadoras (Goldstein GL et al 2007). Además, la mayoría de los estudios coinciden en que la sensibilidad al PROP/PTC declina progresivamente con la edad (Mennella JA, 2010). Batoshuk y colaboradores (1994), (Bartoshuk LM et al, 1994) fueron los primeros en reconocer a un pequeño grupo de supercatadores (extrema percepción) y esta característica es típicamente más común en mujeres que en hombres.

Los humanos poseemos 25 genes receptores para el sabor amargo funcionales que están localizados en grupos en los cromosomas 5p, 7q, 12p. Estos genes comprenden la familia de genes del sabor amargo *TAS2R* (Chandrashekar J et al, 2000). *TAS2R38*, es el gen que controla la sensibilidad al sabor PTC y está localizado en el cromosoma 7q (Kim UK et al 2003). Hay tres polimorfismos conocidos en este gen que conllevan un cambio de aminoácido en las posiciones A49P, A262V y V296I, dando lugar a los haplotipos PAV (variante catadora) y AVI (variante no catadora). Los individuos sensibles al PROP poseen uno o dos alelos dominantes (PAV/PAV o PAV/AVI) mientras que los no sensibles son recesivos para este rasgo (AVI/AVI) (Kim UK et al 2003, Bufe B, 2005). La ocurrencia de las otras variantes (AAV y PVI) es rara o limitada a otras poblaciones. El locus *TAS2R38* recoge el 60-85% de la variación fenotípica de este rasgo.

Otros genes han sido estudiados en relación al sabor amargo. Así, el *TAS2R16* reconoce las α -glucopiranosidos incluyendo la amigdalina (que se encuentra en las almendras amargas) y la salicina (compuesto similar a la aspirina). *TAS2R43* y *TAS2R44* son activados por la sacarina y el acesulfamo-k. Recientemente el *TAS2R38* era considerado como el único gen asociado con una alta variación fenotípica. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que variación en estos dos genes (*TAS2R43* y *TAS2R44*) son responsables de la percepción del sabor amargo de la sacarina (Pronin AN et al, 2007) (Tabla 1.5).

Tabla 1.5 Genes y polimorfismos más comúnmente estudiados en relación al sabor amargo (Feeney E et al, 2011)

GEN	Polimorfismos	Características/asociaciones
<i>TAS2R38</i>	A49P, A262V y V296I rs745162 rs1285895 rs765007	PAV: haplotipo catador. Asociado con alta sensibilidad. AVI: haplotipo no catador: asociado con patrón de ingesta sano (Feeney E et al 2011)
<i>TAS2R43</i>	W35S	W asociado con alta sensibilidad.
<i>TAS2R44</i>	W25R	Responsables del sabor amargo de la sacarina
<i>TAS2R16</i>	G516T	G asociado con baja sensibilidad. Relacionado con respuestas de comportamiento al alcohol

En cuanto a la metodología para el screening del PTC/PROP, como se ha comentado antes, la falta de estandarización es una limitación importante para comparar resultados de diferentes estudios. Las concentraciones utilizadas para la percepción del sabor amargo detectan distintos umbrales capaces de separar los catadores de los no catadores. Sin embargo, los catadores medios son más difíciles de detectar. Se han utilizado distintas metodologías para su determinación así como distintas escalas:

- 1) Papel de filtro impregnado en estas sustancias (Zhao L et al, 2003).
- 2) Soluciones únicas de diferentes concentraciones para estimar la intensidad (Tepper BJ et al, 2001).
- 3) Escalas categóricas (cero, muy débil, muy fuerte). Escala marcada por magnitud: es una escala semilogarítmica con etiquetas descriptoras usadas en el test sensorial.
- 4) Separar a los sujetos en grupos en función de si son catadores basado en el hipotético modelo mendeliano de las frecuencias fenotípicas (25% no catadores, 50% catadores medios, 25% supercatadores).

Por último, la gran relevancia concedida a este sabor y a su diferente percepción por los individuos viene atribuida a su asociación con las preferencias alimentarias y al estudio de la posible relación con la ingesta de vegetales y así, con fenotipos tales como la obesidad o enfermedades crónicas.

En cuanto a la ingesta de vegetales amargos, es decir, todos aquellos que pertenecen a la familia de las crucíferas y brassica, estudios iniciales indicaban que había una relación inversa entre la habilidad para percibir el PTC y las preferencias por el consumo de vegetales que contenían glucosinolatos (Fischer R et al, 1961). Sin embargo, subsecuentes estudios proporcionaron limitado apoyo a esta

hipótesis. El estatus de PROP/PTC no estuvo asociado con el rechazo de vegetales amargos en mujeres de edad avanzada o universitarios (Tepper BJ et al 2009). Otro estudio llevado a cabo en mujeres jóvenes mostró que las supercatadoras mostraban una menor preferencia por la coliflor, espinacas, que los no catadores. Sin embargo, un estudio reciente no encuentra diferencias entre catadores y no catadores en cuanto a sus preferencias o ingesta de vegetales amargos (Drewnowski A et al, 2007) poniendo de manifiesto la controversia que existe al respecto. De igual modo, existe una alta controversia entre la percepción del PROP y el peso corporal. Algunos estudios indican que la percepción del sabor amargo está asociado con el IMC pero sólo en mujeres de tal manera que los no catadores tienen un mayor IMC que los medios catadores o los supercatadores (Tepper BJ et al 2008). Si se examina además el genotipo, un estudio llevado a cabo por Tepper et al, (2008) concluyó que el genotipo AVI/AVI estaba asociado con una dieta más saludable en mujeres adultas aunque, contrariamente, tuvieran una ingesta energética superior. Esto indica que aunque las mujeres AVI/AVI están consumiendo más energía que PAV/AVI o PAV/PAV sus elecciones son más saludables. En conclusión, aunque los factores genéticos condicionan la elección de los alimentos, también la edad, el sexo y otros factores ambientales contribuyen de manera importante en la ingesta de alimentos.

Dulce

La percepción del sabor dulce, al igual que la del sabor umami y amargo está mediada por receptores de proteínas G acopladoras codificadas por la familia de genes receptores del sabor *TAS1R* y *TAS2R*. Mientras que para el sabor amargo hay más de 20 receptores, para el sabor dulce interviene uno, la familia de proteínas 1 (*TAS1R*) cuyos genes codificantes son *TAS1R2* y *TAS1R3* lo cual lo hace atractivo para búsqueda de cambios genéticos que afecten a la percepción del sabor dulce (Figura 1.22).

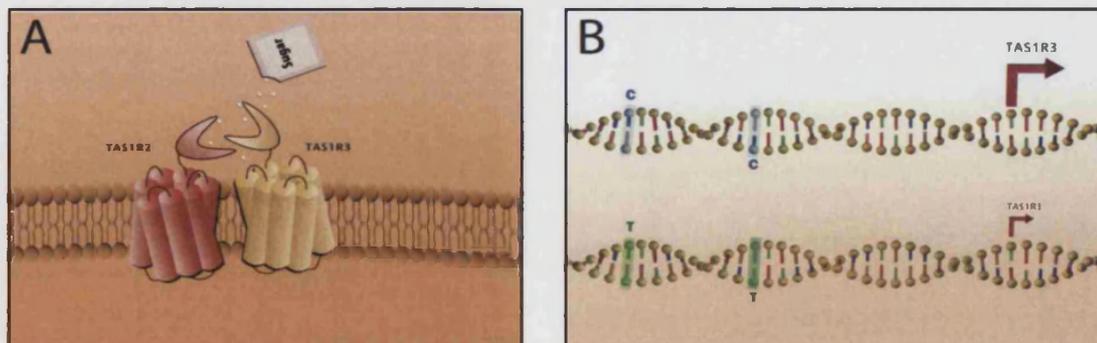


Figura 1.22 Receptores del sabor dulce (*TAS1R2* y *TAS1R3*) (A). Cambios en la región promotora de CC a TT reducen la transcripción de la subunidad *TAS1R3*. Sujetos con el alelo TT tienen reducida la sensibilidad a la sacarosa en comparación con los CC (Mainland JD y Matsunami H, 2009)

Un estudio reciente ha identificado dos SNP no codificantes en el gen *TAS1R3* y sus resultados muestran que variaciones en el dulce estaban explicadas por diferencias en la actividad del promotor asociado a estos dos SNP (Fushan AA et al 2009). Estos SNP también podrían influir en la percepción del sabor umami dado que la subunidad *TAS1R3* también forma parte de este sabor (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Genes y polimorfismos más comúnmente estudiados en relación al sabor dulce (Eny KM et al, 2010).

GEN	Polimorfismos	Características/asociaciones
<i>TAS1R3</i>	C1266T	El alelo T resulta en una menor actividad del promotor
	C1572T	

En cuanto al sabor dulce hay estudios que relacionan variaciones en la percepción del sabor amargo y el dulce. Algunos estudios en adultos han visto que los supercatadores para el PROP perciben con mayor intensidad soluciones de sacarosa, de modo que el 67% de los supercatadores no les gusta el sabor dulce (Lucchina LA et al, 1998). Sin embargo, en niños se han encontrado resultados opuestos de manera que los niños catadores tienen mayor preferencia por el dulce (Mennella JA et al, 2005). Esto pone de manifiesto la necesidad de continuar investigando acerca de la relevancia de la percepción del sabor dulce en la elección de alimentos y en sus consecuencias para la salud.

Umami

La palabra umami es un término japonés y fue acuñada por Kikunae Ikeda en 1908 para el sabor creado a partir de algas, pescado seco y champiñones. En inglés, el sabor umami es etiquetado para el sabor sabroso de la carne y la sopa. Los compuestos que posee el sabor umami incluyen las sales de L-glutamato (como el monosodio glutamato o el monopotasio glutamato), ribonucleotidos y otros aminoácidos. La percepción del sabor umami está codificada por los genes de los receptores del sabor umami pertenecientes a la familia de proteína 1, *TAS1R1* y *TAS1R3*. Algunas investigaciones han propuesto que variaciones en el receptor del glutamato 1 podrían influenciar la percepción del sabor umami. (Toyono T et al, 2005) siendo así varios los SNP que se han estudiado (Tabla 1.7). Un estudio llevado a cabo en 242 sujetos para estudiar las variaciones del sabor umami (a través de la ingesta de glutamato monosódico en distintas concentraciones) mostró que había correlación entre la percepción del sabor umami y variaciones en el gen *TAS1R3* (Chen QY et al, 2009).

Tabla 1.7 Genes y polimorfismos más comúnmente estudiados en relación al sabor umami.

GEN	Polimorfismos	Características/asociaciones
<i>TAS1R3</i>	R757C	C asociado con menor sensibilidad.
	R247H	H asociado con un incremento en la sensibilidad (posiblemente por un aumento en la activación del sistema del sabor amargo por el L-glutamato.
	A5T	A asociado con mayor percepción
	C2269T	T más frecuente en no catadores
<i>TAS1R1</i>	A372T	T asociado con mayor sensibilidad
	G1144A	A asociado con mayor sensibilidad
	C329T	T asociado con menor sensibilidad

Estudios de palatabilidad en diferentes culturas y grupos de edad han confirmado que las sustancias del sabor umami añadidas a los alimentos aumentan la palatabilidad. Lo que todavía no está claro es el mecanismo por el cual el monosodio glutamato exhibe la característica de palatabilidad y si estas características estarían relacionadas con la elección de alimentos más sabrosos y ello con la manifestación de distintos fenotipos.

Salado y Ácido

El salado y el ácido son los dos sabores menos estudiados. Los receptores de estos sabores son canales iónicos y no está claro qué genes codifican para estos receptores.

El papel de la percepción del PROP en la percepción del cloruro sódico (NaCl para evaluar el sabor salado) permanece controvertido. Algunos estudios han mostrado que el NaCl a altas concentraciones es más intenso en los supercatadores que en los otros grupos aunque en general este efecto parece ser pequeño (Yeomans MR et al, 2007).

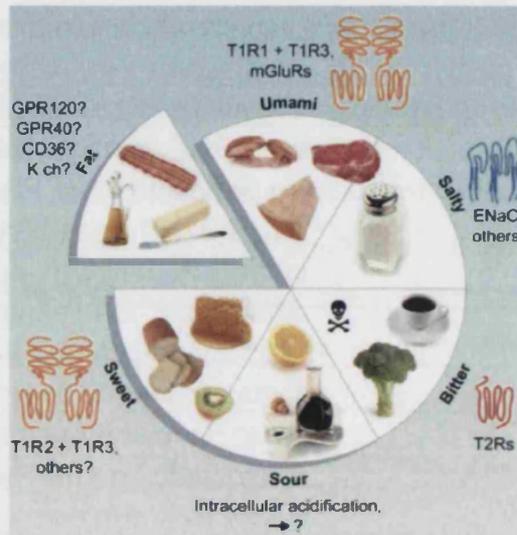


Figura 1.23. Cualidades del sabor, receptores y detección del sabor así como ejemplos de los estímulos naturales. Dulce, ácido, amargo, salado y umami son detectados por las papilas gustativas. (Chaudhari N y Roper SD, JCell Biol, 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*La duda es la madre del descubrimiento.
Ambrose Bierce*

2.1 HIPÓTESIS

La Hipótesis general del proyecto está basada en la existencia de una interacción entre la susceptibilidad genética y la influencia ambiental determinando el riesgo de obesidad y de enfermedades cardiovasculares, entre ellas los desórdenes relacionados con el metabolismo lipídico. Entre todos los factores ambientales, la dieta tendrá una importancia crucial. De manera operativa esta hipótesis se puede formular en el sentido de que determinados polimorfismos genéticos en genes candidatos clave, se asociarán con fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular (obesidad y desórdenes relacionados con el metabolismo lipídico) lo que permitirá identificar individuos de mayor riesgo genético para estas enfermedades, pero que sin embargo, esa asociación no es determinista y estará fuertemente modulada por la dieta, pudiéndose identificar determinados alimentos o patrones de consumo de alimentos así como otros factores ambientales (actividad física, tabaco) capaces de modificar la influencia genética. La identificación de estas interacciones gen-dieta o gen-ambiente permitirá obtener conocimiento para realizar futuras recomendaciones dietéticas más personalizadas basadas en las variantes genéticas de susceptibilidad genética que posee cada grupo de individuos.

Operativamente, esta hipótesis general puede expresarse a su vez a través de los objetivos que se plasman en la sección que viene a continuación.

2.2 OBJETIVOS

El objetivo general de la tesis es investigar la influencia genética y su modulación ambiental en fenotipos de obesidad y de riesgo cardiovascular en varias muestras poblacionales, desde una aproximación de genómica nutricional.

Este objetivo general se ha llevado a cabo a través de los distintos objetivos específicos:

1. Seleccionar, mediante revisión bibliográfica, polimorfismos genéticos en genes candidatos clave, determinando la obesidad y parámetros relacionados y concentraciones plasmáticas de lípidos, que sean modulables por los componentes de la dieta o factores ambientales y realizar el genotipado de dichos polimorfismos en los participantes en el estudio PREDIMED, estudiando su asociación de manera transversal al inicio del estudio.
2. De acuerdo con ello, estimar la prevalencia de las variantes genéticas seleccionadas en distintos genes candidatos relacionados con obesidad y factores de riesgo cardiovascular incluyendo los siguientes polimorfismos:
 - a) Genes implicados en obesidad y otros parámetros antropométricos (rs1466113 en el gen *SSTR2*, rs7561317 *TMEM18*, rs2568958 en el gen *NEGR1*, rs7138803 en el gen *FAIM2*, rs2167444 y rs508384 en el gen *SCD1*, rs3818292 y rs7069102 en el gen *SIRT1*, rs5082 en el gen *APOA2* y rs17020112, rs10863430, rs3748022, rs10863389 en el gen *IKKE*)
 - b) Genes implicados en el metabolismo lipídico (-1131T>C y S19W en el gen *APOA5*, rs5082 en el gen *APOA2*, rs1260326 en el gen *GCKR*, rs1799884 en el gen *GCK*, rs6950982 en el gen *SERPINE1*)
3. Estudiar las principales asociaciones entre las variantes seleccionadas en dichos genes y la obesidad, parámetros antropométricos y metabolismo lipídico en el estudio PREDIMED.
4. Estudiar las interacciones gen*ambiente entre estos polimorfismos y los fenotipos intermedios anteriores en el estudio PREDIMED. Fundamentalmente se estudiará si los parámetros antropométricos y los parámetros lipídicos están modulados por el distinto nivel de adherencia a la dieta mediterránea y por otros alimentos o nutrientes específicos. También se estudiarán otros factores ambientales. Estas interacciones se estudiarán de manera cruda y controlando por las principales variables de confusión.
5. Diseñar y realizar un estudio de intervención dietética (estudio INDIMED) con cuatro grupos de intervención (control, aceite de oliva virgen, frutos secos y dieta mediterránea) para valorar la eficacia de la intervención dietética en los patrones de consumo alimentario y la repercusión de estos cambios sobre los principales parámetros bioquímicos y antropométricos tras la intervención.
6. Conocer las principales variables del estilo de vida (frecuencia de actividad física, tabaco, nivel de estudios, situación laboral, consumo de alimentos y de alcohol) y caracterizar los distintos patrones de la dieta en base a su

mayor o menor adherencia a la dieta mediterránea en el estudio INDIMED. Estudiar la asociación entre los estilos de vida antes mencionados y la obesidad y factores de riesgo cardiovascular.

7. Realizar el genotipado de los polimorfismos que hayan resultado más relevantes en el estudio PREDIMED (polimorfismos en *APOA5*, *APOA2*, *GRCK*, *NEGR1*) así como otros genes implicados en los receptores del sabor (V296I, A262V, P49A en el gen *TAS2R38*) tanto de manera transversal como después de la intervención en el estudio INDIMED. Estudiar la asociación entre dichas variaciones genéticas y los fenotipos más relacionados con las mismas (obesidad, concentraciones plasmáticas de lípidos, otros marcadores bioquímicos, así como la percepción del sabor amargo). Profundizar en la asociación entre la percepción de los distintos sabores y su asociación con las preferencias alimentarias y consumo de alimentos en el estudio INDIMED.
8. Iniciar un estudio nutrigenómico para comprobar la influencia de la intervención dietética (aceite de oliva virgen, frutos secos y dieta mediterránea) en la expresión de genes candidatos seleccionados (*APOA2*, *APOA5*, *GCKR*, *SIRT1*, *POLK*) en los participantes en INDIMED.
9. Realizar estudios similares en otras poblaciones europeas para profundizar en las asociaciones entre variantes genéticas y fenotipos de obesidad y riesgo cardiovascular, teniendo en cuenta sus características particulares y la posible replicación de asociaciones y de modulaciones gen-dieta en genes candidatos seleccionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

*“No llega antes el que va más rápido, sino el que sabe dónde va.”
Seneca (Lucio Anneo)*

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO (ESTUDIO PREDIMED)

En el presente proyecto se han incluido individuos de elevado riesgo cardiovascular participantes del estudio PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea) reclutados en el nodo de Valencia. El estudio PREDIMED es un ensayo prospectivo multicéntrico, aleatorizado, simple ciego, y controlado para evaluar los efectos de dos intervenciones dietéticas personalizadas con Dieta Mediterránea a base de suplementos de aceite de oliva virgen (virgen extra, 1 litro a la semana) o frutos secos (30g al día; de una mezcla 50:50 de nueces y almendras). Con él se pretende proporcionar el máximo nivel de evidencia científica sobre los efectos beneficiosos de una dieta de tipo mediterráneo en la prevención primaria de enfermedad cardiovascular (Estruch et al, 2006). Aunque el estudio PREDIMED es un ensayo prospectivo, en este trabajo de investigación se ha realizado un diseño transversal en los participantes reclutados en el nodo de Valencia. Se han incluido 945 participantes (hombres, mujeres), en el cual se ha estudiado la asociación entre la dieta basal que consumen los participantes a su entrada en el estudio y las variantes polimórficas de los genes de elección, determinando concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados.

3.1.1 SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES EN EL ESTUDIO PREDIMED

3.1.1.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS PARTICIPANTES

En el presente trabajo de investigación, se han incluido todos aquellos hombres entre 55 y 80 años y mujeres entre 60 y 80 años, sin enfermedad cardiovascular documentada (cardiopatía isquémica, angina de pecho o infarto de miocardio reciente o antiguo, accidente vascular cerebral o vasculopatía periférica) y que presenten además:

- **Diabetes Mellitus tipo 2:** Paciente tratado con insulina o hipoglucemiantes orales; glicemia basal ≥ 126 mg/dl, o glicemia casual ≥ 200 mg/dl con síntomas de diabetes o un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa con

glicemias ≥ 200 mg/dl en dos determinaciones.

- **o reúnan tres o más de los siguientes factores:**
 - **Tabaquismo:** Fumadores de más de 1 cigarrillo al día. A efectos de criterio de inclusión en este estudio se consideran como fumadores aquellas personas que hayan dejado de fumar en el último año.
 - **Hipertensión arterial:** sujetos con presiones arteriales superiores o iguales a 140/90 mm Hg sin tratamiento o aquéllos que siguen tratamiento hipotensor independientemente de sus cifras tensionales.
 - **Hipercolesterolemia:** sujetos con cifras de LDL-colesterol superior a 160 mg/dl sin tratamiento o aquellos que siguen un tratamiento hipolipemiante independientemente de sus cifras de LDL-colesterol.
 - **Cifras de HDL-colesterol:** inferiores a 40 mg/dl, con o sin tratamiento hipolipemiante. En caso de HDL-colesterol superior a 60 mg/dl, se resta uno al número total de factores de riesgo vascular.
 - **Sobrepeso u Obesidad:** Índice de Masa Corporal superior a 25 kg/m².
 - **Historia familiar de cardiopatía isquémica precoz:** familiares de primer orden (varones menores de 55 años o mujeres menores de 65 años).

Este estudio ha sido aprobado por los Comités de Ética de los Centros participantes y se ha redactado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Concretamente en el caso de Valencia se ha obtenido la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Asimismo, todos los participantes han firmado voluntariamente el impreso de consentimiento informado después de que se le haya explicado la naturaleza del estudio, antes del inicio de cualquier procedimiento relacionado con el mismo.

3.1.1.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

En el estudio se excluyeron todos aquellos sujetos que no cumplieron con los requisitos del protocolo o que presenten alguno de los siguientes criterios:

- Dificultad para cambiar los hábitos alimentarios.
- Baja probabilidad de realizar cambios dietéticos, según el modelo de estados de cambio de Prochaska y DiClemente (1983).
- Imposibilidad de seguir una dieta mediterránea controlada (incluidos los motivos religiosos) o de poder masticar o tragar los alimentos (por ejemplo, dificultad para consumir frutos secos).
- Pacientes institucionalizados, que no realicen una vida autónoma o no

puedan mantenerse en pie.

- Pacientes sin residencia fija en los últimos años o con imposibilidad de poder atender a los controles semestrales.
- Antecedentes de hipersensibilidad o reacciones alérgicas a algún componente del aceite de oliva o de las nueces.
- Enfermedad médica grave que limite su capacidad de participación en un estudio de intervención dietética (por ejemplo, enfermedades gastrointestinales con intolerancia a las grasas, neurológicas, psiquiátricas, endocrinas descompensadas, tumorales) o que se suponga una esperanza de vida inferior a 1 año. Los pacientes con patología inflamatoria aguda (por ejemplo, neumonía) pueden participar en el estudio transcurrido 3 meses a la curación de su enfermedad.
- Pacientes con un índice de masa corporal superior a 35 kg/m^2 .
- Enfermos inmunodeprimidos o con infección por el VIH.
- Enfermos alcohólicos crónicos o adictos a drogas.
- Pacientes que han recibido fármacos en fase de investigación durante el último año.
- Analfabetismo.

3.1.2 PROTOCOLO DE RECLUTAMIENTO

El reclutamiento de participantes se realiza a través de centros de Atención Primaria, solicitando la participación a los pacientes que cumplan los criterios de inclusión y comprobando, previamente, que dichos participantes no cumplan ningún criterio de exclusión. Asimismo, el participante debe firmar voluntariamente el impreso de consentimiento informado tal y como se ha comentado anteriormente.

A los participantes que aceptan y firman el consentimiento para participar en el estudio se les asigna un código. Este código se compone de 10 dígitos en el que los dos primeros hacen referencia al nodo reclutador, los dos siguientes al centro de salud en el que está adscrito el participante, los dos siguientes al médico de cabecera del participante, los dos siguientes al número de participante y los dos últimos a la visita correspondiente (figura 3.1).

Identificador del participante:	<input type="text"/>				
	Nodo	C.Salud	Médico	Paciente	Visita

Figura 3. 1. Identificador de los participantes incluido en cada cuestionario

En el presente estudio sólo participan pacientes del nodo de Valencia y solo analizaremos muestras de la primera visita.

3.1.3 RECOPIACIÓN DE DATOS

La obtención de variables demográficas socio-económicas, de estilo de vida, antropométricas, clínicas, bioquímicas, así como la obtención de muestras biológicas se realizó en el centro de atención primaria, de manera que el/la enfermera y el/la dietista se desplazaron a dicho centro.

El proceso comienza con la citación del participante en el centro de salud para la primera intervención. Se le cita a primera hora de la mañana para realizar una extracción de saNEGR llevada a cabo por un/una enfermero/a, y a continuación, se procede a la entrevista con el/la dietista, en la cual se realizan los cuestionarios pertinentes y las mediciones antropométricas.

3.1.3.1 RECOPIACIÓN DE DATOS MEDIANTE CUESTIONARIOS

Los cuestionarios utilizados para recoger las variables de interés son: cuestionario de inclusión, cuestionario general, cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA) y cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos.

3.1.3.1.1 CUESTIONARIO DE INCLUSIÓN

Este cuestionario es necesario para comprobar si el participante cumple los criterios de inclusión y además, no presenta ningún motivo de exclusión. Así pues, incluye preguntas a partir de las cuales se puede valorar especialmente la capacidad del participante para poder seguir un determinado tipo de dieta como la mediterránea, interés de participación en el estudio, su grado de compromiso y disponibilidad para acudir a las visitas de seguimiento y sesiones de intervención que se le indiquen, así como, si el participante ha sufrido, en el pasado, algún evento cardiovascular. Por otro lado, incluye preguntas relacionadas con todos los factores de inclusión, edad, sexo, diabetes, niveles de colesterol, presión arterial, historia familiar de cardiopatía isquémica precoz, tabaquismo y sobrepeso u obesidad.

3.1.3.1.2 CUESTIONARIO GENERAL

Este cuestionario recoge datos demográficos y socio-económicos de los participantes, tales como, lugar de nacimiento, estado civil, grado de escolarización y situación laboral. También incluye antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, de hipercolesterolemia, de hipertensión y de cáncer, consumo de alcohol, enfermedades sufridas y medicaciones recibidas, especialmente aspirina, antiinflamatorios, tranquilizantes, vitaminas o minerales, medicamentos para el

corazón, antihipertensión, fármacos hipolipemiantes, insulina, antidiabéticos orales, tratamiento hormonal, etc. Por otro lado, introduce dos ítems relacionados con la última ingesta de aceite de oliva y la última ingesta de bebida alcohólica o vino.

3.1.3.1.3 CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

El objetivo de este cuestionario es estimar la frecuencia de consumo de alimentos en un año. Está compuesto por 139 preguntas. La frecuencia de consumo va de “nunca o casi nunca” hasta “más de 6 veces al día”. Incluye la frecuencia diaria, semanal o mensual durante el último año de consumo de un listado de alimentos comunes, como productos lácteos, cereales o féculas, verduras y hortalizas, legumbres, huevos, carnes, embutidos, pescados y mariscos, aceites y grasas, *fast food*, alimentos enlatados, frutas, frutos secos, dulces, pastelería y bollería industrial y bebidas no alcohólicas y alcohólicas. Además, añade la toma de vitaminas y/o minerales (incluyendo calcio) o productos dietéticos especiales (salvado, aceite de onagra, leche con ácidos omega-3, flavonoides, etc.) en el último año. El cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos utilizado en el estudio PREDIMED es una adaptación a las características de dicho estudio de un cuestionario previo validado en población española (Martin-Moreno et al, 1993) y ha sido validado recientemente (Fernandez-Ballart J et al, 2010). El procesamiento de datos del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos se realizó mediante un lector óptico. Para los análisis estadísticos se excluyeron aquellos individuos cuya ingesta estimada de energía fue demasiado baja o demasiado alta de acuerdo con los rangos especificados en la bibliografía (Hombres: 800-3999 Kcal y mujeres 500-3500 Kcal), de manera que se finalmente excluyeron 5 hombres y 15 mujeres (Willett; 1998).

Para la obtención del consumo de lácteos, aceite de oliva, carnes rojas, pescados, legumbres, verduras, frutas, repostería comercial, frutos secos y vino como variable continua en número de veces por semana se calculó la frecuencia de consumo de cada alimento a la semana a partir de las 9 variables categóricas del rango de “nunca o casi nunca” hasta “mas de 6 veces al día”. Posteriormente, se agrupó la frecuencia de consumo de alimentos que pertenecían al mismo grupo. De esta manera en lácteos se incluyeron la leche entera, semidesnatada y descremada, la nata, crema o batidos de leche, los yogures enteros y descremados, requesón y cuajada y otros tipos de queso. En cuanto a las carnes, se agruparon y consideraron pollo, ternera, cerdo, cordero, conejo, y se diferenció carne blanca (pollo, conejo) de carne roja (cordero y ternera) y embutidos (salchichón, chorizo, morcilla, jamón york, jamón serrano, carnes procesadas). Los pescados incluyen pescado fresco (pescado blanco, azul, calamares, almejas, crustáceos) y pescados en conserva (enlatados y salazones). En el grupo de verdura y hortaliza se incluye: verduras de hoja verde, coles, tomate, zanahoria, judías verdes, berenjenas, pimientos, espárragos, gazpacho andaluz, cebolla. Para la fruta se incluyó fruta fresca

(cítricos, plátano, pera y manzana, fresas, cerezas y ciruelas, melocotón, albaricoque y nectarina, sandía, melón, kiwi, uvas) y frutos secos (almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos, piñones, nueces). Dentro de las legumbres se incluyeron lentejas, alubias, garbanzos. En el grupo de cereales se incluyó pan blanco e integral, cereales de desayuno (normales, integrales), arroz, pasta. Y finalmente el grupo de aceites y grasas (aceite de oliva virgen, aceite de oliva, por un lado y aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soja, margarina, mantequilla, manteca de cerdo por otro lado). Por último para el consumo de bebidas alcohólicas se consideró el vino y los diferentes tipos de vino y cerveza y otras bebidas alcohólicas.

3.1.3.1.4. CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA DE 14 PUNTOS

Mediante este cuestionario se evalúa el grado de cumplimiento de la Dieta Mediterránea. Está formado por 14 ítems de manera que si el participante consigue 14 puntos significa que consume una dieta tipo mediterráneo calificada como óptima (figura 3.2). Los diferentes ítems hacen referencia al consumo de aceite de oliva, verduras, hortalizas, frutas, carnes rojas, blancas y embutidos, grasas, bebidas carbonatadas y/o azucaradas, vino, legumbres, pescados y mariscos, repostería comercial, frutos secos, cereales y de condimentos con tomate, ajo, cebolla y hierbas aromáticas. A partir de dicho cuestionario y en función de la puntuación obtenida se realizaron 4 grupos de adherencia a la dieta mediterránea a los que se les denominó cuartiles (ver sección 4.2.3.4). Así, el Q1 comprendía aquellos individuos que tenían una adherencia a la dieta mediterránea entre 3-6 puntos (adherencia baja). El Q2, 7 y 8 puntos (adherencia media). El Q3, formado con una puntuación entre 9-10 puntos, adherencia media-alta y por último el Q4 con una puntuación 11-14 puntos, de mayor adherencia a la dieta mediterránea adherencia alta. Para posteriores análisis se consideró adherencia alta (Q4) vs adherencia media-baja (Q1-Q2-Q3). Otras combinaciones fueron también estudiadas (terciles, y establecimiento de dos categorías a partir del punto medio de corte, pero finalmente consideramos, por la significación de los resultados utilizar adherencia alta versus adherencia baja-media).

Este cuestionario también ha sido adaptado de una versión previa validada en población española (Martinez-Gonzalez et al, 2004). Recientemente ha sido publicada la versión validada (Schröder H et al, 2011).

ESTUDIO PREDIMED Cumplimiento de la dieta

Identificador del participante: _____

Mujer: seleccione el número de su comunidad autónoma:
 01 Andalucía / 02 Aragón / 03 Asturias / 04 País Vasco / 05 Cantabria / 06 Castilla-La Mancha / 07 Castilla y León / 08 Cataluña / 09 Extremadura / 10 Galicia / 11 Madrid / 12 Murcia / 13 Navarra / 14 País Vasco / 15 Valencia / 16 Canarias
 C. Seleccione el número del centro de salud correspondiente.
 Médico: seleccione el número del centro de salud correspondiente.
 Paciente: seleccione el número del paciente correspondiente.
 Verificar: seleccione el número del centro de salud correspondiente.

Fecha del examen: ____ / ____ / 200__

1. ¿Usa usted el aceite de oliva como principal grasa para cocinar? Si = 1 punto

2. ¿Cuánto aceite de oliva consume en total al día (incluyendo el usado para freír, comidas fuera de casa, ensaladas, etc.)? 4 o más cucharadas = 1 punto

3. ¿Cuántas raciones de verduras u hortalizas consume al día? 2 o más (al menos una de ellas en ensalada o crudas) = 1 punto
Las guarniciones o acompañamientos = 1/2 ración; 1 ración = 200g.

4. ¿Cuántas piezas de fruta (incluyendo zumo natural) consume al día? 3 o más al día = 1 punto

5. ¿Cuántas raciones de carnes rojas, hamburguesas, salchichas o embutidos consume al día? (mínimo: 100-150 g) menos de 1 al día = 1 punto

6. ¿Cuántas raciones de mantequilla, margarina o nata consume al día? (porción individual: 12 g) menos de 1 al día = 1 punto

7. ¿Cuántas bebidas carbonatadas y/o azucaradas (refrescos, colas, licores, bitter) consume al día? menos de 1 al día = 1 punto

8. ¿Bebe usted vino? ¿Cuánto consume a la semana? 7 o más raciones a la semana = 1 punto

9. ¿Cuántas raciones de legumbres consume a la semana? (1 plato o ración de 150 g) 3 o más a la semana = 1 punto

10. ¿Cuántas raciones de pescado consume a la semana? (1 plato pieza o ración: 100-150 de pescado o 4-5 piezas o 200 g de mariscos) 3 o más a la semana = 1 punto

11. ¿Cuántas veces consume repostería comercial (no casera) como galletas, flanes, dulces o pasteles a la semana? menos de 2 a la semana = 1 punto

12. ¿Cuántas veces consume frutos secos a la semana? (mínimo 30 g) 3 o más a la semana = 1 punto

13. ¿Consumo usted preferentemente carne de pollo, pavo o conejo en vez de ternera, cerdo, hamburguesas o salchichas? (carne de pollo: 1 pieza o ración de 100-150 g) Si = 1 punto

14. ¿Cuántas veces a la semana consume los vegetales cocinados, la pasta, arroz u otros platos azucarados con salsa de tomate, ajo, cebolla o puerro elaborada a fuego lento con aceite de oliva (sofrito)? 2 o más a la semana = 1 punto

Figura 3.2. Cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos (validado por Schröder H et al, 2011)

3.1.3.1.5. CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA

El cuestionario utilizado es una adaptación española del Cuestionario de Actividad Física durante el Tiempo Libre de Minnesota (CAFTLM) que ha sido validado en población española (Elosua et al, 2000). Incluye las actividades físicas realizadas en el último mes y en el último año así como el tiempo de práctica de cada una de ellas. Las actividades que se incluyen en este cuestionario se dividen en diferentes grupos: andar, ejercicios de mantenimiento general, actividades acuáticas, actividades de invierno como esquí, deportes, actividades de jardín, reparaciones caseras (bricolaje) y caza y pesca. Cada actividad está perfectamente definida para asegurar una correcta evaluación del ejercicio físico que realiza el paciente. Además, para asegurar la uniformidad de la información recogida se considera que un mes tiene 4 semanas, un año tiene 48 semanas, cada año tiene 240 días laborales, un mes tiene 22 días laborales, un año tiene 100 días de fin de semana. Por otro lado, se ha establecido un tiempo estandarizado para las siguientes actividades: subir escaleras, cada poso=1/2 minuto, una partida de billar=10 minutos, un set de tenis individual = 20 minutos, un set de tenis doble = 15 minutos, golf 9 hoyos = 90 minutos.

Con los datos obtenidos en este cuestionario se pudo clasificar a los participantes en sedentarios y no sedentarios. Para llevar a cabo esta clasificación se utilizaron las recomendaciones realizadas por la *American College of Sport Medicine* y la *American Heart Association* (AHA) para mayores de 65 años o para adultos entre 50 y 64 años con condiciones crónicas clínicamente relevantes (Nelson ME et al, 2007). Estas recomendaciones consideran que se mejora o mantiene la salud cuando se realiza actividad aeróbica de intensidad moderada durante al menos 30 minutos y 5 días a la semana o actividad de intensidad alta durante 20 minutos, 3 días a la semana sin incluir las tareas domésticas cotidianas. Al tratarse de individuos con avanzada edad, en las actividades de moderada intensidad se incluyen actividades como pasear o caminar deprisa, ejercicio en casa y, son consideradas actividades de alta intensidad ejercicios como nadar, trotar, aeróbic, aquagym, andar campo a través, cavar en el huerto, ir en bicicleta (Nelson ME et al, 2007).

Todos estos cuestionarios pueden encontrarse en la página web www.predimed.org.

3.1.3.2 OBTENCIÓN DE DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y TENSIÓN ARTERIAL

La última parte del cuestionario general está dedicada a la exploración física en la que se recogen datos antropométricos tales como, peso, altura y cintura.

Además, se determina al menos en 2 ocasiones la presión arterial sistólica, la diastólica y la frecuencia cardiaca en la extremidad superior derecha e izquierda estando el paciente sentado o en decúbito supino.

3.1.3.2.1 MEDICIÓN DE TALLA

- Medir con un tallímetro estándar, preferiblemente de brazo móvil. Descalzar previamente al participante, y debe quitarse su chaqueta.
- Los participantes deben estar en una superficie firme y lisa.
- Se coloca de espalda al tallímetro, apoyando los talones, nalgas y brazos el mismo. La cabeza debe estar en el plano horizontal y con los pies/tobillos juntos.
- Desplazar el brazo móvil del tallímetro hasta que se apoye sobre la superficie de la cabeza, formando un ángulo recto con el brazo móvil del tallímetro.
- Los valores se expresarán en centímetros, redondeando a 1 cm.

3.1.3.2.2 MEDICIÓN DE PESO

1. Utilizar una báscula calibrada previamente, que debe estar colocada en una superficie firme y lisa. El participante se debe situar en el centro de la misma.
2. Los participantes deben vestir ropa ligera sin peso superfluo, sin zapatos, chaquetas o abrigos.
3. El peso se expresa en Kg con un decimal, redondeando al valor de 100 gramos.

3.1.3.2.3 MEDICIÓN DEL PERÍMETRO DE LA CINTURA.

1. Utilizar una cinta métrica.
2. Pedir al participante que se coloque en bipedestación y mantenga la cabeza recta, con los brazos a ambos lados del cuerpo.
3. Medir el perímetro abdominal en espiración en el punto intermedio de la línea trazada entre la última costilla y la cresta ilíaca.
4. Asegurar que la cinta está al mismo nivel por delante y por detrás.
5. Anotar en escala de 0.1 cm.

3.1.3.2.4 OBTENCIÓN DEL ÍNDICE DE MASA CORPORAL.

El Índice de Masa Corporal (IMC) es calculado utilizando la fórmula:

$$\text{IMC (Kg/m}^2\text{)} = \text{peso (Kg)} / (\text{talla(m)})^2$$

3.1.3.2.5 MEDICIÓN DE LA TENSIÓN ARTERIAL

Para las determinaciones de presión arterial se utilizó un esfigmomanómetro automático y se siguieron las pautas establecidas por la sociedad española de hipertensión arterial (<http://www.seh-lelha.org/>).

Los participantes deben sentarse en una silla con la espalda y brazos apoyados en una situación que permita que el brazal se halle a la altura del corazón. Los participantes deben evitar fumar o tomar cafeína durante los 30 minutos previos a la determinación de la presión arterial. Debe iniciarse como mínimo después de 5 minutos de reposo. Debe utilizarse el manguito de tamaño apropiado para asegurar una lectura exacta. La cámara del manguito debe rodear como mínimo al 80% del brazo. Las determinaciones de la presión arterial se tomarán con un esfigmomanómetro automático (Omron 705 IT Intelli sense, Susaka Co. LTD, Japón). Se promediarán 2 o más lecturas separadas por 2 minutos. Si las dos primeras difieren más de 5 mmHg debe obtenerse y promediar lecturas adicionales (hasta 4).

3.1.3.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Cuando se contacta con el participante se le informa de que debe asistir al centro de salud tras ayuno mínimo de 12 horas, y se procede a la extracción de sangre venosa periférica. A cada paciente se le extraen 43 ml de sangre distribuida en: 4 tubos K3E (con EDTA) de 4,5 ml, 1 tubo 9NC (con citrato) de 4,5ml y 3 tubos SST (con gel separador) de 4 ml. Con uno de los tubos K3E se realiza una extracción de ADN de cada participante para posteriores análisis genéticos y otro para la realización del análisis bioquímico, el resto de muestras son rápidamente procesadas siguiendo un protocolo estándar de fraccionamiento en alícuotas y conservadas a -80°C , constituyendo así un banco de plasma, suero y leucocitos, para efectuar las determinaciones posteriores de interés.

3.1.3.3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Se utilizan 4,5 mL de sangre de un tubo K3E y 4 mL de suero de un tubo de SST para realizar un análisis bioquímico. A partir de estas muestras se obtienen datos de glucemia, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y creatinina para todos los pacientes. Se consideró hipertrigliceridemia cuando los valores eran superiores a 150 mg/dL según la tercera encuesta Nacional del Programa de Educación en Colesterol (ATPIII).

El LDL-colesterol se obtuvo mediante la aplicación de la fórmula de Friedwald (Friedewald WT et al, 1972) ($\text{LDL-C} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5)$). La glucemia se determinó por método enzimático de adaptación de deshidrogenasa de la hexoquinasa-glucosa 6 fosfato. Para la determinación de creatinina se hace reaccionar con el picrato alcalino, según la reacción de Jaffé, mediante el analizador Beckman CX-7. Estos análisis son realizados en el laboratorio de bioquímica de la Clínica Quirón de Valencia.

3.1.3.3.2 PROTOCOLO DE FRACCIONAMIENTO DE ALIOCUOTAS

En primer lugar se elaboran etiquetas con el código asignado al participante y se colocan en los tubos primarios de extracción de sangre, y en los crioviales para la identificación del participante (Figura 3.3)

Posteriormente, los tubos de sangre para la obtención de suero (tapón amarillo, tubos SST), se colocan durante 30 minutos en una gradilla a temperatura ambiente, con el fin de que se forme el coágulo. Posteriormente se centrifugan a 1500 g (si la centrifuga tiene un radio de 10 cm son 3700 rpm) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los tubos de sangre EDTA (tapón violeta, K3E) y sangre citrato (tapón azul, 9NC) se centrifugan a 1500 g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El tubo de EDTA para muestras refrigeradas se tiene que centrifugar inmediatamente, o si no es posible se guarda en nevera hasta centrifugarlo. Las

alícuotas de plasma EDTA refrigerado se congelan lo antes posible o se guardan en nevera si se retrasa el proceso de congelación.

Las alícuotas que se realizan son:

- 5 alícuotas de 200 μ L y 10 de 500 μ L de plasma EDTA, con tapon rojo
- 5 alícuotas de buffy coat de 500 μ L a partir de tubos EDTA y citrato, con tapón blanco.
- 1 alícuota de 200 μ L y otra de 500 μ L de plasma EDTA refrigerado con tapon verde
- 3 alícuotas de 200 μ L y 2 500 μ L de plasma citrato, con tapón azul.
- 4 alícuotas de 200 μ L y 6 de 500 μ L de suero, con tapón amarillo
- 2 alícuotas de 500 μ L de suero protegido de la luz, con tapon amarillo
- 14 alícuotas de 650 μ L de la muestra de orina, con tapon transparente.
- Las muestras de uñas se introducen en criotubos con tapon transparente.

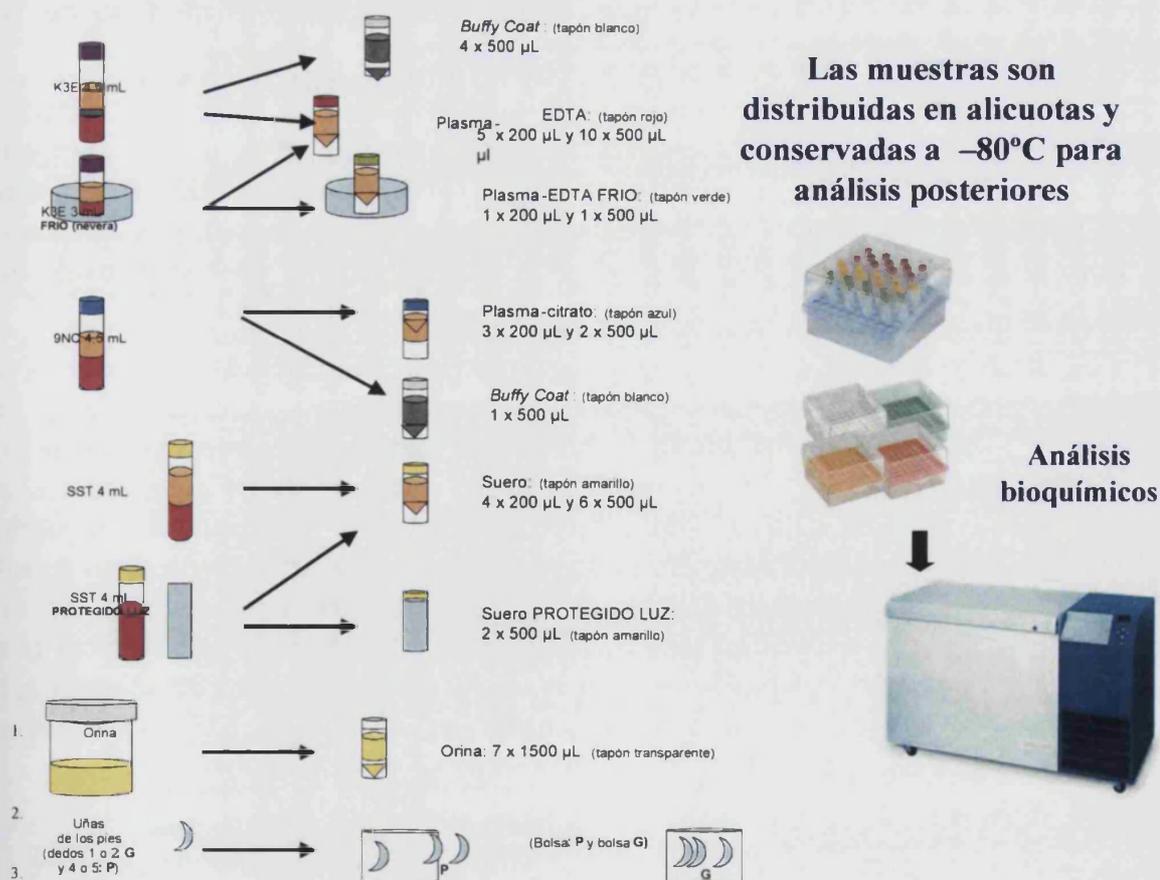


Figura 3.3 Recogida de muestras biológicas y protocolo de fraccionamiento de alícuotas y almacenamiento.

3.1.3.3 PROTOCOLO DE ALMACENAMIENTO Y CONSERVACION DE MUESTRAS

Una vez realizado el fraccionamiento en alícuotas se colocan las muestras en criocajas. Cada criocaja contiene las alícuotas de un solo participante y será identificada con el código correspondiente a éste. Las muestras son almacenadas a -80°C .

3.2 ESTUDIO INDIMED

3.2.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio INDIMED (INtervención con Dieta MEDiterránea), es un estudio de intervención, aleatorizado, simple ciego y controlado donde se pretende evaluar el efecto de tres intervenciones dietéticas personalizadas a base de suplementos de aceite de oliva virgen extra (virgen extra, 1 litro a la semana) y frutos secos (30 g al día; de una mezcla 50:50 de nueces y almendras) dentro de la dieta habitual o ambas intervenciones junto con el seguimiento de una estricta Dieta Mediterránea (basada en un cuestionario validado de 14 puntos que define la Dieta Mediterránea) (Schröder H et al, 2011) en personas adultas sanas durante un periodo de 10 semanas.

Este estudio ha sido planteado como un sub-estudio dentro del estudio PREDIMED, con el que se pretende evaluar el efecto del aceite de oliva virgen, frutos secos, o la combinación de ambos en una dieta mediterránea frente a una dieta habitual en parámetros de riesgo cardiovascular y antropométricos así como la respuesta de éstos sobre la expresión de genes implicados en el desarrollo de enfermedades cardiovascular en población adulta sana.

El diseño del estudio inicial pretendía incluir 120 participantes (hombres y mujeres), 30 individuos en cada uno de los cuatro grupos. El reclutamiento se realizó para aproximadamente un 10 % más de los participantes iniciales con el fin de evitar una disminución del tamaño de muestra por pérdida de participantes al final de la intervención. El diseño del estudio se muestra en la figura 3.3. Un cuarto de los participantes recibió suplemento de aceite de oliva virgen, otro cuarto frutos secos (almendras y nueces), otro aceite de oliva virgen y frutos secos junto con un consejo preciso de dieta mediterránea, y el último se le aconsejó que siguiera con su dieta habitual. La inclusión dentro de uno u otro grupo se realizó de acuerdo con los criterios aleatorios del estudio. Finalmente se incluyeron 133 participantes según el diseño planteado (Figura 3.4 a y b).

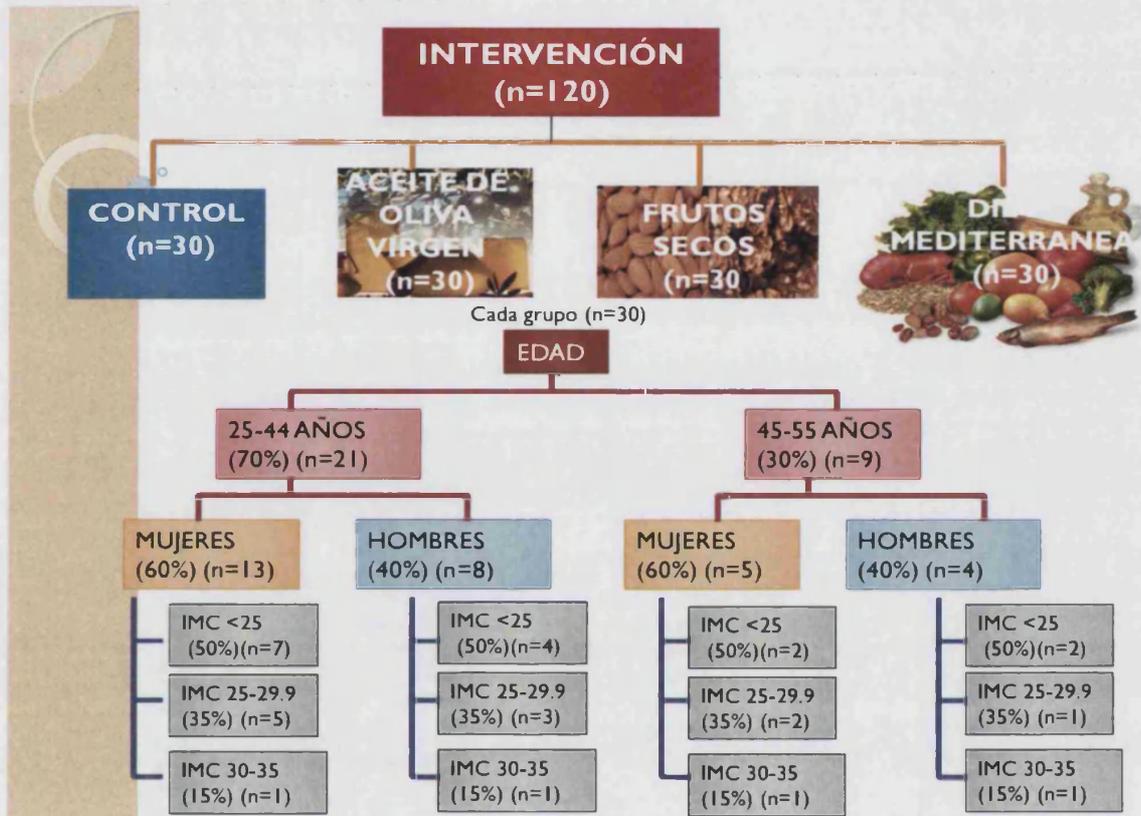


Figura 3.4 a) Diseño del estudio INDIMED.

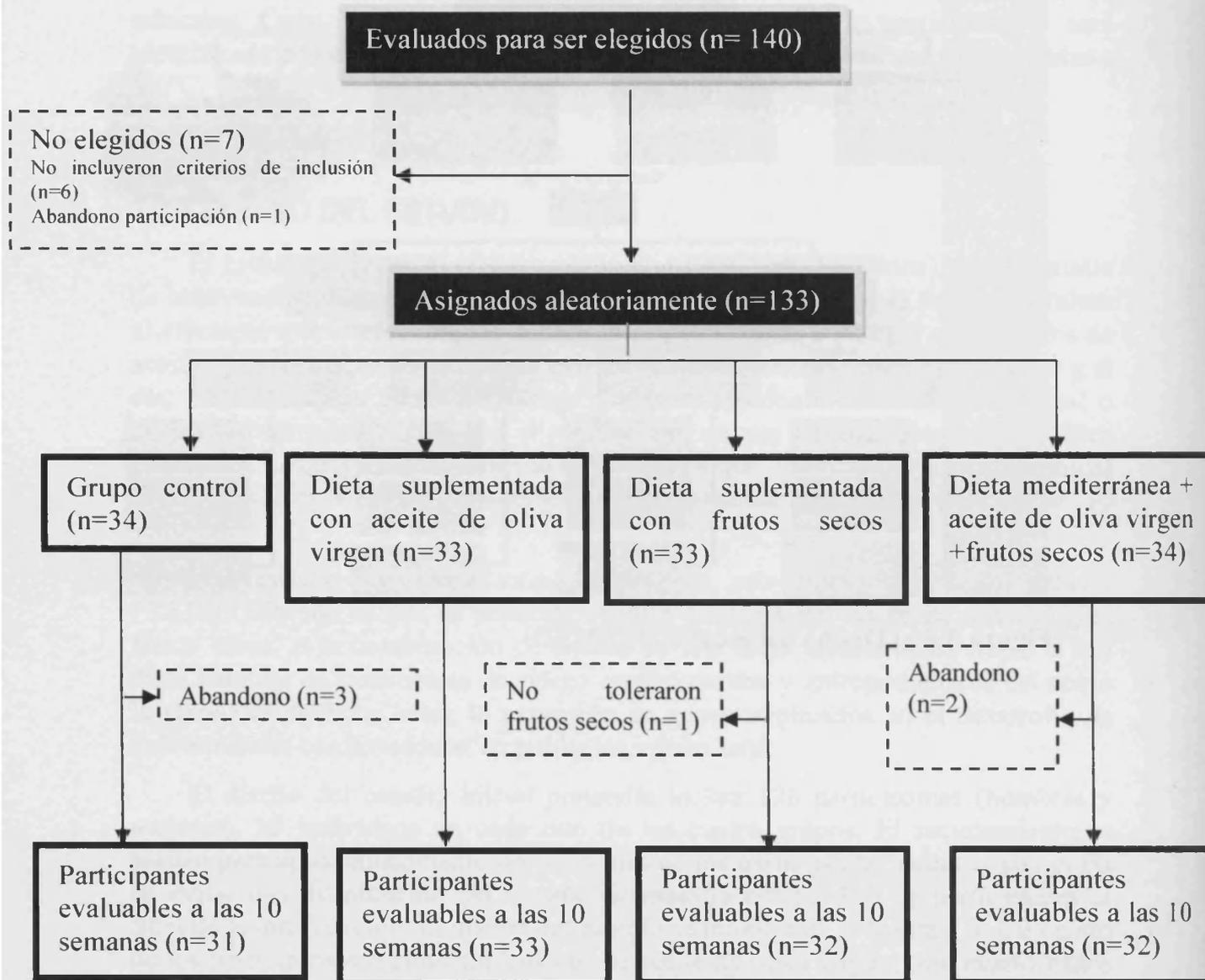


Figura 3.4 b) Diagrama de flujo del estudio

3.2.2 SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO INDIMED

3.2.2.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Varones y mujeres de 25 a 55 años de edad sanos que no cumplan ninguno de los criterios de exclusión.

3.2.2.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Diabetes Mellitus tipo II, diagnosticada en base a al menos uno de los siguientes criterios:
 - a. paciente tratado con insulina y/o hipoglucemiantes orales.
 - b. glicemia basal > 126 mg/dl.
 - c. glicemia casual > 200 mg/dl con síntomas de diabetes.
 - d. test de tolerancia oral a la glucosa con glicemias > 200 mg/dl en dos determinaciones.
2. Enfermedad médica grave que limite su capacidad de participación en un estudio de intervención dietética (p.e. enfermedades gastrointestinales con intolerancia a las grasas, neurológicas, psiquiátricas, endocrinas descompensadas, tumorales) o que se suponga una esperanza de vida inferior a 1 año. Los pacientes con patología inflamatoria aguda (p.e. neumonía) podrán participar en el estudio transcurrido 3 meses a la curación de su enfermedad.
3. Pacientes institucionalizados, que no realicen una vida autónoma, o que no puedan mantenerse en pie.
4. Enfermos inmunodeprimidos o con infección por el VIH.
5. Enfermos alcohólicos crónicos (ingesta diaria de alcohol > 80 g/día) o adictos a drogas.
6. Pacientes con un índice de masa corporal > 40 kg/m².
7. Pacientes que estén siguiendo una dieta.
8. Dificultad para cambiar los hábitos alimentarios:
 - a. Imposibilidad de seguir una dieta mediterránea controlada (incluidos los motivos religiosos) o de poder masticar-tragar los alimentos (i.e. dificultad consumir frutos secos, etc).
 - b. Baja probabilidad de realizar cambio de hábitos dietéticos, según el modelo de estados de cambio de Prochaska y DiClemente.
9. Pacientes sin residencia fija y no puedan atender a los controles dietéticos.
10. Antecedentes de hipersensibilidad o reacciones alérgicas a algún componente del aceite de oliva o de los frutos secos.

11. Pacientes que han recibido fármacos en fase de investigación durante el último año.
12. Analfabetismo.

3.2.3 PROTOCOLO DE RECLUTAMIENTO DE LOS PARTICIPANTES

1. Verificación de criterios de inclusión y exclusión utilizados para la selección.

Evaluación de la disponibilidad al cambio según el modelo de Prochaska y DiClemente.

A los pacientes que cumplen los criterios de inclusión/exclusión y muestren su disponibilidad / posibilidad de seguir los consejos dietéticos, se les explicó el estudio y se les propuso su participación. Todos los participantes firmaron el consentimiento informado.

Todos los participantes recibieron:

- a. Una explicación del estudio, hoja de información y consentimiento informado.
- b. Los cuestionarios que tenían que rellenar: Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos, el Cuestionario de Actividad Física de Minesota, la escala de 14 puntos (o cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea), SF-36 y tres recordatorios de 24 horas. A parte de recibir una explicación verbal sobre cómo rellenar los cuestionarios, también se entrega a cada participante una hoja informativa con detallada información con instrucciones sobre cómo completar los cuestionarios. Además, los cuestionarios son revisados por el participante y la investigadora para asegurar y validar la información.

Los pacientes son seleccionados aleatoriamente cumpliendo el diseño del estudio y son instruidos por la dietista-nutricionista sobre cómo realizar la intervención. La intervención es personal e individualizada.

3.2.3.1 GRUPOS DE INTERVENCIÓN

- A) GRUPO CONTROL: los participantes asignados al grupo control no realizan ningún cambio en su alimentación o estilo de vida. Se les aconseja continuar con sus hábitos.
- B) GRUPO ACEITE DE OLIVA: A estos participantes se les indica que la única fuente de aceite que deben usar tanto para cocinar como para freír sea el aceite de oliva virgen proporcionado por el estudio. Se debe consumir un mínimo de 50 ml por día. Para tal propósito se reparte una cuchara medidora de 20 ml entre los participantes y una planilla donde el participante tiene que apuntar las cucharadas de aceite de oliva virgen que utiliza al día para

consumo propio. Además, la dietista nutricionista le aconseja sobre cómo poder aumentar el consumo de este aceite. Por ejemplo, se sugiere que en el desayuno/almuerzo/merienda se puedan tomar tostadas con aceite en lugar de lo que estaban haciendo hasta ahora. Además, se les proporciona un díptico informativo con las propiedades y conservación del aceite de oliva virgen.

- C) **GRUPO DE FRUTOS SECOS:** Los participantes asignados a este grupo tendrán que incorporar a su alimentación diaria 30 gramos de frutos secos proporcionados por el estudio (15 g almendras + 15 g nueces). La dietista-nutricionista les enseña cuántas unidades corresponden 30 g para conseguir una mayor homogenización de la intervención (12 almendras + 6 medias nueces). Para que la adherencia sea mayor, se les entrega una planilla con todos los días que dura el estudio donde deberán marcar con una cruz cuando se tomen los frutos secos. Se les aconseja que los tomen en el almuerzo o en la merienda en sustitución a lo que estaban tomando. Además se les proporciona un díptico informativo con las propiedades y conservación de los frutos secos.
- D) **GRUPO DE DIETA MEDITERRÁNEA:** A los participantes de este grupo se les dan las mismas instrucciones del grupo de AOV y de FS y además se les aconseja que sigan una dieta mediterránea estricta que cumpla los 14 puntos de escala de adherencia a la dieta mediterránea. Para que el cumplimiento sea bueno, se les entrega a cada participante una planilla que recoja todos los puntos de la dieta mediterránea, junto con las raciones y los días del estudio para que el participante pueda marcar diariamente todo lo que tiene que consumir (ver anexo). Además, se les da un díptico de la DM así como un recetario simple de DM.

3.2.3.2 VISITAS DE LOS PARTICIPANTES

A) VISITA DE CRIBAJE

Se contacta con los candidatos elegibles para determinar si son capaces y quieren participar en el estudio. Durante esta visita se confirma de forma precisa que los participantes cumplen los criterios de inclusión. Se les explica y se les detalla las características del estudio y todas las pruebas e intervenciones que se les va a realizar.

Se les proporciona el consentimiento informado y hoja informativa, el cuestionario general, CFCA, recordatorios de 24 horas, cuestionario de actividad física, cuestionario de 14 puntos, SF36, hoja descriptiva para rellenar los cuestionarios. Se les explica detalladamente cómo rellenar los cuestionarios. Tras esto se aleatoriza al participante a uno de los 4 grupos de intervención de acuerdo con una tabla de aleatorización previamente confeccionada y se les cita para visita basal.

B) VISITA DE EVALUACIÓN INICIAL.

Se trata de una visita personalizada y de una hora de duración que incluye las siguientes tareas:

- Entrevista en la que la dietista-investigadora del estudio explica de nuevo el objetivo y desarrollo del estudio, centrándose en el grupo de intervención en el que el participante ha sido aleatorizado. Se les explica detalladamente cómo deben de hacer la intervención y se les da consejos personalizados para adherirse mejor al grupo de intervención en concreto (ver grupos de intervención).
- Se revisa y se completa si es preciso los cuestionarios de CFCA, actividad física, recordatorios de 24 horas, cuestionario de 14 puntos, SF-36.
- Se realiza el test de sabores.
- Se mide la circunferencia de la cintura, cadera, altura y peso y composición corporal mediante bioimpedancia (tanita).
- Medición de la tensión arterial en ambos brazos y medidas repetidas según las indicaciones de la Sociedad Española de Hipertensión.
- Reparto del aceite de oliva virgen y frutos secos según el grupo de intervención.
- Reparto de bote para la orina.
- Se reparte una hoja donde se le explica al participante la dieta de homogenización para el día siguiente de la visita de evaluación inicial y anterior a la extracción de sangre.
- Se cita al paciente para la visita basal donde se procede a la recogida de muestras biológicas (orina y sangre). Se requiere un ayuno previo de 12 horas.

C) VISITA BASAL

En esta visita se realiza la extracción de sangre y se recoge la orina. Posteriormente, la dietista-investigadora del estudio procede al procesamiento de las muestras. Los participantes son citados dos días después de la visita de evaluación inicial. A partir de este momento comienza la intervención.

D) VISITA DE SEGUIMIENTO

A mitad de la intervención se contacta con los participantes telefónicamente y se les pasa a los participantes el cuestionario de tolerancia. Mediante esta visita la dietista-investigadora del estudio ayuda a los participantes que lo requieran para mejorar la adherencia a la intervención. Además, se realiza otro reparto de aceite de oliva virgen y frutos secos.

E) VISITA DE EVALUACIÓN FINAL

Los participantes son citados para concluir la intervención del estudio. Durante esta visita la misma dietista-investigadora que realizó las medidas e intervención del estudio, realiza las siguientes tareas:

- Se mide la circunferencia de la cintura, cadera, altura y peso y composición corporal mediante bioimpedancia (tanita).
- Medición de la tensión arterial en ambos brazos y medidas repetidas según las indicaciones de la Sociedad Española de Hipertensión.
- Entrega del cuestionario de finalización, cuestionarios de CFCA, cuestionario de 14 puntos (estos dos cuestionarios son rellenados en base a los cambios desde el inicio de la intervención hasta el final), cuestionario SF-36.
- Entrega del bote de orina.
- Cita de los paciente para el día siguiente para la obtención de muestras biológicas.

F) VISITA DE FINALIZACIÓN

Obtención de muestras biológicas y de los cuestionarios de finalización. La dietista investigadora del estudio repasa los cuestionarios junto con el participante.

La dietista-investigadora procede al tratamiento de las muestras biológicas.

3.2.3.3 CRONOGRAMA

A continuación se presenta un cronograma del estudio INDIMED. (Figura 3.5)

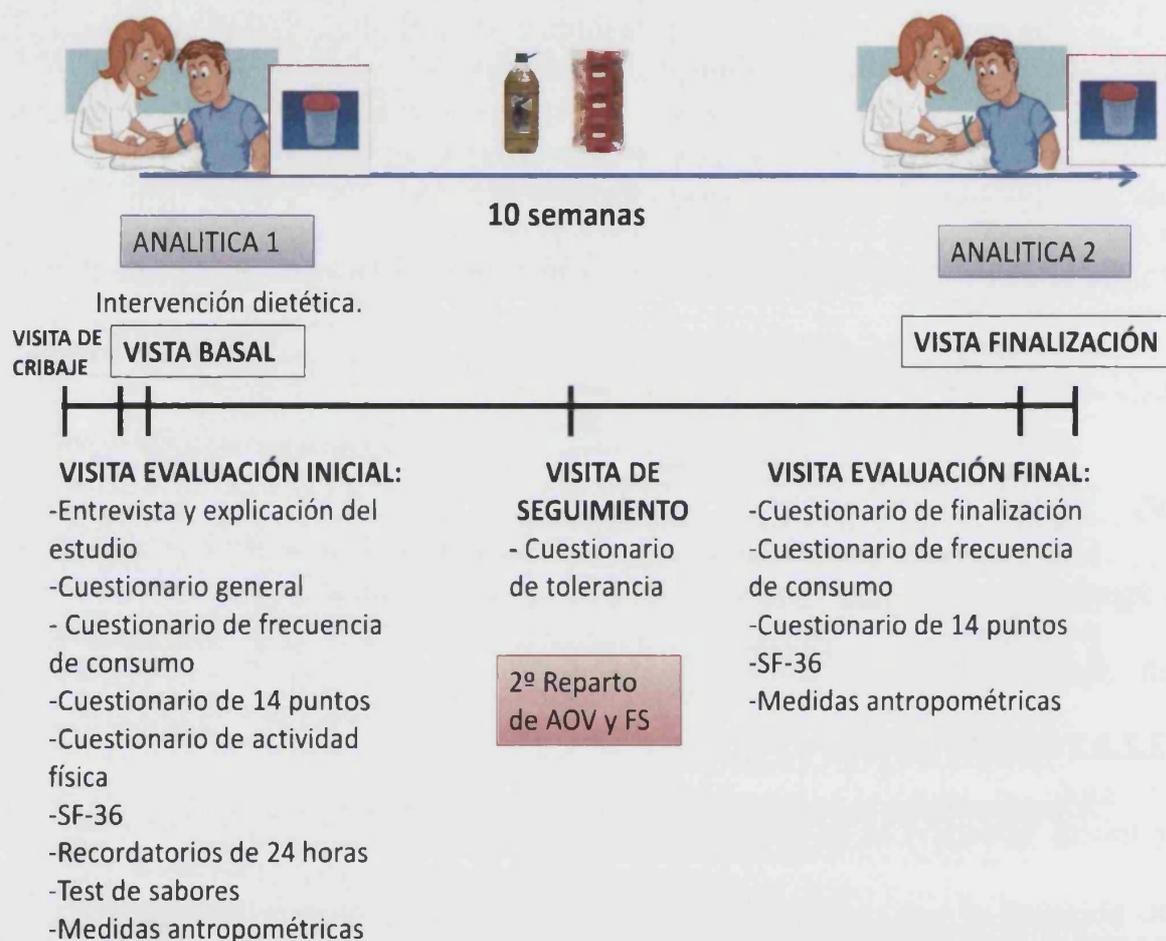


Figura 3.5 Cronograma del estudio INDIMED

3.2.4 RECOPIACIÓN DE DATOS

Los cuestionarios utilizados para recoger las variables de interés son: cuestionario general, cuestionario de frecuencia de consumo alimentario (CFCA), cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos, cuestionario de actividad física de minnesota, SF36, 3 recordatorios de 24 horas, cuestionario de tolerancia al mes, cuestionario de finalización, cuestionario de vulnerabilidad al estrés, test de sabores.

3.2.4.1. CUESTIONARIO GENERAL

Este cuestionario recoge datos demográficos y socio-económicos de los participantes, tales como, lugar de nacimiento, estado civil, grado de escolarización y situación laboral. También incluye antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, de hipercolesterolemia, de hipertensión y de cáncer, consumo de alcohol, enfermedades sufridas y medicaciones recibidas, medicamentos para el

corazón, antihipertensión, fármacos hipolipemiantes, insulina, antidiabéticos orales, tratamiento hormonal, etc. Además incluye preguntas acerca de la preferencia alimentaria y preferencia de sabores así como otras cuestiones relacionadas con los hábitos alimentarios, frecuencia de las comidas, cambios en la alimentación, etc.

3.2.4.2. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO ALIMENTARIO

El objetivo de este cuestionario es estimar la frecuencia de consumo de alimentos en un año. Se ha utilizado un cuestionario basado en el que se usó en el Estudio de Salud de las Enfermeras Norteamericanas (Willett, 1985) el cual fue adaptado y validado, para estimar la ingesta dietética habitual de adultos en el ámbito de la Comunidad Autónoma Valenciana (Vioque, 1991; Vioque, 2000). Este cuestionario consta de un total de 93 ítems (alimentos o grupos de ellos), sobre los que se pregunta por su frecuencia de consumo habitual para una determinada cantidad, a lo largo del año anterior al de la entrevista. La frecuencia de consumo va desde “nunca hasta más de una vez al día”. Incluye la frecuencia diaria, semanal o mensual durante el último año de consumo de un listado de alimentos comunes agrupados en 10 categorías (lácteos; dulces y bollería; pan y cereales; huevos, carnes y pescados; verduras y patatas; legumbres; fruta y frutos secos; aceites y grasas; bebidas y refrescos; otros alimentos).

Se pasaron dos cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos. Uno basal, y otro al finalizar el periodo de intervención. En este caso, se indicó que rellenaran el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos en referencia al periodo de la intervención.

El procesamiento de datos del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos se realizó mediante una sintaxis creada para cada macronutriente, energía total y micronutrientes. Para los análisis estadísticos se excluyeron aquellos individuos cuya ingesta estimada de energía fue demasiado baja o demasiado alta de acuerdo con los rangos especificados en la bibliografía (Hombres: 800-3999 Kcal y mujeres 500-3500 Kcal), (Willett; 1998).

3.2.4.3 CUESTIONARIO DE ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRANEA DE 14 PUNTOS

El cuestionario utilizado fue el mismo que en el estudio PREDIMED (apartado 3.1.3.1.4).

3.2.4.4. CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA

El cuestionario utilizado fue el mismo que en el estudio PREDIMED (apartado 3.1.3.1.5).

3.2.4.5 CUESTIONARIO SF-36

El cuestionario SF-36 es una encuesta de salud diseñada por el Health Institute, New England Medical Center, de Boston Massachusetts, que a partir de 36 preguntas pretende medir ocho conceptos genéricos sobre la salud, esto es, conceptos que no son específicos de una patología, grupo de tratamiento o edad, detectando tanto estados positivos como negativos de la salud física y estado emocional.

Los ocho conceptos de salud (dimensiones) determinados en este cuestionario se resumen en la siguiente tabla:

- 2) **Función física:** Grado en el que la falta de salud limita las actividades físicas de la vida diaria, como el cuidado personal, caminar, subir escaleras, coger o transportar cargas, y realizar esfuerzos moderados e intensos
- 3) **Rol físico:** Grado en el que la falta de salud interfiere en el trabajo y otras actividades diarias, produciendo como consecuencia un rendimiento menor del deseado, o limitando el tipo de actividades que se puede realizar o la dificultad de las mismas
- 4) **Dolor corporal:** Medida de la intensidad del dolor padecido y su efecto en el trabajo habitual y en las actividades del hogar.
- 5) **Salud general:** Valoración personal del estado de salud, que incluye la situación actual y las perspectivas futuras y la resistencia a enfermar.
- 6) **Vitalidad:** Sentimiento de energía y vitalidad, frente al de cansancio y desánimo.
- 7) **Función social:** Grado en el que los problemas físicos o emocionales derivados de la falta de salud interfieren en la vida social habitual.
- 8) **Rol emocional:** Grado en el que los problemas emocionales afectan al trabajo y otras actividades diarias, considerando la reducción del tiempo dedicado, disminución del rendimiento y del esmero en el trabajo.
- 9) **Salud mental:** Valoración de la salud mental general, considerando la depresión, ansiedad, autocontrol, y bienestar general.

3.2.4.6 RECORDATORIO DE 24 HORAS

El recordatorio de 24 horas permite obtener información acerca del consumo de alimentos del día anterior a la encuesta, modo de preparación de platos, consumo de platos compuestos, así como horarios y lugar de las comidas. Para lograr la máxima precisión en la recogida de información sobre las cantidades consumidas, los entrevistadores se ayudaron de modelos físicos (vasos, tazas, cucharas, platos, esferas). La dietista nutricionista ayudó a los participantes a rellenar tal recordatorio para que la información fuera lo más detallada posible mediante la estimación de las raciones y pesos de los alimentos.

Se pasaron tres recordatorios de 24 horas. Uno de los cuales reflejó el consumo de un día del fin de semana y los otros dos de la ingesta habitual.

3.2.4.7 CUESTIONARIO DE TOLERANCIA AL MES

Este cuestionario está destinado a valorar la tolerancia a los suplementos con los que se ha realizado la intervención del estudio. Para ello se obtiene información acerca del ritmo intestinal y digestión de la comida, problemas de la ingesta, etc.

Si se detecta algún problema en la ingesta la dietista nutricionista puede aconsejar individualmente cómo mejorar la adherencia.

3.2.4.8 CUESTIONARIO DE FINALIZACIÓN

Recoge información acerca de cualquier cambio realizado durante el tiempo de intervención (cambios en la alimentación, actividad física, medicación etc.)

Además, a través de este cuestionario se obtuvo información sobre la calidad del sueño y el estrés diario.

3.2.4.9 OBTENCIÓN DE DATOS ANTROPOMÉTRICOS

Los datos antropométricos se obtuvieron siguiendo las indicaciones y protocolos expuestos en el apartado 3.1.3.2.

Además de obtener información acerca de la cintura, cadera, peso, tensión arterial, también se obtuvo información acerca de la composición corporal. Para ello se utilizó la TANITA BC-420-S portable (Figura 3.6) y se obtuvo información acerca del:

- Porcentaje de grasa subcutánea
- Porcentaje de agua
- Grasa visceral
- Peso de los huesos
- Metabolismo basal
- Edad metabólica



Figura 3.6 Tanita BC-420-S portable.

3.2.4.10 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se obtuvieron muestras biológicas de los participantes a nivel basal y tras el periodo de intervención. Al contactar con el participante se le informa de que debe asistir a la visita tras un ayuno mínimo de 12 horas para extracción de sangre venosa periférica.

A) VISITA BASAL

A cada paciente se le extraen 37,5 ml de sangre distribuida en: 4 tubos K3E (con EDTA) de 4,5 ml (1 para la extracción del ADN, 2 para la obtención del plasma, 1 para el hemograma). 2 tubos SST (con gel separador) de 8.5 ml (1 de los cuales se utiliza para la determinación de variables bioquímicas y el otro es para la obtención de suero). 1 tubos SST de 4.5 ml para la bioquímica general. Por último se extrajo sangre en un tubo PAXGENE (2,5 ml) para la posterior extracción de ARN. Este tubo permite la estabilización y purificación del RNA intracelular. Contiene un aditivo que estabiliza el perfil de transcripción génica in vivo reduciendo la degradación del ARN in vitro y eliminando la inducción génica. La extracción de sangre se realizó según las indicaciones para la especial conservación del ARN.

Las muestras son rápidamente procesadas siguiendo un protocolo estándar de fraccionamiento en alícuotas y conservadas a -80°C , constituyendo así un banco de plasma, suero y leucocitos, para efectuar las determinaciones posteriores de interés.

La extracción de ADN se realizó por el método del fenol-cloroformo explicado en esta sección de material y métodos.

B) VISITA FINAL

A cada paciente se le extraen 33 ml de sangre distribuida en: 2 tubos K3E (con EDTA) de 4,5 ml (1 para la obtención del plasma, 1 para el hemograma). 2 tubos SST (con gel separador) de 8.5 ml (1 de los cuales se utiliza para la determinación

de variables bioquímicas y el otro es para la obtención de suero). 1 tubos SST de 4.5 ml para la bioquímica general. Por último se extrajo sangre en un tubo PAXGENE (2,5 ml) para la posterior extracción de ARN. De igual manera que en la visita basal, las muestras son rápidamente procesadas siguiendo un protocolo estándar de fraccionamiento en alícuotas y conservadas a -80°C para efectuar las determinaciones posteriores de interés.

3.2.4.10.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ANÁLISIS BIOQUÍMICO

Se realizaron las siguientes determinaciones para todos los participantes en la visita basal y final de la intervención.

Glucosa	HDL-C	Ast/alt
Urea	Triglicéridos	GGT
Creatinina	Apolipoproteína A	PCRus
Ácido úrico	Apolipoproteína B	Insulina
Colesterol	Lipoproteína (a)	Hemograma
LD-CL		

3.2.4.10.2 PROTOCOLO DE FRACCIONAMIENTO DE ALÍCUOTAS

En primer lugar se elaboran etiquetas con el código asignado al participante y se colocan en los tubos primarios de extracción de sangre, y en los crioviales para la identificación del participante.

El protocolo de fraccionamiento de las alícuotas es similar al realizado en el estudio PREDIMED. Lo único que cambian son el número de alícuotas. En el estudio INDIMED, para la visita basal se realizan 10 alícuotas de plasma y 10 alícuotas de suero (5 de 500 microlitros y 5 de 200 microlitros) y 10 alícuotas de orina. En la visita final, se realizan 5 alícuotas de plasma y 10 alícuotas de suero (5 de 200 microlitros y 5 de 500 microlitros) y 5 de 1000 microlitros de orina.

3.3 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Junto con los datos ambientales y antropométricos, se procede a la obtención de muestras biológicas para la posterior determinación de parámetros bioquímicos generales y para la realización de pruebas específicas relacionadas con el desarrollo de la obesidad y otros factores de riesgo cardiovascular, así como para la extracción de ADN y posterior realización del análisis genético.

Para la obtención de muestras biológicas y posterior determinación de parámetros bioquímicos y estudio genético se precisa de una serie de aparatos y equipos y reactivos proporcionados por las casas comerciales dedicadas al área de la biología molecular. A continuación se indican los utilizados para el desarrollo experimental de este trabajo.

3.3.1 CASAS COMERCIALES

Amersham International, Amersham, Bucks, Reino Unido.

Applied biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos.

Blue Marine, Serva Electrophoresis, Heidelberg, Alemania

Bio-rad Laboratories, Richmond, CA, Estados Unidos.

Bionova Científica, SL, Barcelona, España.

Boehringer, Mannheim, Alemania.

Clinical Chemistry System, de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania

Eppendorf, Hamburgo, Alemania

Gibco BRL-Life Technologies, Paisley, Escocia.

Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania.

Hewlett Packard, Palo Alto, CA, Estados Unidos

IZASA S.A. División Bioquímica, Barcelona, España.

Merck, Darmstadt, Alemania.

Millipore Corporation, Bedford, MA, Estados Unidos.

Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japón.

MoBio Laboratorios, Inc.

National Electronics, Estados Unidos.

New England Biolabs, Beverly, MA, Estados Unidos.

OWL Scientific, Inc., Woburn, MA, Estados Unidos

Panreac, Barcelona, España.

Perkin Elmer, Buckinghamshire, Reino Unido.

Pharmacia Biotech, Sollentuna, Suecia.

Polaroid, St. Albans, Reino Unido.

Promega Corporation, Madison, WI, Estados Unidos.

Pronadisa, Madrid, España.

Riedel.de Haën, Seelze, Alemania.

Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.

Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos.

Thermo Electron Corporation, Milford, USA

Whatman International Ltd., Midstone, Reino Unido.

3.3.2 APARATOS Y EQUIPOS

El análisis de parámetros bioquímicos (colesterol, HDL-C, triglicéridos, glucosa, ácido úrico) se realizaron en un analizador Beckman CX-7, estos análisis se realizaron en el laboratorio de bioquímica de la Clínica Quirón de Valencia para el estudio PREDIMED. Las muestras en el estudio INDIMED fueron procesadas en el mismo aparato pero en el Hospital Clínico de Valencia (colesterol, HDL-C, triglicéridos, glucosa, ácido úrico, urea, enzimas hepáticas). Se han realizado pruebas con muestras duplicadas para testar los resultados obtenidos en el laboratorio.

La lectura de absorbancia del ELISA se realizó con el lector Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Milford, USA).

Para extraer ADN mediante la técnica automatizada se utilizó el robot MagNA Pure Compact Instrument de Roche. Para la cuantificación del ADN y ARN se utilizó el aparato nondrop de la casa comercial Bionova Científica, SL, Barcelona, España.

Para la técnica de PCR-RFLP y para la detección de polimorfismos se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler para la amplificación de los fragmentos de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa y para las electroforesis horizontales en geles de agarosa se realizaron utilizando aparatos de

la casa comercial BlueMarine. Para su visualización se manejó un sistema de transiluminador de National Electronics M900X y para la impresión de las fotografías de dichos geles un sistema fotográfico de Misubishi P91.

Para el análisis mediante fluorescencia con sondas Taqman se utilizó el sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR tanto para genotipado como para expresión génica.

Para la extracción de ARN de manera semiautomática se utilizó el aparato Maxwell (Maxwell® 16 System, Promega).

La pureza del ARN fue evaluada mediante un Bioanalizador Agilent 2100.

Para medir la grasa corporal se utilizó la Tanita BC-420-S portable.

El resto de aparatos (centrífugas de mesas, estufas, baños, agitadores, balanzas, pipetas monocanales y multicanales) fueron los normales en un laboratorio de trabajo en técnicas de biología molecular.

3.3.3 REACTIVOS Y MATERIAL

- Tubos de extracción sangre (BD Vacutainer Systems): a) Tubo cristal 4,5 ml con EDTA como aditivo (tapa violeta) (REF 367654), destinado a conseguir plasma-EDTA e interfase celular (buffy coat); b) Tubo cristal 4,5 ml con citrato como aditivo (tapa azul) (REF 367704), destinado a conseguir plasma-citrato; c) Tubo cristal 4 ml con gel (tapa amarilla) (REF 367783), destinado a conseguir suero; Tubo Paxgene 2,5 ml (Tubos PAXgene™ Blood RNA System REF 762165) d) Equipos y agujas (BD Vacutainer System).

- Contenedor de orina (100 ml) (Soria Genlab SA), para la recolección de orina reciente.

- Viales de 650 µL (NIRCO SA, REF 915530) y viales de 1,7 ml (NIRCO SA, SORENSEN: Skirted vial 1.7 mL TWISTTOP, REF 15570).

- Tapones de colores para los criotubos (NIRCO SA), según los códigos: a) “rojo” para el plasma-EDTA (NIRCO SA, REF 915410); b) “azul” para el plasma-citrato (NIRCO SA, REF 915470); c) “amarillo” para el suero (NIRCO SA, REF 915400); d) “blanco” para buffy coat (NIRCO SA, REF 915480); e) “verde” para plasma-EDTA refrigerado (NIRCO SA, REF 915460); f) “transparente” para orina (NIRCO SA, REF 915490).

- Criocajas contenedores de criotubos GLW 2 ml para 81 tubos, ref B50.
- Pipetas Gilson 1000 μ L, Pasteur, puntas pipetas y demás fungibles.
- Para la determinación en suero de APOA5 mediante el desarrollo experimental del ELISA sandwich: se determinó a través del kit Human Apolipoprotein AV (APO AV) ELISA KIT, 96-Well Plate Millipore (Cat. # EZHAP0AV71K).

3.4 ANÁLISIS GENÉTICO

3.4.1 REACTIVOS PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO

Extracción de ADN: se utilizó genol-cloroformo, acetato amónico 10M y etanol al 70% y MagnaPure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) para la extracción con MagNA Pure Compact de Roche.

Técnica de PCR-RFLP: Para la amplificación de fragmentos de ADN se utilizaron oligonucleótidos sintetizados por Pharmacia Biotech, Taq polimerasa de la casa comercial Promega, dNTP's procedentes de Boehringer Mannheim y $MgCl_2$ 25 mM de Promega. Las distintas enzimas de restricción utilizadas procedían de la casa comercial Promega. El marcador de pares de bases que se utilizó fue el XII de la casa Boehringer Mannheim. La agarosa para la realización de los geles para la electroforesis horizontal fue Pronadisa y el TAE (Triz-acetato-EDTA) de Gibco BRL.

Técnica de fluorescencia sondas simple probe: se realizó fundamentalmente mediante el análisis de curvas de fusión con el sistema LightTyper (Roche) con sondas específicas para cada polimorfismo, simple Probe (TIB MOLBIOL) según el método descrito por nuestro grupo de investigación (Francés et al, 2005),

Técnica de fluorescencia con sondas taqman: se utilizó la plataforma 7900HT Fast Real-Time PCR. Para amplificar el ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa se utilizó una master mix estándar, la Taqman Genotyping Master Mix. Además, junto con esta mix se utiliza la solución TaqMan SNP genotyping Assay, que contiene la pareja de cebadores de la reacción de amplificación y las sondas TaqMan específicas para cada uno de los alelos del polimorfismo a estudiar. Ambos reactivos son diseñados por Applied Biosystem.

3.4.2 METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE POLIMORFISMOS

Para el estudio de los diferentes polimorfismos primero se procedió a la extracción de ADN a partir de las muestras de sangre fresca recogidas a cada uno de los pacientes, o en su defecto, a partir de la muestra de buffy-coat conservada a -80 °C.

Tanto el proceso de extracción del ADN como el análisis de los distintos polimorfismos estudiados se realizaron en el laboratorio del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Facultad de Medicina de Valencia. Ambos procesos se realizaron bajo las condiciones óptimas y en salas distintas para impedir la contaminación de las muestras.

3.4.2.1 AISLAMIENTO DE ADN.

La extracción de ADN necesario para el estudio genético que se presenta, se realizó mediante dos técnicas: mediante purificación con fenol-cloroformo y mediante robot de extracción.

Purificación con fenol-cloroformo: método descrito por Miller et al, (1987). Es un método manual que consiste en la obtención de ADN a partir de leucocitos de sangre periférica. Brevemente, en un primer paso se lisan los hematíes con una solución hipotónica. A continuación se utiliza una solución detergente para romper las membranas de los leucocitos y liberar el ADN. Por último, se purifica el ADN con una mezcla fenol-cloroformo y se precipita con acetato amónico 10M y etanol 70%. El ADN obtenido se resuspende en tampón TE (Tris EDTA) y se guarda a 4°C. Se utiliza con muestras de sangre total fresca aunque también puede obtenerse ADN a partir de muestras de buffy coat.

Método automatizado de extracción de ADN con robot MagNA Pure Compact Instrument de Roche: Este robot integra la tecnología necesaria para la purificación de ácidos nucleicos de manera automatizada. Está preparado para procesar de 1 a 8 muestras en paralelo al mismo tiempo. Las muestras pueden proceder de sangre fresca, congelada o buffy coat. Funciona en combinación con kits que contienen todos los componentes ya optimizados necesarios para llevar a cabo el aislamiento de ADN suministrados también por Roche. Brevemente, la técnica de extracción de MagNA Pure se basa en la utilización de partículas magnéticas de vidrio a las que se adhiere el ADN durante el proceso y que, a su vez, son atraídas por imanes incorporados en el robot. El principio de esta técnica es la afinidad del ADN a la superficie de microcolumnas de sílica o la unión paramagnética del ADN a micropartículas (Hawkins et al, 1994, Doyle et al, 2002).

3.4.2.2. GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DE ESTUDIO.

A partir de las muestras de ADN obtenidas procedimos al genotipado de los polimorfismos de interés. En la tabla 3.1 se recogen los polimorfismos estudiados, así como la posición que ocupan en el gen. El genotipado de los polimorfismos de la *APOA5* (-1131T>C y 56C>G) se realizó fundamentalmente mediante el análisis de curvas de fusión con el sistema LightTyper (Roche) con sondas específicas para cada polimorfismo, simple Probe (TIB MOLBIOL) según el método descrito por nuestro grupo de investigación (Francés et al, 2005), no obstante, en este trabajo se optimizó la técnica. Por otra parte, algunas muestras fueron genotipadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a cuyos productos se le aplicó la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Talmud et al, 2002). Para ello se procedió a su puesta a punto.

El genotipado del resto de los polimorfismos se realizó mediante una reacción de PCR a tiempo real utilizando sondas Taqman fluorescentes específicas para cada alelo del SNP (single nucleotide polymorphism).

Tabla 3.1 Relación de los genes y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) de estudio, localización, posición y cambio de base.

GENE	LOCALIZACIÓN	SNPs	POSICIÓN	CAMBIO DE BASE
<i>SSRT2</i>	17q24	rs1466113	Intrón	C>G
<i>TMEM18</i>	2	rs7561317		A>G
<i>NEGR1</i>	1p31	rs2568958		A>G
<i>FAIM2</i>	12	rs7138803		A>G
<i>SCD1</i>	10	rs508384 rs2167444	3'UTR	C>A T>A
<i>SIRT1</i>	10	rs3818292 rs7069102	Intrón2 Intrón 1	C>G A>G
<i>APOA2</i>	1	rs5082	Promoter	T>C
<i>IKKE</i>	1	rs17020112 rs10863430 rs3748022 rs10863389	5 UTR Intrón 17 Exon 22 Intron 13	A>C G>T C>T C>T
<i>APOA5</i>	11q23	rs662799 rs3135506	Promotor Exón2 (11q23)	-1131 T>C 56C>G (S19W)
<i>GCK</i>	7p15-p13.	rs1799884	Promotor	-30A>G
<i>GCKR</i>	2p23.2-3	rs1260326	Exón14	C>G (P446L)
<i>SERPINE1</i>	7q21.3-q22	rs6950982	Intergénico	A>G

3.4.2.2.1 AMPLIFICACIÓN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) Y GENOTIPADO POR RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP).

El uso de la técnica de la PCR-RFLP para la determinación del genotipo de cada individuo para un polimorfismo concreto es una técnica clásica pero precisa. Consiste en el uso combinado de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a cuyos productos se le aplica la técnica de RFLP (Restriction fragment length polymorphism). Con la PCR se consigue amplificar, de manera exponencial, el fragmento de ADN de la región que nos interesa, mediante un número repetitivo de ciclos, que constan de tres fases (desnaturalización, apareamiento, extensión)

Tras la obtención de los productos de la PCR se realiza con ellos la técnica de RFLP, que consiste en añadir a dichos productos una enzima de restricción. Las enzimas restricción son enzimas que cortan los enlaces fosfodiéster de la molécula de ADN en determinadas secuencias nucleotídicas, específicas para cada enzima, denominadas *dianas de restricción*. Los sitios de reconocimiento de estas enzimas suelen ser secuencias cortas, de unos 4-6 pb. Así, al utilizar una enzima de restricción cuya secuencia diana incluya el SNP de estudio, la enzima cortará la secuencia de ADN amplificado si está presente el nucleótido que forma la secuencia diana para la enzima, pero si el nucleótido presente cambia la secuencia y no es reconocida por la enzima no se cortará el fragmento de ADN. Esto generará un patrón de bandas según este presente un alelo u otro de dicho SNP. Los fragmentos amplificados y posteriormente digeridos se detectan fácilmente mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El bromuro de etidio es una sustancia fluorescente que se intercala entre los pares de bases adyacentes del ADN, posibilitando su visualización cuando se ilumina con luz ultravioleta. Así, en función del patrón de bandas que visualizamos en el gel se puede determinar el genotipo de cada individuo para ese polimorfismo.

Para la amplificación mediante esta técnica de los polimorfismos -1131T>C y S19W del gen de la *APOA5* se preparó una mezcla de reacción con 10 µL de agua, 2 µL de ADN y 13 µL de mezcla de reacción de PCR o «mix» de PCR. El mix estuvo compuesto por primers Forward y Reverse, disolución tampón, Cl₂Mg, dNTP y enzima Taq Polimerasa. Para la puesta a punto de estos polimorfismos las concentraciones de cebadores, dNTPs y polimerasa fueron constantes. La concentración de cloruro magnésico óptima así como la temperatura de anillamiento varió en función del amplicón. En la tabla .3.2 se indica el protocolo de elección.

Los primers necesarios se diseñaron con el programa informático Primer3 (Howard Medical Institute and National Institutes of Public Health, National Human Genome Research Institute (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Posteriormente, los primers seleccionados se

alineaban en la base de datos del NCBI utilizando la herramienta BLAST para verificar que hibridaban en la zona de interés (National Centre for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tabla 3.2 Relación de componentes del mix de reacción de PCR para cada uno de los fragmentos amplificados.

		-1131T>C	S19W	PROGRAMA DEL TERMOCICLADOR	
Concentración		Volumen/ muestra	Volumen/ muestra	-1131T>C	S19W
Tampón	5x	2.5 µL	2.5 µL	94°C----6 min 38 ciclos de:	96°C----5 min 35 ciclos de:
Mg₂Cl	25 mM	1.5 µL	2.5 µL		
Primer Fw	100 µM	0.5 µL	0.5 µL		
Primer Rv	100 µM	0.5 µL	0.5 µL	1) 94°C---45 seg 2) 61.4 °C---45 seg 3) 72°C 45 seg	1) 96°C---30 seg 2) 63 °C---30 seg 3) 72°C 45 seg
dNTPs	10 mM	0.15 µL	0.15 µL		
Go Taq pol	5 u/µL	0.125 µL	0.125 µL		
Agua		7.725 µL	6.725 µL		
Vol. Total		13 µL	13 µL	72 °C----5 min	72 °C----10 min

Tras la PCR se añadió a los productos de PCR una enzima de restricción para llevar a cabo la técnica de RFLP.

Para la digestión de las muestras amplificadas, se añadió 5µL de un «mix» de digestión a cada una de ellas. El mix de digestión para los dos polimorfismos se componía de 0,5 µL del enzima de restricción específico para el polimorfismo de estudio (10u/ µL), 3 µL de un tampón salino adecuado para el enzima (10x), 0,3 µL de BSA (10mg/mL), y 1,2 µL de agua. Una vez añadido el mix de digestión se dejó incubar la muestra según las especificaciones del fabricante de cada enzima de restricción. El tiempo de incubación de las enzimas utilizadas fueron 15-18 h a la temperatura óptima de actividad de la enzima. En la tabla 3.3 se indican los primers y las enzimas utilizadas para cada polimorfismo así como la temperatura de anillamiento, de incubación y el tamaño de los fragmentos.

Tras el periodo de incubación, en el que la enzima realiza los cortes de los fragmentos donde encuentra su secuencia diana, se procedió a la separación y visualización de estos fragmentos. Los fragmentos de restricción fueron separados en función de su peso molecular mediante electroforesis en geles agarosa diluida en tampón TAE (tris-acetato-EDTA). Los geles se prepararon con mayor o menor porosidad dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN que se esperaba separar. A menor tamaño de fragmento o fragmentos de tamaño similar mayor era la compacidad necesaria para discernir con claridad la separación. En el caso de estos polimorfismos como tenían un tamaño similar se utilizó un gel agarosa MS8 al 4% diluida en tampón TAE. A cada muestra digerida, antes de ser cargada en el gel, se le añadieron 2 μ L de una solución colorante que contenía en proporciones iguales, azul de bromofenol, que nos ayuda a ver el avance de las muestras según se deja pasar una corriente eléctrica por el gel, glicerina, la cual ayuda a que las muestras sedimenten en el fondo del pocillo donde se cargan para que la muestra se introduzca en el seno del gel al hacer pasar la corriente eléctrica, y agua. La carga negativa que presenta el ADN permite que las muestras sean arrastradas al aplicar la diferencia de potencial. La separación se produce gracias a la diferente velocidad de difusión de los fragmentos de ADN a través del gel en función de su tamaño. A mayor tamaño de fragmento menor velocidad de difusión

Para el revelado de los fragmentos de restricción, se extrajo el gel de la cama electroforética, se introdujo en un recipiente con una solución de 200 μ L de bromuro de etidio en 1L de TAE 1x y se dejó incubar 20 minutos. El bromuro de etidio se intercala entre las bases de ADN y permite su visualización al iluminar el gel con luz ultravioleta en un transiluminador. En función de los patrones de bandas obtenidos se determinó el genotipo de cada individuo para cada polimorfismo.

Tabla 3.3 Primers y enzimas utilizadas para cada polimorfismo así como la temperatura de anillamiento, de incubación y el tamaño de los fragmentos.

SNPs	Primer	Tamaño amplicón	T ^a anillamiento	Enzima	T ^a incubación	Tamaño
1131T>C	5'-GGAGCTTGTGAA CGTGTGTATGAGT3'	154 pb	61,4°C	MseI	37°C	C:154 pb
	5'-CCCCAGGAACTG GAGCGAAATT-3'					T:133/21pb
S19W	5'-GCCTTCCGTGC CTGGGTGGT-3'	157 pb	63°C	TaqI	65°C	W: 157 pb
	5'- GGCTCTTCTTTCA GGTGGGTCTCCG-3'					S: 123 pb

3.4.2.2.2. GENOTIPADO MEDIANTE SONDAS FLUORESCENTES SIMPLE PROBE. ANÁLISIS DE CURVAS DE FUSIÓN (LIGHTYPER, ROCHE).

Este sistema de análisis genético está basado en el análisis de curvas de fusión para el genotipado de SNPs (single nucleotide polymorphism). Cada DNA de doble cadena tiene su temperatura de melting (T_m) específica, que se define como la temperatura a la cual el 50% del ADN nativo se convierte en ADN de cadena sencilla. Para esta modalidad de análisis genético se requiere, previamente, una PCR para amplificar el fragmento del genoma donde se encuentra la variación genética a analizar. Esta PCR debe realizarse en condiciones de asimetría para aumentar la amplificación de la cadena de ADN complementaria con la sonda fluorescente que se utilizará. Para la realización de la PCR se utilizó el Thermocycler (Mastercycler-ep 380R, Eppendorf) donde se podían utilizar placas de 384 pocillos. Las condiciones de los ciclos de amplificación para cada una de las variantes genéticas fueron las siguientes:

- Para el polimorfismo -1131T>C después de una desnaturalización inicial a 96°C durante 5 minutos, se realizaron los 40 ciclos con el siguiente protocolo: 45 segundos a 96°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 10 minutos.
- Para el polimorfismo S19W después de una desnaturalización inicial a 94°C durante 4 minutos, se realizaron 34 ciclos con el

siguiente protocolo: 30 segundos a 94°C, 45 segundos a la correspondiente temperatura de anillamiento y 45 segundos a 72°C. Para la extensión del amplificado se utilizó una temperatura de 72°C durante 10 minutos.

En la tabla 3.4 se indican los primers utilizados así como la temperatura de anillamiento y el tamaño del amplicón.

Tabla 3.4 Primers utilizados para el genotipado por LightTyper, temperatura de anillamiento y el tamaño del amplicón.

Gen	SNPs	Primers	T ^a anilla miento	Tamañ) miento
<i>APOA</i> 5	-1131T>C	5'-ACATCCCTCTTTATGAAACAAT-3'	55°C	136pb
		5'-GTAGACGGAGTGGGTGTGTCA-3'		
	S19W	5'AGAGCCCAGGCCCTGATTA3'	53,5°C	229pb
		5'-CATCTTCTGCTGATGGATCTGCT3'		

La sonda fluorescente que se utilizó para genotipar estos polimorfismos fue SimpleProbe, aunque existe otra modalidad que es el caso de las sondas FRET (fluorescente resonante energy transfer).

Las sondas SimpleProbe son un tipo especial de sondas que pueden detectar mutaciones y SNPs. Las SimpleProbes sólo requieren una sonda, marcada con un único fluoróforo (fluoresceína), con el fin de conseguir especificidad de secuencia. Esta sonda hibridará con la secuencia que contiene la variación genética. Una vez hibridada, la sonda fluorescente emite más fluorescencia; esto no ocurre cuando la sonda no está hibridada. De esta forma los cambios en la fluorescencia se deberán a cambios en el estado de hibridación de la sonda.

El mecanismo mediante el cual se obtiene el genotipado de una muestra por esta técnica es el siguiente: se añade la sonda fluorescente y posteriormente se aumenta la temperatura hasta 94°C durante 2 minutos. Esto permite la desnaturalización del ADN y la hibridación de la sonda con la secuencia diana. Posteriormente se realiza el análisis de las curvas de fusión mediante el dispositivo LightTyper™, una evolución del inicial LightCycler™ (Wittwer et al, 1997). Este dispositivo realiza una detección en tiempo real de la evolución del nivel de fluorescencia emitida por la muestra mientras la muestra es calentada hasta 85°C. En condiciones de complementariedad completa de la sonda respecto la secuencia diana, la unión tiene más estabilidad y la separación (melting) de la sonda de la secuencia diana se produce a alta temperatura, mientras que cuando existe la forma variante, la presencia de una base no complementaria determina una unión mas débil sonda-ADN/ diana y como consecuencia una separación de la sonda a

temperatura inferior. En la Tabla 3.5 se indica la temperatura de pérdida de fluorescencia. La figura 3.6 muestra las curvas de pérdida de fluorescencia y la derivada negativa de esta.

Los niveles de fluorescencia en función de la temperatura son detectados por el dispositivo y posteriormente tratados mediante la primera derivada negativa de estos valores, generando así un pico a la temperatura de melting de la sonda. En función de la temperatura donde se ha producido la pérdida de fluorescencia se puede concluir la existencia o no de la variante mutada en la secuencia ADN diana.

Tabla 3.5 Temperatura de pérdida de fluorescencia de la sonda.

SNPs	Sondas	Tª pérdida de fluorescencia
-1131T>C	Flq 5'- AGGAAGTGGAGCGAAAGTAAGATTT-p	T:64,5°C
		C: 59,6°C
S19W	Flq-TCTCCACAGCGTTTTTCGGCG-p	S: 68,1°C
		W:57,5°C

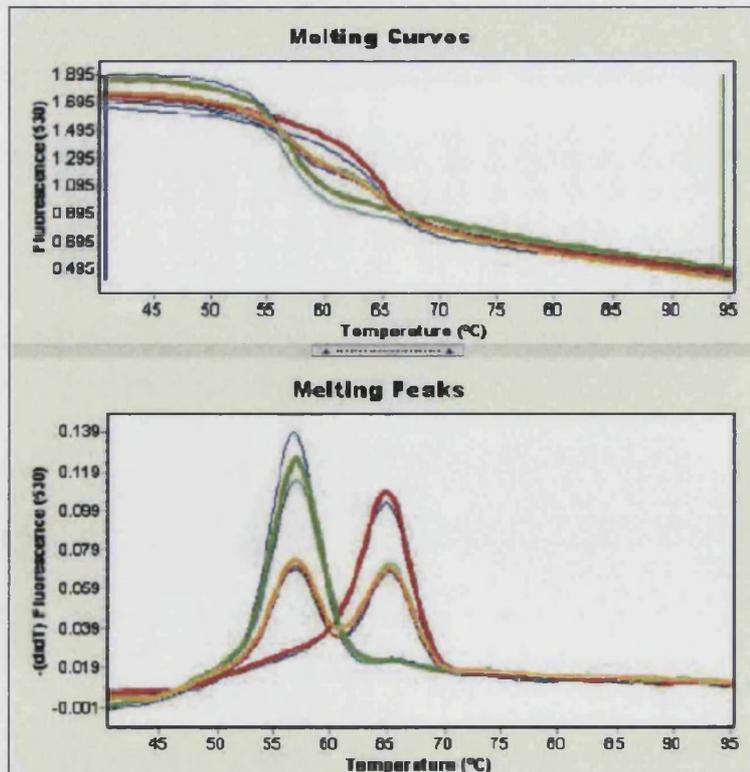


Figura 3.7 Imagen ilustrativa de los tres posibles genotipos obtenidos en un ensayo típico con sondas SimpleProbe tomadas del software Lightyper (Roche inc.)

3.4.1.2.3. GENOTIPADO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL, SONDAS TAQMAN.

El genotipado de polimorfismos mediante una reacción de PCR a tiempo real se realizó utilizando sondas Taqman fluorescentes específicas para cada alelo del SNP discriminando genotipos gracias a la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa por señales fluorescentes generadas durante o después de una reacción de PCR (Livak et al, 1995, Livak, 2003).

La sonda Taqman es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó *reporter* (FAM_{TM}, o VIC_{TM}) y otro unido en el extremo 3' ó *quencher* (NFQ). Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el *reporter* es absorbida por el *quencher* mediante un proceso conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Didenko et al, 2001). Si la secuencia de DNA complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada la sonda gracias a su actividad 5' exonucleasa. Esta degradación hace que el *reporter* y el *quencher* se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador. La separación de la sonda del DNA posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo de la PCR, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado.

Así, se diseña una sonda Taqman con la secuencia que correspondería al alelo salvaje unido a un fluorocromo (normalmente VIC en nuestros ensayos), y otra sonda con la secuencia que correspondería al alelo que tiene el cambio de nucleótido con un fluorocromo diferente al anterior (normalmente FAM en nuestros ensayos). Cada sonda se unirá de manera específica a su secuencia complementaria, y al unirse será cuando la polimerasa separe el *reporter* del *quencher* y la fluorescencia que se emite será específica de la secuencia a la que era complementaria. La figura 3.8 ilustra el mecanismo de funcionamiento de este sistema.

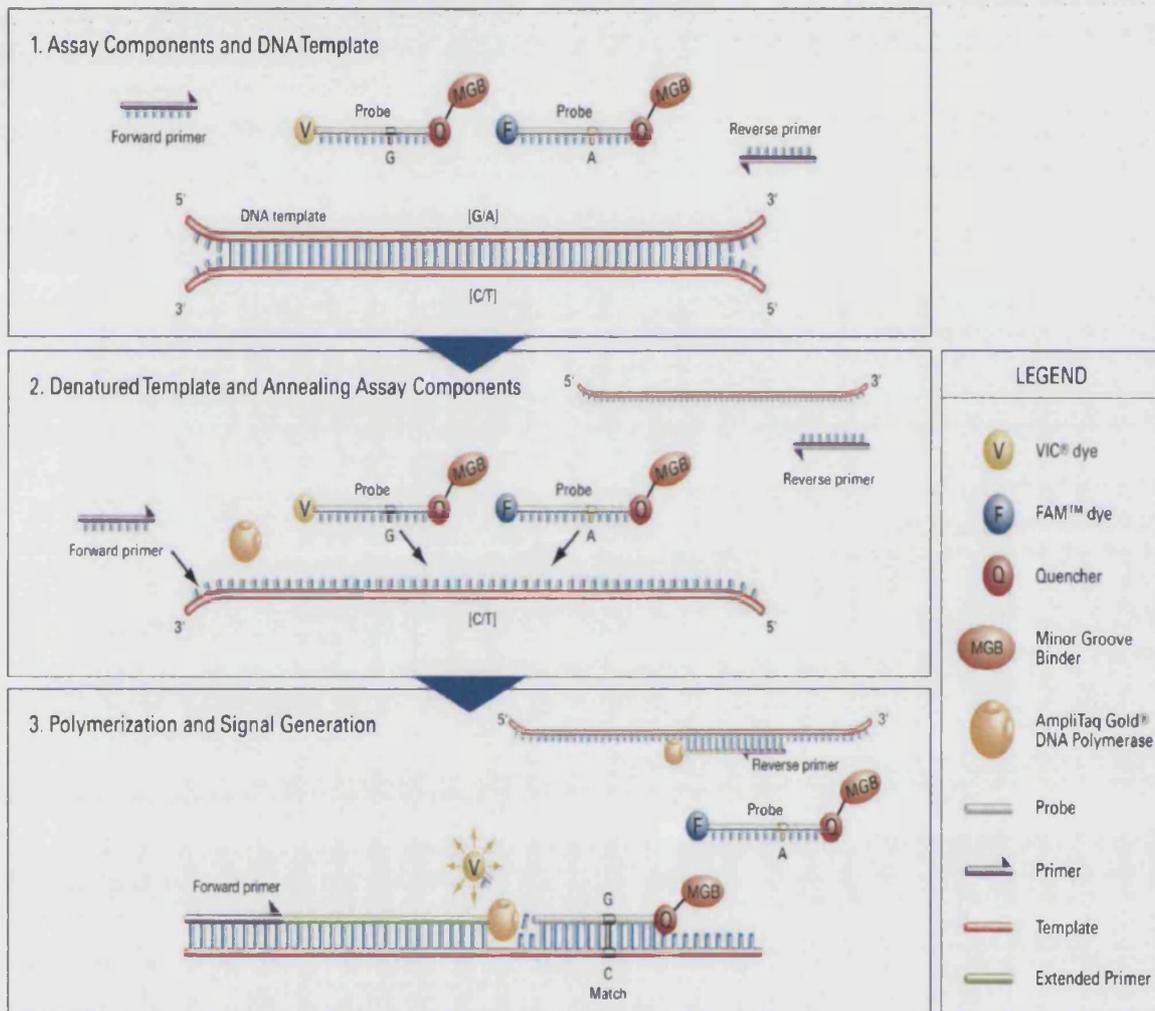


Figura 3.8 Imagen del mecanismo de funcionamiento del sistema Taqman. Tomado de Taqman Genotyping Systems product bulletin. Applied Biosystems Inc.

Para hacer la determinación del genotipo el analizador clasifica las muestras de la siguiente manera:

- Homocigoto salvaje: si sólo presenta la fluorescencia VIC
- Homocigoto mutado: si sólo presenta la fluorescencia FAM.
- Heterocigoto: si muestra ambas fluorescencias VIC y FAM.

La determinación del genotipo mediante PCR a tiempo real se utilizó para el estudio del resto de polimorfismos estudiados.

Desarrollo experimental para la determinación del genotipo.

La mezcla de PCR a tiempo real se prepara para el desarrollo de un protocolo estándar propuesto por Applied Biosystems, para un volumen final de reacción de 5 μ l. Las reacciones se llevan a cabo en una placa de 384 pocillos (Microamp® Optical 384-well Reaction Plate, Applied Biosystems).

La composición de la mezcla de reacción y las condiciones de PCR se muestra en la Tabla 3.6

Tabla 3.6 Composición de la mezcla de reacción para la PCR a tiempo real.

	Concentración stock	Volumen/ Muestra	Condiciones PCR
TaqMan PCR Master Mix	2x	2,5 μ L	1 ciclo
SNP Genotyping Assay Mix	40x	0,125 μ L	95°C----10 min
ADN	25 ng/ μ L	0,5 μ L	
Agua		1,875 μ L	40 ciclos de:
			1) 92°C---15 seg
Volumen Total		5 μ L	2) 60 °C---1 min

La mezcla de reacción para la PCR a tiempo real se realiza en un tubo Eppendorf de 1,5 mL autoclavados. Esta mezcla se prepara para el número de muestras que queramos realizar, para 4 NTCs (controles sin ADN), y para un 10% más del total de muestras que queramos medir, ya que debido al arrastre que se produce al pipetear, es recomendable preparar mayor volumen de mix del necesario. Una vez preparada la mezcla para la amplificación sin el ADN, se reparte a razón de 4,5 μ L en los diferentes pocillos de la placa. Posteriormente, se añade a cada pocillo 0,5 μ L de ADN de los que queremos genotipar.

Tras el proceso de amplificación se procedió a la determinación alélica de cada una de las muestras, ya que en función del tipo de fluorescencia emitida en cada pocillo se puede determinar el genotipo de cada una de las muestras analizadas (figura 3.9).

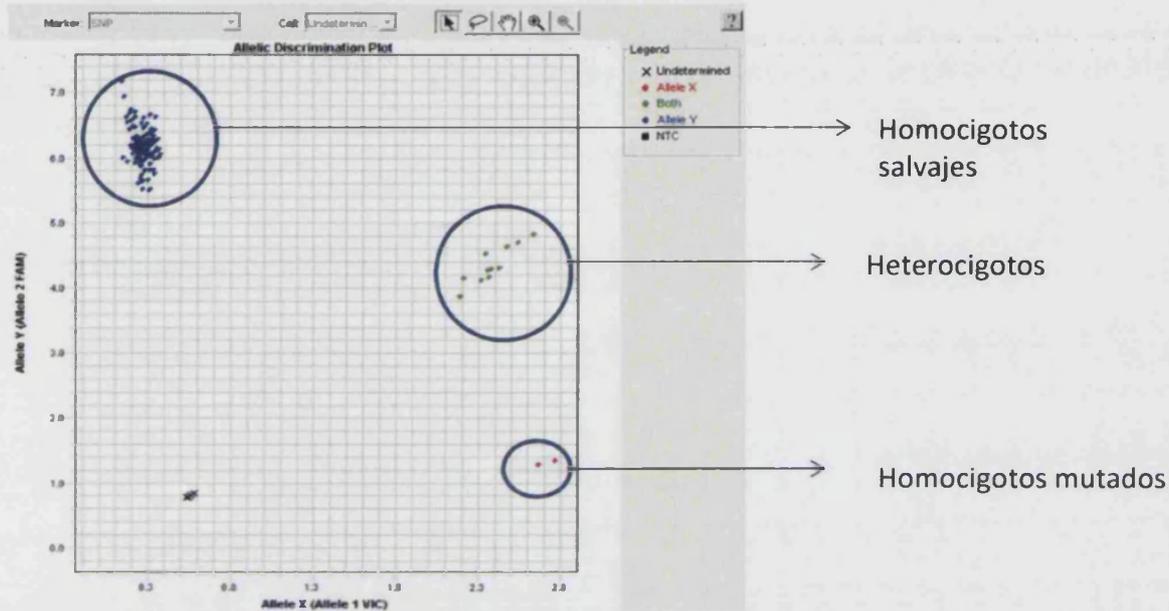


Figura 3.9. Determinación de los genotipos a punto final, discriminación alélica de fluorescencia (software SDS 2.3, Applied Biosystems).

3.5. AISLAMIENTO DE ARN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

El aislamiento de ARN para el estudio de expresión génica se llevó a cabo mediante el método de extracción semiautomático (Maxwell 16 tissue LEV total RNA purification Kit) a partir de sangre recogida en tubos PAXgene.

Para el análisis de expresión génica se requieren los siguientes pasos:

- Recogida de la muestra
- Extracción/Purificación del ARN
- Reacción de transcripción inversa
- Análisis de expresión génica

3.5.1 RECOGIDA DE LA SANGRE EN TUBOS DE ARN SANGUÍNEO O PAXGENE™ (PAXGENE™ BLOOD RNA TUBE)

La recogida de sangre total es el primer paso para la extracción del ARN intracelular. Uno de los principales inconvenientes de la extracción del ARN es la inestabilidad del mismo ya que se degrada fácilmente tras la extracción de sangre. Los tubos PAXgene contienen un aditivo que estabiliza la transcripción *in vivo* del gen y reduce la degradación *in vitro* del ARN minimizando la inducción génica. La recolección de la sangre en estos tubos requiere algunas especificaciones. El tubo debe estar a una temperatura comprendida entre 18-25 °C antes de su uso. En caso de que haya más tubos de sangre para extraer el de PAXgene será el último. El

tubo se pinchará en una posición vertical para evitar el contacto con los aditivos del mismo y con una palometa (vacutainer) (Figura 3.10)

Una vez extraída la sangre (2,5 ml) se mezclará el contenido moviendo el tubo alrededor de 10 veces. (Figura 3.10)

El tubo PAXgene se guardará a una temperatura (18-25°C) por un mínimo de 2 horas hasta un máximo de 72 horas antes de ser procesado o se transfiere a -20°C durante 24 horas y después se guarda a -80°C hasta su posterior extracción. Esto incrementa la concentración de ARN.

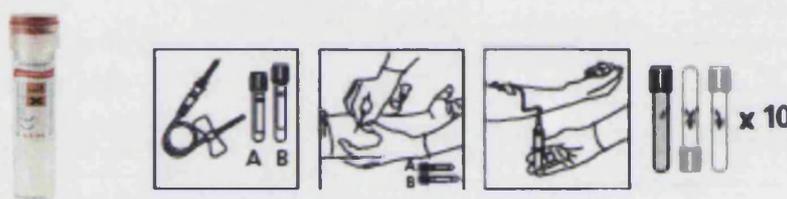


Figura 3.10 Tubo de extracción de ARN sanguíneo (PAXgene™ Preanalytix) y procedimiento de extracción de la sangre.

3.5.2 EXTRACCIÓN SEMIAUTOMÁTICA DEL ARN. MAXWELL 16 TISSUE LEV TOTAL RNA PURIFICATION KIT (PROMEGA)

La extracción de ARN es una técnica delicada por la rápida degradación del ARN debido a la acción de las ARNasas. Por ello durante su manipulación se deben de tomar todas las precauciones posibles para evitar contaminaciones (uso de guantes, utilización de material libre de ARNasas etc).

Existen diferentes métodos para extraer el ARN de los diferentes tejidos. En este caso, la muestra de partida es sangre total que se recogió en tubos PAXgene diseñados para la conservación y almacenaje del ARN. La purificación del ARN mediante el sistema semiautomático consta de dos partes, una manual y otra que se realiza a través del un aparato para tal efecto (Maxwell® 16 Instrument (AS2000)) (Figura 3.11) que se basa en la utilización de una bolas paramagnéticas para la extracción de los ácidos nucleicos. El éxito en el aislamiento de ARN intacto requiere cuatro pasos:

- La interrupción eficaz de células o tejidos.
- La desnaturalización de los complejos nucleoproteicos.
- La inactivación de ribonucleasas endógenas (ARNasas).
- La eliminación de contaminación de ADN y proteínas.

El paso más importante es la inactivación inmediata de ARNasas endógenas, que son liberadas en la ruptura celular. El Maxwell® 16 ARN

Purificación Kit combina las propiedades protectoras y disruptoras del tiocianato de guanidina (GTC) para la lisis de las muestras, desnaturalizar los complejos nucleoproteicos e inactivar ribonucleasas (Chirgwin, J.M. et al. 1979). Agregar β -mercaptoetanol (BME) se recomienda para muestras que contienen altos niveles de nucleasas (por ejemplo, el bazo o el tejido del páncreas). El ADN genómico es selectivamente retirado del lisado de la muestra mediante el Agente de Compensación. El ARN total es capturado desde el lisado de la muestra usando MagneSil PMP® y es purificado de la contaminación de las sales, las proteínas y las impurezas por lavados de etanol. Por último, el ARN total se eluye en 30 μ l agua libre de nucleasas.

Cada kit está preparado para la extracción de 16 muestras.

A) Purificación del RNA manual

- Se sacan los tubos PAXgene de -80 °C y se dejan a temperatura ambiente durante dos horas.
- Centrifugar 10 minutos a 3000 g para recoger las células blancas
- Decantar el sobrenadante. Añadir 5 ml de agua libre de RNAsas, mezclar bien y centrifugar de nuevo durante 10 minutos a 3000 g.
- Se recoge el pellet marrón. Se vortea vigorosamente en el líquido remanente hasta que no se distinga el pellet
- Se añaden 400 μ l del tampón de lisis / β -mercaptoetanol pipeteando varias veces hasta homogenizar perfectamente. Utilizar el vortex durante 30 segundos.
- Incubar en hielo durante 2 minutos y utilizar el vortex de nuevo durante 30 segundos. Transferir el lisado a un tubo de 1,5 ml esteril.
- Homogeneizar con una aguja de calibre 20g varias veces.
- Añadir 700 μ l del tampón azul de dilución de RNA y agitar durante 10 segundos
- Añadir 80 μ l del agente de compensación previamente mezclado y agitar durante 10 segundos.
- Incubar 3 minutos a 70 °C y enfriar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Transferir toda la muestra enfriada a través de una columna de limpieza y centrifugar durante 2 minutos a 12000 g.

B) Purificación del ARN de manera automática.

- Transferir la muestra a los cartuchos del maxwell y proceder tal y como se indica en el protocolo (<http://www.promega.com/maxwell16>).



Figura 3.11 Maxwell[®] 16 Instrument (AS2000).

Una vez finalizada la extracción del ARN se procede a su cuantificación del RNA para evaluar tanto su concentración como su pureza mediante un nanofotómetro (NanoPhotometer[™]) (Figura 3.12) y se almacena a -80°C hasta su posterior utilización para hacer la transcripción inversa.

El NanoPhotometer[™] nos proporciona una información de la concentración de ARN así como de la absorbancia a 260 nm (ácidos nucleicos) como a 280 nm (proteínas) y a 230 (otro contaminantes orgánicos).

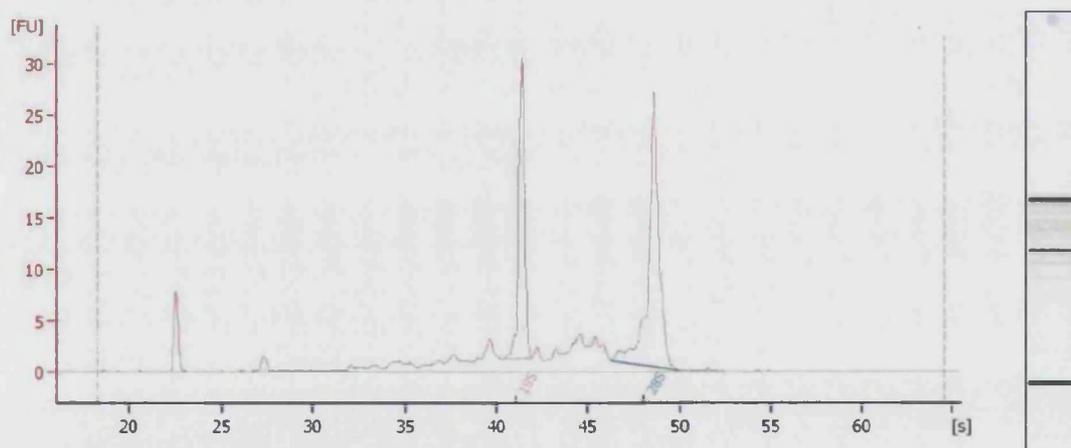
Dado que la integridad de las muestras de ARN es fundamental en el contexto de los análisis de expresión génica mediante la tecnología de microarrays o de PCR en tiempo real mediante un bioanalizador (Bioanalizador Agilent 2100) (Figura 3.12) se realizó la caracterización cualitativa y cuantitativa de unas muestras seleccionadas de ARN. Esta técnica se basa en los patrones de movilidad electroforética de las muestras en una matriz de gel que se introduce en unos chips formados por una serie de microcanales y depósitos en miniatura interconectados a través de los cuales migran electroforéticamente los ácidos nucleicos. La introducción del número de integridad del ARN (RIN) facilita la determinación objetiva de la calidad del ARN que se utilizará en experimentos posteriores. Este valor que va desde el 1 al 10, se basa en la cuantificación de productos de degradación del ARN a lo largo de toda su migración electroforética.

En este estudio se realizó la integridad del ARN en un número significativo de muestras. La calidad analizada de las muestras fue buena y cumplió con éxito todos los criterios de calidad (Figura 3.13).



Figura 3.12 Nanofotómetro (NanoPhotometer™, a la izquierda) y Bioanalizador Agilent 2100 junto con los chips.

Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 5 : i8

RNA Area:	118.2	RNA Integrity Number (RIN):	8.7 (B.02.05)
RNA Concentration:	112 ng/μl	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.5	Result Flagging Label:	RIN 8.70

Fragment table for sample 5 : i8

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.28	41.96	24.4	20.7
28S	46.22	49.91	37.4	31.6

Figura 3.13. Resultados obtenidos del electroferograma con el Bioanalizador Agilent 2100 para medir la calidad del ARN en una muestra del estudio INDIMED.

Los criterios de calidad para un posterior adecuado análisis de expresión génica son los siguientes (Tabla 3.7).

Tabla 3.7 Criterios de calidad en el análisis de expresión génica

$A_{260}/A_{280} = 1.6-2.2$	Valores por debajo indican una contaminación por proteínas, fenol u otros contaminantes
$A_{260}/A_{250} = 2-2.2$	Valores inferiores indican contaminación por EDTA, fenol, trizol etc.)
$RIN \geq 7$	Valores inferiores indican degradación
$rARN\ 28S/18S \geq 1,2$	

3.5.3 REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA. OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO O C-DNA (RT)

La transcripción inversa se lleva a cabo a partir del ARN mediante una enzima, transcriptasa inversa, transcriptasa reversa o retrotranscriptasa que es una enzima de tipo ADN-polimerasa, que tiene como función sintetizar ADN de doble cadena utilizando como molde ARN monocatenario, es decir, catalizar la retrotranscripción o transcripción inversa. Esta enzima se encuentra presente en los retrovirus. Su nombre obedece a que el proceso normal de la transcripción, la que se puede llamar "directa", codifica el ARN a partir de la secuencia inicial de ADN, y no al revés. Una forma sencilla de síntesis de ADN de doble cadena a partir de transcriptasa inversa, también llamada ADN/ARN-polimerasa dirigida, sería partir de un cebador cola de poli-T que establecería bases complementarias con la cola de poli-A del ARN transcrito de la hebra que se va a sintetizar, lo que forma un híbrido ARN/ADN. Dicho híbrido podría separarse mediante ribonucleasas, y después, con la acción de una ADN-polimerasa y un nuevo cebador, ser completada la hebra de ADN de doble cadena. En la biología molecular y la bioquímica, la transcriptasa inversa, también conocida como ADN polimerasa dependiente de ARN, es una enzima ADN polimerasa que transcribe una sola cadena de ARN en una sola cadena de ADN. También ayuda en la formación de una doble hélice de ADN una vez que el ARN ha experimentado una transcripción inversa en una sola cadena de cDNA. La transcripción inversa implica la síntesis de ADN a partir del ARN.

Para llevar a cabo la obtención del cDNA se utilizó un kit (High Capacity RNA-to-cDNA master mix, Applied Biosystems). El protocolo de obtención de cDNA se detalla en la figura 3.14 (Mullis, K.B. et al, 1987)

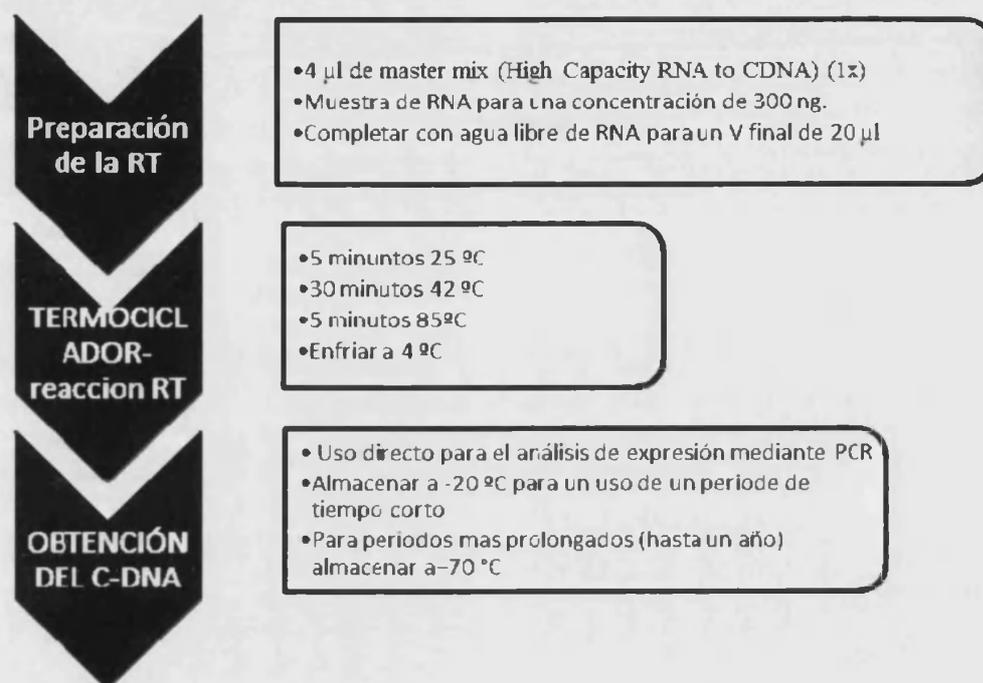


Figura 3.14 Diagrama de flujo para la obtención del c-DNA

3.4.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para la cuantificación de ADN o de ARN mensajero (ARNm) de una muestra. Utilizando primers específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de DNA o RNA.

Cuando la PCR a tiempo real se combina con una reacción de retro-transcripción o de transcripción inversa o RT (RT-PCR), puede determinarse la cantidad de mRNA de una muestra mediante una cuantificación relativa. Dicha cuantificación se denomina relativa ya que se compara entre diferentes muestras (tejidos, tratamientos, time-points, etc) la cantidad relativa o relación del ARNm de un gen específico respecto a la cantidad de ARNm de un gen constitutivo (CE). Para la cuantificación, se mide en cada ciclo de PCR la cantidad de amplicón producido. La cuantificación del producto se produce mediante la adición de fluoroforos que se unen al amplicón de forma cuantitativa, de forma que a mayor producto mayor fluorescencia se emitirá.

Los sistemas de PCR a tiempo real detectan la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR y los softwares de análisis representan dicha fluorescencia gráficamente respecto al número de ciclos. La cantidad de amplicón producido es proporcional al número de moléculas de ARN/ADN iniciales, de

forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el amplicón fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

Uno de los fluoróforos que se utilizan para la cuantificación relativa del ARN son las sondas taqman cuyo mecanismo se explicó previamente. Esta técnica permite la cuantificación específica del cDNA de interés incluso en la presencia de amplificación inespecífica (dímeros de primer, DNAg).

La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento: el control endógeno (CE). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen específico, o normalizar respecto a la diferente concentración de RNA total de las muestras, ya que si la cantidad de CE varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de cDNA, no a cambios en su expresión. Los genes más utilizados como controles endógenos son: rRNA 18S, *GAPDH*, *beta-actina*, *TBP*, *HPRT*, *beta-2-microglobulina*, entre otros. No existe ningún gen cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones, por lo que se debe valorar cual sería el mejor CE para nuestro experimento en cuestión. En nuestro experimento se probaron varios genes y se seleccionó el *GAPDH* por ser el que mejor se adaptaba a las condiciones del estudio.

En cuanto al método de cuantificación se comparan directamente los Cts del gen testado y gen de referencia (DCt) en cada muestra, y posteriormente se comparan los DCt de la muestra experimental con respecto a la muestra control, para aplicar dicho método es necesario que las eficiencias de ambos genes sean similares (figura 3.15).

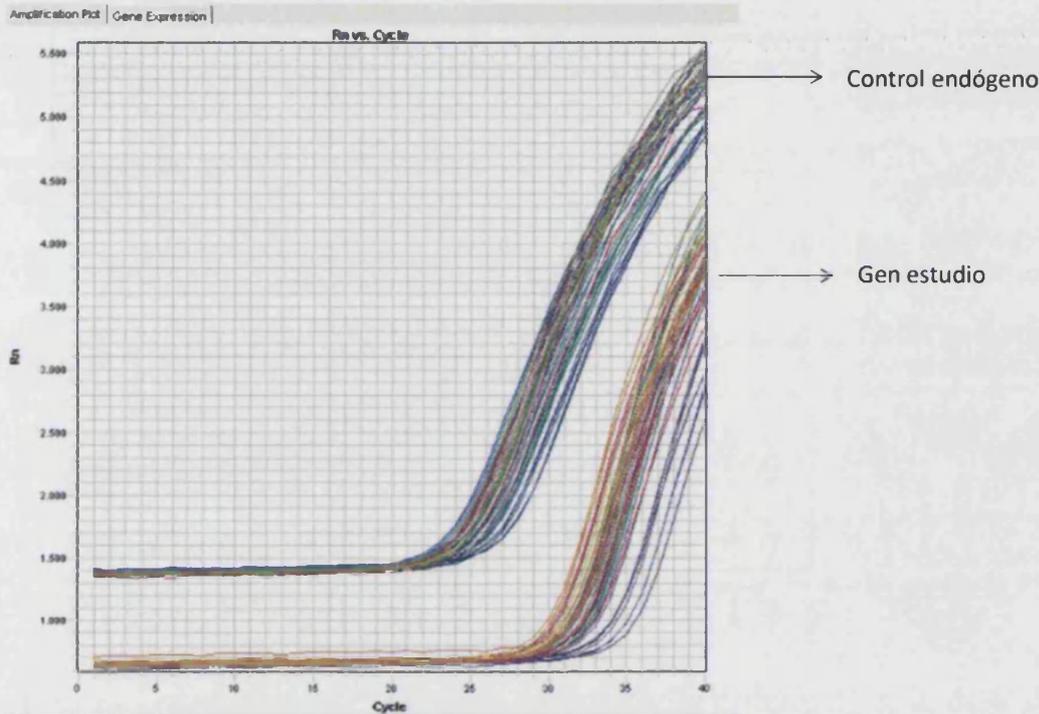


Figura 3.15 PCR cuantitativa, expresión génica del control endógeno y gen de estudio (software SDS 3.2, RQ Manager, Applied Biosystems).

En este estudio, para el análisis de la expresión génica se ha utilizado el Sistema de PCR a tiempo Real 7900HT Real Time PCR System de Applied Biosystems. El software utilizado para el análisis de resultados fue el software SDS 2.3 y RQ manager.

El procedimiento seguido para el ensayo de expresión génica se detalla en la Figura 3.16. Los genes estudiados para el estudio nutrigenómico (en INDIMED) fueron: *APOA2*, *APOA5*, *GCKR*, *SIRT1* y *POLK*. Los genes fueron seleccionados en base a la literatura científica y a los genes estudiados en esta tesis en el estudio nutrigenético. No obstante, algunos genes no mostraron la expresión en sangre deseada para obtener resultados en las condiciones del estudio. Por tanto se presentan resultados de aquellos genes de los cuales pudimos obtener resultados de expresión.

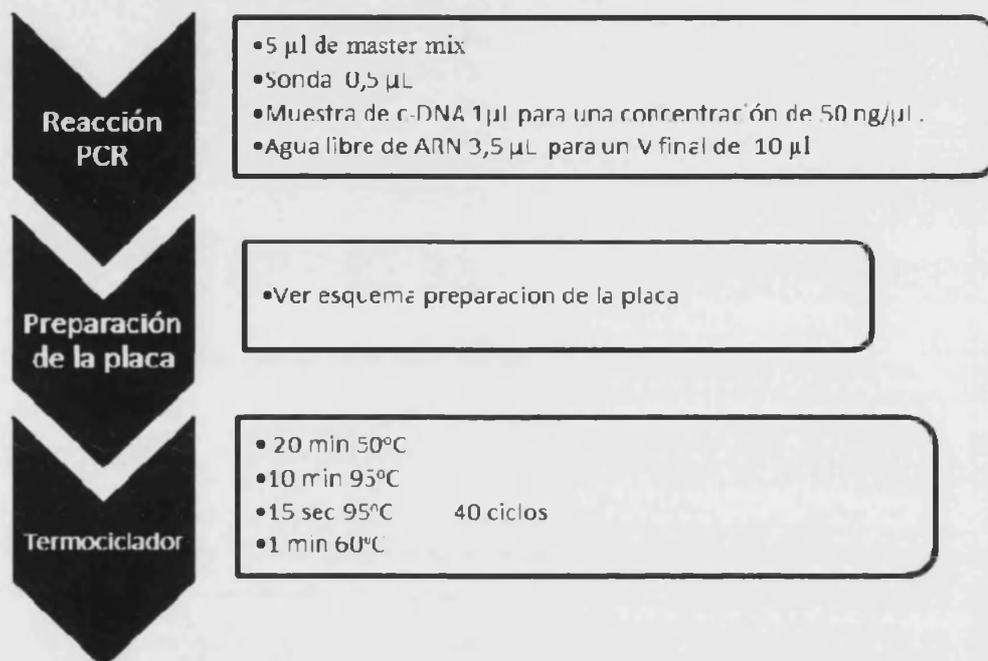


Figura 3.16 Esquema del protocolo para la realización del ensayo de expresión génica.

3.6 DESARROLLO EXPERIMENTAL DEL ELISA SANDWICH

Para determinar APOA 5 en suero se procedió como se describe a continuación (Figura 3.17):

1. Se montaron las tiras de los pocillos sobre el soporte de la placa, y se lavó cada pocillo 3 veces con 300 μ L de tampón de lavado. En cada uno de los lavados se eliminó la cantidad residual invirtiendo la placa y dando unos golpecitos sobre la misma.
2. Se añadió 60 μ L de tampón diluyente A a los controles 1 y 2 y los estándares de Apo A5.
3. Se añadió 80 μ L del tampón diluyente al blanco y a las muestras.
4. Se añadió 20 μ L de la solución matriz a todos los pocillos excepto al blanco
5. Se cargó 20 μ L de cada una de las diluciones del estándar de ApoA5 en orden ascendente. En los siguientes pocillos se cargaron otros 20 μ L de cada uno de los controles respectivos. Y a continuación se añadieron de manera secuencial 20 μ L de cada una de las muestras de concentración desconocida.

6. Todo este proceso se realizó en menos de una media hora para poder obtener resultados fiables. Posteriormente, se cubrió la placa con un adhesivo y se incubó durante 1,5 horas sobre un agitador mecánico a una velocidad de 400-500 r.p.m. aproximadamente.
7. Tras este tiempo, se decantó la solución y se lavó otras 3 veces con 300 μ L de tampón de lavado, eliminando la cantidad residual en cada lavado.
8. Se añadió 20 μ L de la solución diluida de detección de anticuerpo anti-Apo A5 humana. Y se incubó la placa con el adhesivo durante 1 hora sobre un agitador mecánico a una velocidad de 400-500 r.p.m.
9. Posteriormente, se decantó la solución y se lavó otras 3 veces con 300 μ L de tampón de lavado, eliminando la cantidad residual en cada lavado.
10. Se añadió 100 μ L de la solución de enzima peroxidasa unida a la avidina, se volvió a cubrir la placa con el adhesivo y se mantuvo 30 minutos en incubación, con la misma agitación que anteriormente.
11. Se volvió a decantar la solución y se lavó de nuevo 3 veces con 300 μ L de tampón de lavado, eliminando la cantidad residual en cada lavado.
12. Se añadió 100 μ L de la solución que contenía el sustrato de la peroxidasa, y se dejó la placa en agitación durante unos 15 minutos aproximadamente, cubierta con el adhesivo. En este periodo de tiempo veíamos como iba apareciendo el color azul en los pocillos, debido al producto de la reacción de la peroxidasa.
13. Por último, se añadió 100 μ L de la solución stop, se volvió a cubrir y agitándola suavemente el color azul viró a amarillo después de la acidificación. Este producto permite leer la absorbancia a 450nm y a 590 nm mediante un Multiskan EX–Termo Electron Corporation.

A través del valor de absorbancia medido para cada una de las muestras y por medio de la interpolación de este valor en una curva 4-paramétrica logística, obtenida a partir de los datos de absorbancia de los patrones, se obtiene el dato de concentración de Apo A5 capturada de la muestra. Los resultados finales deben ser multiplicados por 5, debido al factor de dilución de las muestras y son expresados en una concentración de μ g/mL.

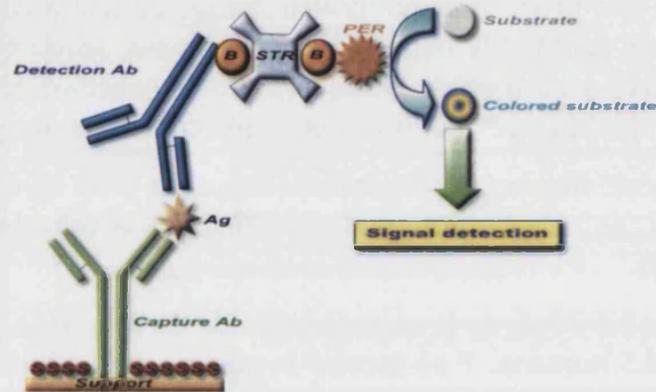


Figura 3.17 ELISA Sandwich (http://www.i-detect.eu/en_produ.php)

3.7 METODOLOGÍA PARA LA PREPARACIÓN DEL TEST DE SABORES

Para el estudio de la percepción de los diferentes sabores: amargo, dulce, salado, ácido y umami se emplearon distintas metodologías basadas en los estudios de Zhao L et al, 2003, Tepper BJ et al, 2001 para el sabor amargo y Qing Ying et al, 2009 para el resto de sabores.

En todos los casos se partió de disoluciones madre y se realizaron disoluciones hijas a distintas concentraciones.

Para el cálculo de las concentraciones y para la preparación de dichas disoluciones nos basamos en el cálculo de la molaridad para cada producto:

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{numero de moles (n)}}{\text{volumen (L)}}$$

$$\text{número de moles (n)} = \frac{\text{gramos (g)}}{\text{Masa Molecular (MM)}}$$

$$\text{Molaridad} = \frac{\text{gramos (g)}}{\text{Masa Molecular * Volumen (L)}}$$

3.7.1 SABOR AMARGO

Para evaluar la percepción del sabor amargo nos basamos en dos compuestos:

- PROP: 6-n-propil-2-tiouracil
- PTC: feniltiocarbamida

La percepción del sabor amargo fue evaluada mediante la preparación de unas tiras a distintas concentraciones de estos dos compuestos.

3.7.1.1 PREPARACIÓN DE LAS TIRAS DEL SABOR AMARGO

Se preparó una disolución madre del PROP y del PTC (Figura 3.18).

- Disolución madre del PROP: 0,5gr/L PROP $\rightarrow M = \frac{0,5/170,28}{1L} = 0,002937M \sim (2,937 \text{ mM})$
- Dilución madre PTC: 1gr/L PTC $\rightarrow M = \frac{1g/150,29}{1L} = 0,00657M \sim (6,57 \text{ mM})$

A partir de estas disoluciones se calcularon y prepararon las disoluciones hijas.

PROP (2,937 mM)	PTC (6,57 mM)
• Disolución 1 (D ₁): 5.5 mM	• Disolución 1 (D ₁): 5.6 mM
• Disolución 2 (D ₂): 1.74 mM	• Disolución 2 (D ₂): 1.8 mM
• Disolución 3 (D ₃): 0.55 mM	• Disolución 3 (D ₃): 0.56 mM
• Disolución 4 (D ₄): 0.174 mM	• Disolución 4 (D ₄): 0.180 mM
• Disolución 5 (D ₅): 0.055 mM	• Disolución 5 (D ₅): 0.056 mM

Figura 3.18. Disoluciones utilizadas para el sabor amargo

Una vez preparadas las disoluciones hijas, se recortan tiras de 1.5 cm de ancho de papel de filtro, que se impregnarán en cada disolución correspondiente. Cada tira llevará un signo incorporado (puntuado) en una parte de la tira (sin impregnación) que identificará la concentración de la tira de papel de filtro. Las tiras de PTC estarán dibujadas en color azul, y las de PROP en negro (Figura 3.19):

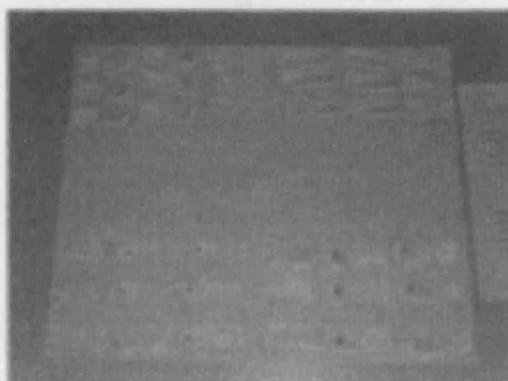


Figura 3.19 Panel de sabores amargos

3.7.1.2 PRUEBAS DEL SABOR AMARGO

Cada voluntario dispondrá de 5 tiras de PTC, 5 de PROP y una hoja con su identificación, donde él mismo anotará la percepción de cada tira degustada. El paciente tendrá que probarlas en el orden establecido, colocando la parte de la tira impregnada en la lengua y dentro de la boca. Se ayudará con el paladar para una mayor degustación. Puntuará del 0 al 5 según la percepción de sabor que haya obtenido.

3.7.2 SABOR DULCE, SALADO, ÁCIDO, UMAMI

Se prepara la disolución madre en matraces aforados estériles:

- **DULCE:** Sacarosa (azúcar blanquilla (pureza 99,9%) y agua destilada) Peso molecular: 342,29 g/mol. La disolución madre (D₁) se prepara a 0,4M

$$D_1 = 0,4 \text{ M} = (342,29\text{g})/1 \text{ L} \text{ ----} \rightarrow \text{g} = 96,91 \text{ g en 1 L de Agua}$$

- **SALADO:** sal común no yodada (NaCl) y agua destilada. Peso molecular: 58,4 g/mol

La disolución madre (D₁) se prepara a 0,200M

$$D_1 = 0,200 = (\text{g}/58,4)/1 \text{ L} \text{ ----} \rightarrow \text{g} = 11,68 \text{ g sal/L}$$

- **ÁCIDO:** ácido cítrico monohidrato (guinama) disuelto en agua destilada. Peso molecular 210,14 g/mol

Disolución madre (D₁): 0,034

$$D_1 = 0,034 = (\text{g}/192,13) / 1 \text{ L} = 6,5 \text{ g ácido cítrico/1L}$$

- UMAMI: L-glutamic acid monopotassium salt monohydrate (FLUKA) (L-ácido glutámico monopotásico (sales de monohidrato glutamato). Peso molecular: 203,23 g. La disolución madre (D_1) se prepara a 0,200M. Se prepara en 0,5 L: 20,32 g glutamato.

$$D_1 = 0,2 \text{ M} = (203,23 \text{ g}) / 1 \text{ L} \rightarrow g = 0,2 \times 203,23 = 40,64 \text{ g/L}$$

A partir de la solución madre D_1 preparamos las siguientes diluciones (Figura 3.20):



Figura 3.20 Disoluciones utilizadas para el sabor dulce (sacarosa), salado, ácido y umami (glutamato)

Para preparar todas las disoluciones utilizamos eppendorf estériles de diferentes colores:

- Sacarosa: transparente con símbolo negro
- Salado: verde con símbolo negro
- Ácido: amarillo con símbolo negro
- Umami: azul con símbolos en negro

Para que los participantes puedan probarlos se utilizan bastoncillos de algodón.

El participante debe impregnar el algodón en cada solución y saborearlo unos segundos. Entre cada solución es aconsejable beber agua. Una vez se percaten de la intensidad del sabor, deben anotarlo en la hoja correspondiente, puntuándolo en una escala del 0 al 5 (nada-un poco-moderado-fuerte-superfuerte). Además deben indicar el sabor que creen que corresponde la sustancia que están probando.

Las identificaciones de las distintas soluciones para todos los sabores corresponden (Figura 3.21):

Identificaciones:

- D₁: punto blanco ○
- D₂: rectángulo □
- D₃: raya negra —
- D₄: triángulo incompleto >
- D₅: I en posición horizontal
- Blanco: punto negro

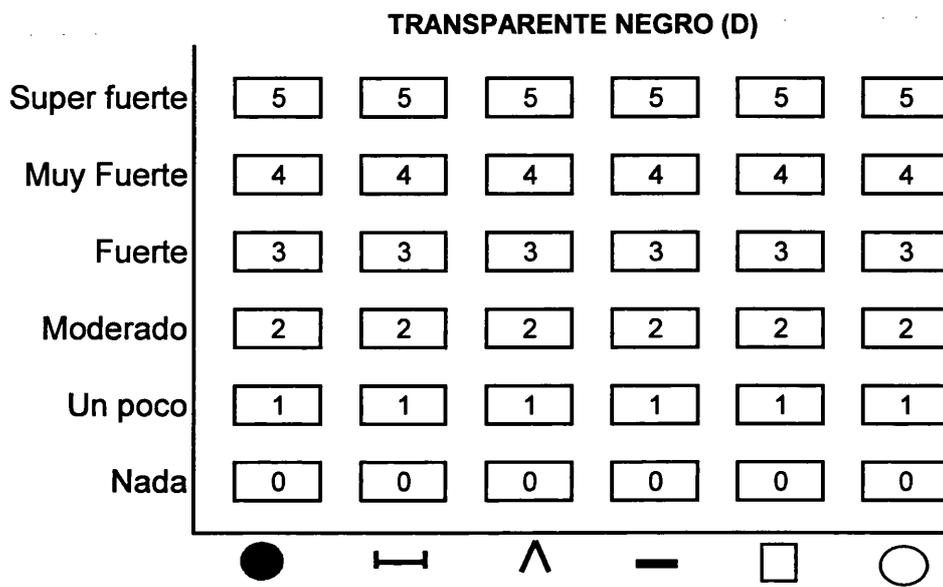


Figura 3.21 Escala de evaluación de la percepción del sabor.

3.8 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se creó una base de datos con el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 para Windows (SPSS Chicago, IL), donde se recogieron todas las variables incluidas en los diferentes cuestionarios, así como las variables analíticas obtenidas. Antes de proceder al análisis estadístico, se efectuó una depuración de los datos, con el fin de corregir errores de transcripción.

En primer lugar, se calcularon los estadísticos descriptivos para conocer, describir y resumir la muestra de las dos poblaciones estudiadas (PREDIMED e INDIMED). Posteriormente, se recurrió a la estadística inferencial para llevar a cabo el contraste de hipótesis, y finalmente, se completó con el *modelado estadístico*.

Entre los estadísticos descriptivos, se calcularon las medidas de tendencia central (media y mediana), medidas de dispersión (desviación típica, rango y coeficiente de variación), y medidas de forma (asimetría y apuntamiento) para variables cuantitativas, así como las frecuencias absolutas y relativas para las variables cualitativas.

Previo a la realización de los distintos análisis estadísticos se comprobó la normalidad de las diferentes variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Se establecieron correlaciones bivariadas con determinación del coeficiente de determinación de Pearson para comparación de dos variables continuas normales y el de Spearman cuando las variables no seguían una distribución normal.

Para la estimación de diferencias de las medias entre dos grupos independientes se utilizó el test de la t de Student. Cuando las variables para la comparación de medias de dos grupos independientes no seguían una distribución normal, se aplicó el equivalente no paramétrico a la t de Student, de Kruskal-Wallis. En la comparación de más de dos medias, se utilizó el análisis de la varianza paramétrico, salvo cuando el número de casos en cada grupo, hacía imprescindible recurrir al test no paramétrico. La comparación de las distribuciones de las frecuencias se realizó con el test del Chi cuadrado de Pearson. Cuando las frecuencias esperadas fueron inferiores a cinco, se utilizó el test de Fischer o el de Montecarlo en tablas 2 x 4. El test del Chi-cuadrado también se aplicó para investigar si las frecuencias de los genotipos estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para contrastar la hipótesis nula de no asociación entre los genotipos y las variables de interés (perfil lipídico, variables antropométricas, tensión arterial, etc) se realizó el análisis de regresión múltiple con variables Dummy para términos categóricos y para el análisis de interacción gen-dieta. Se realizó un análisis de

varianza multivariante para estudiar la influencia de distintas variables sobre una variable cuantitativa.

Respecto al análisis genético, antes de proceder a los análisis de asociación de los genotipos obtenidos con otros parámetros, se comprobó si las frecuencias genotípicas estaban en equilibrio Hardy-Weinberg. Se estimaron las frecuencias genotípicas y alélicas mediante el programa HWE (<http://linkage.rockefeller.edu/ott/linkutil.htm>). Se calculó el intervalo de confianza al 95% para cada frecuencia.

Los polimorfismos analizados se localizan en locus correspondientes a cromosomas autosómicos. De este modo cada individuo es portador de 2 alelos, uno en cada copia del cromosoma que se heredan del padre y de la madre de manera independiente. Así pues, para un hipotético locus con los alelos A y B, las tres posibilidades de parejas de alelos son AA, AB y BB que se corresponden a los 3 genotipos.

Por ejemplo, sea una población con los genotipos A/A, A/B y B/B donde las frecuencias alélicas observadas son:

$$p = \frac{2 \text{ A/A} + \text{ A/B}}{2n} \quad q = \frac{2 \text{ B/B} + \text{ A/B}}{2n}$$

Siendo p y q las frecuencias alélicas para los alelos A y B respectivamente y n el número total de individuos.

La frecuencia de las tres combinaciones alélicas (A/A, A/B y B/B) es la siguiente:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Se dice que una población se halla en *equilibrio de Hardy-Weinberg* cuando muestra las características básicas de la ley de Hardy-Weinberg. La prueba estadística que se emplea para la comparación de las frecuencias observada y esperada de los genotipos diferentes es el test de Ji cuadrado (χ^2). Para el ejemplo anterior, con dos alelos se tiene lo siguiente:

Observadas	A/A	A/B	B/B
Esperadas	p^2n	$2pqn$	q^2n

El test χ^2 da lo siguiente:

$$\chi^2 = \frac{\sum (\text{Obs} - \text{Esp})^2}{\text{Esp}}$$

Para proceder al análisis de los genotipos de los polimorfismos, se establecieron modelos de herencia (dominante, co-dominante o recesivo) para cada polimorfismo en función del efecto de la variante genética en el fenotipo de estudio de interés.

Para el estudio de asociación de los polimorfismos seleccionados con variables categóricas (obesidad, hipertrigliceridemia, etc) se calculó la *odds ratio* (OR), que indica la probabilidad de que los sujetos con el problema de salud estudiado estén expuestos al factor analizado, comparada con la probabilidad de que lo estén las personas sin el problema de salud. Clásicamente el cálculo de las OR se ha reservado para los estudios de casos y controles, en cambio la razón de prevalencia es la medida de asociación típica de los estudios transversales, siendo este último, el tipo de estudio realizado en el presente trabajo. Sin embargo, en la actualidad, está ampliamente aceptado el cálculo de las OR en los estudios de prevalencia, indicando que son OR de prevalencia.

Las interacciones gen-ambiente se estimaron mediante el cálculo de la significación estadística del término de interacción empleando modelos multivariantes.

Para el estudio de la percepción de sabores y su asociación con las variables de interés se crearon categorías de las variables tal y como se ha explicado en la sección correspondiente

Para el estudio de intervención, INDIMED los efectos de los cambios bioquímicos tras el periodo de intervención fueron evaluados mediante modelos de regresión lineal para muestras relacionadas. Se crearon nuevas variables para evaluar la diferencia de cambio de las variables de interés. Para estudiar la asociación de estas nuevas variables con los grupos de intervención se utilizaron modelos multivariantes ajustados por variables relevantes: edad, sexo y cambio de IMC. Puesto que tras el periodo de intervención hubo cambios estadísticos en el IMC se decidió ajustar por dicha variable para ver el efecto independiente de la intervención en los fenotipos de interés y no, que estos fueran debidos a la pérdida de peso. De igual modo se estudió el efecto de la intervención sobre los fenotipos de interés en función de los polimorfismos estudiados.

También se analizaron los cambios de expresión (basal-final) en función del grupo de intervención.

Se crearon varios modelos de ajuste en función del fenotipo analizado: modelo 1= edad+sexo; modelo 2= edad+sexo+IMC; modelo 3= edad+sexo+IMC, tratamiento hipolipemiente, modelo 4= modelo 3+diabetes+tabaco+actividad física.

Se consideró significación estadística para valores de $p < 0,05$ y además todos los test llevados a cabo fueron de dos colas.

3.9 MATERIAL Y MÉTODOS EMPLEADOS EN LAS ESTANCIAS FUERA DE ESPAÑA

3.9.1 ESTANCIA EN UNIVERSITY COLLEGE OF LONDON (UCL), LONDON

Esta estancia de investigación se realizó durante los meses propuestos para la concesión de la beca (estancias breves, FPU) en el segundo año de tesis doctoral (1 Julio 2009 al 31 Agosto 2009). El proyecto realizado durante los dos meses estuvo basado en la identificación de Tag-SNPs en el gen SP100 mediante herramientas bioinformáticas y realizar el genotipado de los polimorfismos seleccionados en dos amplias poblaciones (NPHSII (Northwick Park heart study II) y UDACS (UCL diabetes and cardiovascular disease study); y analizar las posibles asociaciones con parámetros relacionados con el metabolismo lipídico (Apolipoproteína AI, ApolipoproteínaB), adiponectina y parámetros de inflamación.

3.9.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA (NPSHII y UDACS).

Se realizó un estudio transversal en 4000 individuos pertenecientes a dos estudios diferentes, NPHSII y UDACS.

A) Estudio NPSHII; Northwick park heart study

NPSHII es un estudio prospectivo llevado a cabo en hombres sanos con una edad comprendida entre 50-64 años al inicio del estudio que no presentaban enfermedad cardiovascular. El estudio comenzó en 1989 y se realizó en nueve centros de atención primaria en Inglaterra y Escocia. De 4600 hombres, 4141 fueron elegibles para el estudio y 3052 fueron reclutados. Se recogió sangre para posteriores análisis bioquímicos (Miller GJ et al, 1996)

B) Estudio UDACS, University College London diabetes and cardiovascular disease study

UDACS es un estudio transversal llevado a cabo en pacientes diabéticos, diseñado para estudiar la asociación entre variantes comunes en genes relacionados con el metabolismo inflamatorio y factores de riesgo bioquímicas implicadas en enfermedades cardiovasculares. Brevemente, 1,100 pacientes fueron reclutados en

la clínica de diabetes de los hospitales University College of London in London entre los años 2001 y 2002 (Stephens JW et al, 2004).

El consentimiento ético fue obtenido en ambos estudios por el comité institucional de ética y todos los participantes firmaron el consentimiento informado antes del reclutamiento.

3.9.1.2 METODOLOGÍA EMPLEADA

Para la identificación de los tag-SNPs o SNPs indicadores utilizamos la herramienta bioinformática haploview 4.1 y SNPator para comparar y elegir aquellos SNPs, que por su localización en el gen, pudieran tener mayores probabilidades de ser indicadores de algún cambio en la proteína. Para la selección restringimos la búsqueda a aquellos SNPs con una frecuencia alélicas mayor a 5% y con un $r^2=0.9$. Los polimorfismos seleccionados se muestran fueron:

La extracción del ADN se realizó a partir de los leucocitos de la sangre mediante el método “salting-out” descrito previamente en la literatura (Miller et al 1998). Para el genotipado de los SNPs seleccionados se utilizaron sondas Taqman (Applied Biosystems, USA). Se trata de sondas fluorescentes específicas para cada alelo del SNP (single nucleotide polymorphism) discriminando genotipos gracias a la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa por señales fluorescentes generadas durante o después de una reacción de PCR tal y como se ha explicado en la sección 3.3. Los SNPs estudiados en este proyecto fueron: rs836237, rs6759377, rs13411346, rs12724, rs17275036 en el gen *SP100*.

El análisis estadístico se llevo a cabo mediante el programa SPSS.

3.9.2 ESTANCIA EN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUTE OF METABOLIC SCIENCE, CAMBRIDGE

Esta estancia de investigación se realizó durante los meses propuestos en el último año de tesis doctoral (1 Septiembre 2011 al 31 Octubre 2011). El proyecto estuvo basado en el estudio de la asociación de la adherencia a la Dieta Mediterránea y fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular, el efecto de la variación genética (en genes candidatos estudiados previamente en esta tesis) en rasgos metabólicos y su modulación por la Dieta Mediterránea en el estudio prospectivo Europeo de Investigación para el Cáncer (EPIC- Norfolk)

3.9.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA (EPIC-Norfolk).

El estudio EPIC-Norfolk consta de un total de 25,636 hombres y mujeres con una edad comprendida entre 40-79 años al inicio del reclutamiento (1993-1997) residentes de Norwich y alrededores (Inglaterra). Este estudio ha sido descrito previamente en detalle (Day N et al, 1999).

Para el proyecto propuesto y realizado durante esta estancia excluimos los participantes que al inicio del estudio tuvieron valores perdidos para el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos o aquellos que reportaron valores perdidos en más de 10 ítems del mismo. Así mismo, excluimos los participantes con información no disponibles sobre las medidas de lípidos. Esto nos dejó una muestra final con 20,967 participantes para incluir en el análisis transversal.

3.9.2.2 METODOLOGÍA EMPLEADA

A) Evaluación dietética y creación de las escalas de adherencia a la Dieta Mediterránea.

La adherencia a la dieta mediterránea fue evaluada a partir del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (Bingham SA et al, 1997). Para ello se creó una escala de adherencia a la dieta mediterránea basada en la escala relativa de adherencia a la dieta mediterránea (rMED) de Buckland G et al, (2009). Esta escala incluía nueve componentes nutricionales característicos de la DM de los cuales algunos son presumiblemente beneficiosos (verduras, legumbres, fruta y frutos secos, cereales, pescado, aceite de oliva y consumo moderado de alcohol) y otros presumiblemente perjudiciales (carne y productos cárnicos procesados, y productos lácteos enteros). Cada componente del rMED (a parte del alcohol) fue medido en gramos por 1000 kcal. Todos los componentes de la escala dietética (excepto el aceite de oliva y el alcohol) fueron divididos en tertiles de ingesta dietética. Se asignó un valor de 0, 1 y 2 al primer, segundo y tercer tercil respectivamente para la ingesta de verduras, legumbres, fruta y frutos secos, cereales, pescado y al contrario para los componentes perjudiciales. Para el alcohol, un valor de 2 se asignó a hombres y mujeres con un consumo moderado de alcohol (10-50 g/día y 5-25 g/día respectivamente) y 0 para cualquier otro valor. Para el aceite de oliva se asignó 0 a los que no consumían, 1 para los que tenían una ingesta inferior a la media y 2 para los que tenían una ingesta superior a la media. Así, el rMED comprendía una escala con una puntuación de 0 a 18 puntos. Finalmente el rMED se clasificó en tres categorías que reflejaban la adherencia a la DM según: baja (0-6 puntos), media (7-10 puntos) y alta (11-18 puntos).

Además, durante esta estancia se creó la escala de adherencia a la DM según la utilizada en el PREDIMED (Schroder H et al, 2011) modificando algunos parámetros en función de los datos disponibles (modificación para el punto del consumo de aceite de oliva virgen dada el bajo consumo en esta población y los sofritos).

B) Genotipado de la variante genética rs780094 en el gen GCKR

Se determinó y estudió el SNP rs780094 y el rs1260326 en el gen *GCKR* para las asociaciones propuestas en el proyecto de estudio por el interés de este polimorfismo según los resultados obtenidos en esta tesis.

C) Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos realizados y propuestos minuciosamente en el plan de proyecto propuesto fue realizado mediante SPSS versión 15.0 y STATA 12.

3.9.3 ESTANCIA EN HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH (HSPH), BOSTON.

Esta estancia de investigación se realizó durante los meses propuestos en el tercer año de tesis doctoral (1 Agosto 2010 al 30 Octubre 2010). El proyecto estuvo basado en el estudio de las interacciones gen*dieta mediterránea en la modulación de las concentraciones de triglicéridos y otros fenotipos de interés en Nurses' Health Study. Replicación de resultados en varias cohortes.

3.9.3.1 DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA ESTUDIADA (Nurses' Health Study).

La cohorte del estudio de Salud de las Enfermeras fue establecida en 1976 con un reclutamiento inicial de 121,000 enfermeras de edad comprendida entre 30-55 años residentes en 11 estados de Estados Unidos que completaron un cuestionario y una historia médica y de estilos de vida. Los factores del estilo de vida, incluyendo tabaco, estado postmenopáusico, terapia hormonal, peso etc son actualizados por cuestionarios validados cada 2 años. Una subcohorte de 32000 personas sin diabetes, enfermedad cardiovascular, infarto o cáncer, proporcionaron sangre entre 1989 y 1990. La incidencia de estas enfermedades ha sido confirmada diagnosticada y validada por cuestionarios. En este estudio se han utilizado datos de 712 casos de mujeres diabéticas para el análisis de los objetivos propuestos. Para el análisis de dieta se han utilizado datos de 1990.

3.9.3.2 METODOLOGÍA EMPLEADA

A) Evaluación dietética y creación de las escalas de adherencia a la Dieta Mediterránea.

Se creó una escala de adherencia a la DM siguiendo la empleada en el estudio PREDIMED (Schroder H et al, 2011) en función del cuestionario utilizado en la población Nurses' Health Study con las modificaciones pertinentes en función de las diferencias de consumo y la información disponible.

B) Genotipado de la variante genéticas seleccionadas

Para este proyecto se propuso estudiar los polimorfismos rs1260326 y rs1799884 en el gen *GCKR* y *GCK* para el estudio de replicación de resultados previos obtenidos en esta tesis y potenciales nuevos resultados en la cohorte Nurses Health Study. Datos de estos SNPs fueron obtenidos mediante estudios de asociación genética (Genome Wide Association Studies). Además se seleccionaron otros SNPs relevantes con enfermedad coronaria para el estudio de asociación y de modulación ambiental por la adherencia a la dieta mediterránea rs12526453, rs9818870, rs11206510, rs4977574, rs646776, rs2259816, rs17465637, rs9982601 rs6725887, rs1746048, rs1122608 en o cerca del cromosoma 9q.

C) Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos realizados y propuestos minuciosamente en el plan de proyecto propuesto fue realizado mediante SPSS versión 15.0 y SAS version 9.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC).

4

RESULTADOS

Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos
Aristóteles

4.1 GENERALIDADES

Los resultados presentados en esta tesis son fruto de un trabajo multidisciplinar que implica una labor en equipo para la obtención de las conclusiones generales. A lo largo de varios años de investigación recopilando la información necesaria para llevar a cabo los trabajos conducentes a esta tesis, la doctoranda ha tenido la oportunidad de participar en todas y cada una de las tareas que forman parte del protocolo de la investigación genómica cardiovascular. Así, la doctoranda se ha familiarizado con las técnicas de laboratorio incluyendo, desde la extracción de ADN, hasta el análisis de polimorfismos por distintas técnicas, en la elaboración de bases de datos genómicas, tratamiento y análisis estadístico de datos, y participación en la presentación de los resultados y redacción de los manuscritos o comunicaciones a congresos. Además la doctoranda, ha participado activamente en el seguimiento de los participantes del estudio PREDIMED mediante intervención nutricional y ha realizado, conducido y diseñado y llevado a cabo en su totalidad el estudio de intervención INDIMED.

A continuación se presentan los resultados obtenidos del estudio de las dos poblaciones analizadas. Al inicio se reflejan las características generales de la muestra estudiada, las medidas antropométricas y bioquímicas estudiadas, los antecedentes clínicos personales y familiares. Posteriormente se analizan los hábitos del estilo de vida (actividad física, tabaco y nivel de estudios), y el resultado del análisis del consumo de alimentos. Se realiza un estudio de estas variables en función de los fenotipos de interés presentados en esta tesis.

Finalmente, se muestran los resultados de los genes estudiados, la prevalencia, su asociación con fenotipos relacionados, y el análisis de interacciones gen-ambiente.

4.2 ESTUDIO PREDIMED

4.2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA ESTUDIADA

Para la presente tesis se incluyeron 945 individuos (340 hombres y 605 mujeres). Todos ellos fueron participantes del estudio PREDIMED, reclutados en el nodo de Valencia, y con alto riesgo cardiovascular. Estos participantes presentaron una elevada prevalencia de obesidad y diabetes (470 participantes son obesos y 432 son no obesos; 448 son diabéticos y 475 son no diabéticos). Las principales características descriptivas (edad, peso, IMC, presión arterial y niveles de lípidos) del total de los sujetos estudiados y comparando por sexo se muestran en la Tabla 4.1. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando la *p* fue menor de 0,05.

Tabla 4.1 Características sociodemográficas, antropométricas, clínicas y bioquímicas de la muestra estudiada.

	Total de la población (n= 945)	Hombres (n=340)	Mujeres (n=605)	P
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
Edad (años)	67,3 (6,2)	66,8 (5,9)	67,60 (6,6)	0,053
Peso (Kg)	77,6 (12,9)	81,2 (12,1)	75,6 (13,0)	<0,001
Talla (m)	1,6 (0,1)	1,7 (0,1)	1,5 (0,1)	<0,001
Cintura (cm)	104,3 (12,1)	105,2 (11,6)	103,8 (12,4)	0,102
IMC (kg/m²)	30,9 (5,1)	29,4 (4,0)	31,8 (5,5)	<0,001
PAS (mmHg)	146,6 (22,1)	147,0 (21,1)	146,3 (22,7)	0,655
PAD (mmHg)	81,5 (10,9)	81,9 (10,9)	81,6 (10,9)	0,498
CT (mg/dl)	208,3 (40,4)	200,3 (38,1)	212,8 (40,9)	<0,001
LDL-c (mg/dl)	128,9 (37,5)	124,0 (36,8)	131,6 (37,7)	0,159
HDL-c (mg/dl)	53,3 (13,8)	48,9 (12,1)	55,8 (14,1)	<0,001
TG (mg/dl)**	130,9 (80,8)	137,1 (73,9)	127,4 (84,3)	0,025
Glucosa (mg/dl)	122,7 (40,4)	128,5 (41,8)	119,4 (39,3)	0,001

P: valor *P* (*T student*) en la comparación de las correspondientes variables entre hombres y mujeres. ** Valor calculado para el logaritmo de la concentración de triglicéridos. DT: Desviación estándar, IMC: Índice de Masa Corporal, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica. CT: Colesterol total, TG: triglicéridos.

La media de edad en hombres y en mujeres fue de 66,8±6,6 años y 67,6±5,9 años respectivamente. Aunque el peso fue estadísticamente mayor en hombres que en mujeres, los hombres presentaron un IMC significativamente menor que las

mujeres ($29,4 \pm 4,0$ vs $31,8 \pm 5,5$ Kg/m²). Pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas según el sexo en la media de presión arterial sistólica ($147,0 \pm 21,1$ mmHg en hombres y $146,3 \pm 22,7$ mmHg en mujeres; $P=0,655$) ni en la presión diastólica ($81,9 \pm 10,9$ mmHg en hombres y $81,6 \pm 10,9$ mmHg en mujeres; $P=0,498$).

En cuanto a los niveles de lípidos se observan diferencias significativas según sexo en la media de CT, siendo mayor en mujeres que en hombres ($212,8 \pm 40,9$ vs $200,3 \pm 38,1$ mg/dL; $P<0,001$). No obstante, las mujeres presentaron una media de HDL-C significativamente superior que los hombres ($55,8 \pm 14,1$ vs $48,9 \pm 12,1$ mg/dL; $P<0,001$). Los niveles de triglicéridos fueron superiores en hombres que en mujeres ($137,1 \pm 73,9$ vs $127,4 \pm 84,3$; $P=0,025$, respectivamente).

Por otro lado, se determinaron también las prevalencias de las variables clínicas de la población estudiada (Tabla 4.2) observándose que en la población total el 79,7 % eran hipertensos; 48,5 % diabéticos; 52,1 % obesos; 29,7% de hipertrigliceridémicos y 70,4% hipercolesterolémicos. Existe un mayor porcentaje de mujeres que presentan hipertensión, obesidad, hipercolesterolemia, antecedentes de problemas cardíacos y hipertrigliceridemia que de hombres (84,4 % frente a 71,4 %; $P<0,001$, 57,6% frente a 41,7%, $P<0,001$, y 72,8% frente a 66,1%; $P=0,035$; 41% frente a 29%; $P=0,001$ y 58,1% frente a 41,9%; $P=0,023$ respectivamente). Sin embargo, la proporción de hombres diabéticos es mayor respecto a las mujeres (56% frente a 44,3%; $P=0,001$).

Tabla 4.2 Prevalencias de las variables clínicas de la población estudiada.

	Total de la población (n= 945)	Hombres (n=340)	Mujeres (n=605)	P*
Hipertensos (%)	79,7	71,4	84,4	<0,001
Diabéticos (%)	48,5	56	44,3	0,001
Obesidad** (%)	52,1	41,7	57,6	<0,001
Hipertrigliceridemia (%)	28,7	41,9	58,1	0,023
Hipercolesterolémicos (%)	70,4	66,1	72,8	0,035
Antecedentes problemas cardíacos (%)	36,8	29	41	0,001

*Se empleó el test de Chi- Cuadrado para comparar porcentajes entre hombres y mujeres.

**IMC ≥ 30 kg/m²

En esta muestra seleccionada, del total de diabéticos, solo el 18,3% requieren insulina para tratar esta enfermedad. Dentro de los pacientes que sufren hipercolesterolemia, el 69,1% toman medicamentos para regular sus niveles y el

82,1% de los pacientes hipertensos toman medicamentos para controlar sus valores de presión arterial.

4.2.2 VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA SELECCIONADA. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

En este apartado se comentarán variables del estilo de vida y sociodemográficas.

Para cada una de ellas se seguirá la misma estructura. Primero se hará una descriptiva de la variable y después se estudiarán las asociaciones de las mismas tanto con la obesidad y medidas antropométricas como con concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados.

4.2.2.1 ACTIVIDAD FÍSICA

PREVALENCIA

En esta población se categorizó la actividad física como sedentario/no sedentario considerando sedentario a aquellas personas que no hacían ningún tipo de actividad. El 23% de las personas encuestadas eran sedentarios (27% hombres y 20% mujeres), sin diferencias significativas entre hombres y mujeres ($p=0,6$).

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.3 se presentan las variaciones de los principales fenotipos intermedios en función la actividad física, calculada como una variable dicotómica (sedentario/no sedentario). A pesar de no alcanzar la significación estadística en todas las variables, de manera general se observa como el no ser sedentario afecta positivamente en todos los casos. Tras ajustar por sexo no se observaron cambios estadísticos.

Tabla 4.3 Concentraciones de triglicéridos, parámetros relacionados y medidas antropométricas en función de la actividad física.

	IG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	IMC (Kg/m ²)	Cintura (cm)	Obesidad (%)
Sedentario	135,6 (38,6)	215,7 (42,9)	47,4 (8,5)	141,2 (41,3)	31,8 (3,8)	103,7 (8,2)	75
No sedentario	130,3 (76,2)	207,5 (41,1)	52,7 (13,7)	128,7 (36,0)	30,5 (4,7)	104,1 (11,8)	48,9
P	0,301	0,425	0,149	0,159	0,309	0,890	0,034

Los valores están expresados como media y (desviación estándar)

P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos ajustados por edad y sexo. IMC: índice de masa corporal, TG: triglicéridos, CT: colesterol total

4.2.2.2 TABACO

PREVALENCIA

En el cuestionario general se recogió información acerca del hábito tabáquico en las siguientes variables: si fumador, exfumador (0-1 año), exfumador (1-5 años) y exfumador de más de 5 años o nunca fumador. Para todos los análisis posteriores se consideraron las categorías: exfumadores o nunca fumador y fumador actual. El 11,9 % de los participantes fumaban con diferencias significativas por sexo ($p < 0,001$) siendo los hombres los que mayor prevalencia obtuvieron para el estado actual de fumar respecto a las mujeres (26,7% vs 3,6%, respectivamente) (figura 4.1).

Los fumadores, fumaban de media $15,6 \pm 2,6$ cigarrillos al día y el tiempo que estaban de media fumando fue de $30,5 \pm 12,5$ años.

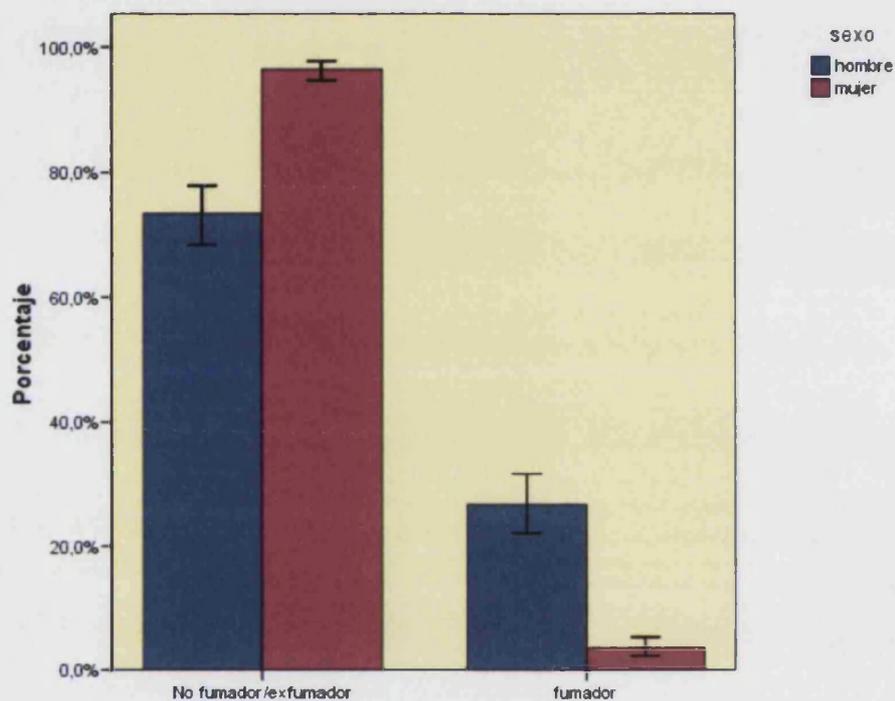


Figura 4.1 Porcentaje de individuos por sexo según adicción al tabaco en la muestra estudiada.

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.4 se presenta la influencia del hábito tabáquico en los principales fenotipos intermedios. Para ello, se creó una variable dicotómica que comprendía, por un lado no fumadores (nunca fumadores o exfumadores) y fumadores. En general, se observa un efecto desfavorable de ser fumador sobre de los fenotipos intermedios. Así, aquellas personas fumadoras presentaron significativamente mayores niveles de triglicéridos (fumador: $153,1 \pm 106,1$ vs no fumador: $126,8 \pm 66,0$ mg/dL; $p=0,002$) que los no fumadores tras ajustar por sexo. Además, los no fumadores presentaron mayores valores de HDL-C que los fumadores ($53,9 \pm 13,9$ vs $48,1 \pm 12,4$ mg/dL respectivamente; P cruda= $0,001$). Sin embargo, reconocemos un posible sesgo por sexo dado que las mujeres presentan mayores niveles de HDL-C y son menos fumadoras. Por ello, tras ajustar por sexo se perdió la significación que obteníamos teniendo en cuenta los valores crudos ($p=0,076$).

Tabla 4.4 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del hábito tabáquico.

	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	IMC (Kg/m ²)	Cintura (cm)	Obesidad (%)
Fumador	153,1 (106,1)	209,5 (45,1)	48,1 (12,4)	128,8 (38,0)	29,7 (4,0)	104,6 (11,1)	56,7
No fumador	126,8 (66,0)	208,3 (39,6)	53,9 (13,9)	129,1 (35,4)	31,0 (5,0)	104,2 (11,9)	52,9
P	0,007**	0,772	0,076**	0,938	0,12	0,748	0,138

Los valores están expresados como media y (desviación estándar) excepto la obesidad en porcentaje.

P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos

IMC: índice de masa corporal, TG: triglicéridos, CT: colesterol total PAS: presión arterial sistólica; PAD. Presión arterial diastólica

**Valor de P tras ajustar por sexo.

4.2.2.3 NIVEL DE ESTUDIOS

PREVALENCIA

En lo referente al nivel de estudios (Tabla 4.5), la mayoría de los participantes sólo poseían estudios primarios y un pequeño grupo de participantes no sabían leer ni escribir (5,1%).

Tabla 4.5 Valores de frecuencia y porcentaje de individuos agrupados en función a su nivel de estudios, en la muestra estudiada

	Total (%)	Hombres (%)	Mujeres (%)
Estudio universitario	3,9	6,4	2,5
Técnico superior	2,8	2,0	3,2
Bachiller	10,7	14,0	8,7
Escuela primaria	77,6	76,3	78,3
Sin estudios	5,1	1,3	7,2

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.6 se muestran los diferentes valores de triglicéridos y parámetros relacionados en función del nivel de estudios. Se observa que la concentración de triglicéridos aumenta conforme disminuyen los niveles de estudios con una

tendencia a la significación tras ajustar por sexo e IMC ($P=0,081$). Las demás variables lipídicas (HDL-C, HDL-C, CT) tampoco mostraron diferencias significativas en función del nivel de estudios. El IMC fue significativamente superior en los individuos sin estudios que en los que presentaron mayor nivel de estudios (estudios universitarios: $28,8\pm 5,4$ vs $31,1\pm 5,1$ Kg/m² (sin estudios); $P=0,008$). Algo similar se observó para los valores de glucosa en ayunas ($P=0,012$).

Tabla 4.6 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del nivel de estudios de la muestra estudiada

	TG (mg/dL)	IMC (kg/m ²)	Glucosa (mg/dL)
Estudio universitario	119,1(80,8)	28,8(5,4)	119,5(34,1)
Técnico superior	112,9(57,8)	28,9(4,2)	104,7(26,3)
Bachiller	124,5(54,2)	29,9(5,0)	112,1(34,2)
Escuela primaria	131,9(74,6)	31,1(4,8)	123,5(40,1)
Sin estudios	136,1(81,5)	31,1(5,1)	126,1(40,0)
P	0,081*	0,006**	0,012*

Los valores están expresados como media y (desviación estándar).

P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos

TG: triglicéridos; IMC: índice de masa corporal

**Valor de P tras ajustar por sexo e IMC.*

***Valor de P tras ajustar por sexo.*

4.2.2.4 SITUACIÓN LABORAL

PREVALENCIA

La situación laboral de los individuos del estudio se muestra en la Tabla 4.7. Debido a la edad de los participantes, el 46,8% fueron personas que ya estaban jubiladas, el 38,1% correspondió a amas de casa, y el porcentaje de participantes en activo fue tan solo del 11,2%, siendo el 6,5 % hombres y el 4,7 % mujeres. También en esta muestra hubo un 1,4% de participantes incapacitados, un pequeño porcentaje se encontró en el momento de la entrevista de baja (el 1,6%), y otro pequeño porcentaje se encontró en paro (el 1,1%).

Tabla 4.7 Valores de frecuencia y porcentaje de individuos agrupados en función de su situación laboral, en la muestra estudiada.

	Total (%)	Hombres	Mujeres
Trabajando	11,2	18,3	7,3
Incapacidad	1,1	1,9	0,7
Ama de casa	38,1	0,0	59,2
Jubilado	46,8	74,9	31,4
Baja laboral	1,6	2,6	1,1
En paro	1,1	2,6	0,4

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

No se observaron diferencias significativas para las concentraciones de triglicéridos e IMC. Sin embargo, el colesterol total fue significativamente superior en aquellos que tenían una situación actual en activo, es decir, trabajando (Trabajando: $219,6 \pm 45,7$ vs paro: $196,5 \pm 40,3$ mg/dL; $P=0,004$). No obstante, no se observaron diferencias para el HDL-C y el LDL-C tras ajustar por sexo.

A pesar de que el consumo de alimentos se encuentra dentro de los estilos de vida, se ha realizado un apartado a parte dada la amplia información y el análisis detallado que se ha realizado para este apartado.

4.2.3 CONSUMO DE ALIMENTOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

En la tabla 4.8 se muestran las características de la dieta de la población general, hombres y mujeres en cuanto al aporte de principios inmediatos, y energía total. Atendiendo a los valores expresados en porcentajes solo se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al aporte de proteínas. Las mujeres presentaron un consumo significativamente superior que los hombres ($P<0,001$). El consumo de fibra fue inferior a las recomendaciones diarias alimenticias (10g/1000Kcal) ($9,2 \pm 0,3$ g/d total; $9,8 \pm 0,6$ g/d hombre y $8,8 \pm 0,4$ g/d mujer) sin diferencias significativas entre grupos ($P=0,053$) o incluso según las ingestas diarias de referencia (IDR) los valores para la ingesta de fibra para personas mayores de 70 años son de 30 g/día para los hombres y 21 g día para las mujeres.

En cuanto al colesterol se recomienda un consumo inferior a 300mg/día o menor a 100mg/1000Kcal. En nuestra población los valores obtenidos fueron superiores (376,2±9,2 mg/d total; 391,8±9,8 mg/d para hombres; 367,7±8,8 mg/d para mujeres; P=0,041).

Tabla 4. 8 Caracterización general de la dieta en la población general de estudio.

	TOTAL		HOMBRE		MUJER	
	Media (DT)		Media (DT)		Media (DT)	
Energía total (Kcal/d)	2254,4 (662,2)		2419,1(687,0)		2165,3(631,4)	
	g/día	%	g/día	%	g/día	%
Hidratos de carbono	239,2(85,0)	42,1(7,3)	253,4(91,4)	41,5(8,0)	231,5(80,4)	42,5(6,9)
Proteínas	95,1(27,3)	17,2(2,9)	98,5 (26,6)	16,6(3,1)	93,3(27,5)	17,5(2,7)
Lípidos Total	97,6(33,1)	39,1 (7,1)	103,4(33,1)	38,7 (7,6)	94,4(32,6)	39,3(6,9)
AGMI	47,6(16,6)	19(5,1)	50,4(16,9)	19,3(4,7)	46,1(16,2)	19,2 (4,8)
AGPI	15,9(8,0)	6,3(2,3)	17,0(8,4)	6,2(2,3)	15,3(7,7)	6,3(2,3)
AGS	25,8(10,3)	10,3(2,4)	27,2(9,5)	10,2(2,4)	25(10,6)	10,3(2,4)

DT: desviación estándar, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; AGS: Ácidos grasos saturados

4.2.3.1 CONSUMO DE ALIMENTOS Y GRUPOS DE ALIMENTOS POR SEXO

En las tablas 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13 se muestran las medias de frecuencia de consumo semanal de diversos alimentos agrupados en cinco grupos de alimentos (lácteos, cereales y legumbres, carnes y pescados, frutas y verduras, y aceites y grasas). En las tablas sólo están representados los alimentos más representativos así como aquellos para los que se obtuvieron diferencias significativas por sexo.

Tras realizar un análisis de comparación de medias mediante el test estadístico de t de Student, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por sexo en el consumo de leche desnatada, yogur desnatado, pollo, cerdo, cordero, jamón, salchichón, morcilla, chorizo, tocino y bacon, pescado en salazón, latas de pescado, almendras, cacahuets, pistachos, avellanas, alubias, pan blanco, aceite de oliva virgen extra y galletas integrales.

Tabla 4.9 Consumo expresado en veces por semana de lácteos en la población.

	Total (n=945)	Hombres (n= 340)	Mujeres (n=605)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
Leche entera	1,2 (3,4)	1,4 (3,6)	1,1 (3,2)	0,214
Leche semidesnatada	3,6 (5,2)	3,4 (4,9)	3,6 (5,3)	0,526
Leche desnatada	3,3 (5,3)	2,6 (4,6)	3,7 (5,6)	0,004
Yogur entero	1,1 (2,6)	1,2 (2,8)	1 (2,5)	0,278
Yogur desnatado	2,6 (3,5)	1,9 (3,1)	3 (3,6)	<0,001
Queso curado	2,2 (2,3)	2,3 (2,2)	2,1 (2,3)	0,110
Queso fresco	2,1 (2,2)	1,7 (2,1)	2,3 (2,1)	<0,001

*Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias.

DT: Desviación estándar

Tabla 4.10 Consumo expresado en veces por semana de cereales y legumbres en la población.

	Total (n=945)	Hombres (n= 340)	Mujeres (n=605)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
<i>Cereales</i>				
Pan blanco	7,2 (6,4)	8,4 (6,1)	6,6 (6,5)	<0,001
Pan integral	2,6 (5,0)	2,3 (5,5)	2,8 (4,8)	0,246
Cereales integrales de desayuno	0,2 (1,1)	0,1 (0,9)	0,2 (1,1)	0,255
Arroz	1,8 (1,4)	1,8 (1,5)	1,7 (1,3)	0,386
Pasta	1,5 (1,4)	1,5 (1,4)	1,5 (1,3)	0,904
<i>Legumbres</i>				
Lentejas	0,9 (0,7)	0,9 (0,7)	0,9 (0,6)	0,154
Alubias	0,6 (0,4)	0,7 (0,4)	0,6 (0,4)	0,001
Garbanzos	0,7 (0,5)	0,7 (0,6)	0,6 (0,5)	0,154
Guisantes	0,4 (0,9)	0,4 (0,6)	0,4 (1,0)	0,701

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias.

DT: desviación estándar.

Tabla 4. 11 Consumo expresado en veces por semana de carnes y pescados en la población.

	Total (n=945)	Hombres (n= 340)	Mujeres (n=605)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
<i>Carnes</i>				
Pollo, pavo	2,2 (1,5)	2 (1,6)	2,3 (1,5)	0,019
Tenera	0,8 (1,1)	0,8 (1,0)	0,7 (1,1)	0,064
Cerdo	0,6 (1,0)	0,8 (0,9)	0,6 (1,0)	0,014
Cordero	0,5 (0,7)	0,6 (0,8)	0,5 (0,6)	0,011
Conejo	0,7 (0,7)	0,7 (0,7)	0,6 (0,7)	0,091
Hígado	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,458
Jamón serrano	2,2 (2,0)	2,5 (2,2)	2,1 (1,9)	0,002
Salchichón, chorizo,morcilla	0,7 (1,2)	1,0 (1,5)	0,5 (1,0)	<0,001
Tocino, bacon	0,1 (0,4)	0,2 (0,4)	0,1 (0,4)	0,010
<i>Pescados</i>				
Pescado blanco	2,0 (1,4)	2,0 (1,6)	2,1 (1,3)	0,304
Pescado azul	1,2 (1,2)	1,3 (1,3)	1,2 (1,1)	0,232
Pescado en salazón	0,2 (0,4)	0,2 (0,5)	0,2 (0,3)	0,034
Latas de pescado	0,1 (0,5)	0,2 (0,7)	0,1 (0,3)	0,008

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias.

DT: desviación estándar

Tabla 4. 12 Consumo expresado en veces por semana de verduras y frutas en la población.

	Total (n=945)	Hombres (n= 340)	Mujeres (n=605)	p*
	Media(DT)	Media(DT)	Media(DT)	
<i>Verduras y hortalizas</i>				
Lechuga, endivia, escarola	5,1 (2,8)	5,3 (3,0)	5,0 (2,7)	0,225
Tomate crudo	5,6 (2,8)	5,9 (3,1)	5,4 (2,6)	0,024
Judía verde	1,9 (1,5)	1,9 (1,7)	1,9 (1,5)	0,985
Berenjena, calabacín	1,8 (2,1)	1,6 (2,1)	1,9 (2,2)	0,096
Alcachofa, puerro, apio	1,1 (1,2)	1,0 (1,1)	1,2 (1,2)	0,023
Col, coliflor, brócoli	0,8 (1)	0,8 (1,1)	0,8 (1,0)	0,857
Gazpacho andaluz	0,4 (0,9)	0,4 (1,0)	0,4 (0,9)	0,892
Cebolla	3,7 (2,7)	3,7 (2,8)	3,7 (2,5)	0,911
<i>Frutas y frutos secos</i>				
Cítricos	3,6 (4,1)	3,8 (4,2)	3,4 (4,0)	0,162
Plátano	1,1 (2,0)	1,2 (2,1)	1,1 (2,0)	0,211
Manzana, pera	5,3 (3,7)	5,3 (3,8)	5,3 (3,7)	0,812
Melocotón, albaricoque, nectarina	0,6 (1,1)	0,6 (1,2)	0,6 (1,1)	0,987
Kiwi	1,7 (2,9)	1,2 (2,5)	1,9 (3,0)	0,001
Almendras, cacahuets, avellanas	1,0 (1,8)	1,2 (2,0)	0,9 (1,6)	0,015
Nueces	1,3 (2,3)	1,3 (2,2)	1,3 (2,3)	0,744

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar

Tabla 4. 13 Consumo expresado en veces por semana de aceites y grasas en la población.

	Total (n=945)	Hombres (n= 340)	Mujeres (n=605)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
<i>Aceites</i>				
Aceite de oliva	13,0 (13,6)	12,7 (13,6)	13,2 (13,6)	0,562
Aceite de oliva virgen extra	11,0 (14,2)	12,3 (14,7)	10,3 (13,8)	0,037
Aceite de maíz	0,2 (2,2)	0,3 (2,3)	0,1 (1,7)	0,335
Aceite de girasol	2,0 (5,2)	1,9 (5,4)	2,1 (5,1)	0,566
<i>Grasas</i>				
Mantequilla	0,2 (1,0)	0,2 (0,9)	0,2 (1,0)	0,630
Margarina	0,5 (1,5)	0,3 (1,2)	0,6 (1,6)	0,023

*Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar.

Dado que el consumo de alimentos fue significativamente diferente entre hombres y mujeres ($2365,1 \pm 616,0$ y $2109,8 \pm 547$ Kcal; $P=0.001$, respectivamente) se ajustaron los valores por energía. Tras ajustar por energía se perdió la significación para las alubias, jamón, tocino, pescad en salazón, tomate, almendras y aceite de oliva virgen. El resto de resto de variables que presentaron un consumo de alimentos significativamente diferente, después de ajustar las diferencias permanecieron siendo significativas.

Posteriormente los alimentos de características similares se agruparon en nuevas variables resumen, así se crearon nuevas variables:

- Carnes (pollo, ternera, cerdo, cordero, conejo).
- Embutidos (salchichón, chorizo, morcilla, jamón york, jamón serrano, carnes procesadas).

- Lácteos (leches (desnatada, semidesnatada, entera), yogures (desnatado, entero), quesos (blanco, curado, cremoso), helados).
- Pescados frescos (pescado blanco, azul, calamares, almejas, crustáceos).
- Pescados en conserva (enlatados y salazones).
- Verduras y hortalizas (verduras de hoja verde, coles, tomate, zanahoria, judías verdes, berenjenas,, pimientos, espárragos, gazpacho andaluz, cebolla).
- Fruta fresca (cítricos, plátano, pera y manzana, fresas, cerezas y ciruelas, melocotón, albaricoque y nectarina, sandía, melón, kiwi, uvas).
- Frutos secos (almendras, cacahuetes, avellanas, pistachos, piñones, nueces).
- Legumbres (lentejas, alubias, garbanzos).
- Cereales (pan blanco e integral, cereales de desayuno (normales, integrales), arroz, pasta).
- Aceites y grasas (aceite de oliva virgen, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soja, margarina, mantequilla, manteca de cerdo).

Analizando las diferencias para los grupos de alimentos y el sexo, se observó, al igual que por alimentos, diferencias significativas para los lácteos, siendo las mujeres las mayoritarias en su consumo ($18,1 \pm 8,1$ vs $15,7 \pm 7,7$ veces/semana (v/s); $P < 0,001$). Asimismo, por sexo, los hombres consumieron más alimentos del grupo de carnes, embutidos, legumbres, cereales ($6,0 \pm 2,9$ vs $5,5 \pm 3,0$ v/s, $P = 0,039$; $5,2 \pm 3,7$ vs $4,4 \pm 3,4$ v/s, $P = 0,001$; $2,3 \pm 1,3$ vs $2,1 \pm 1,1$ v/s, $P = 0,012$; $15,8 \pm 8,1$ vs $14,5 \pm 7,2$ v/s, $P = 0,018$, respectivamente).

4.2.3.2 CONSUMO DE ALIMENTOS POR EDAD

Tomando como criterio la media de edad de la población ($67,3 \pm 6,2$) se dividió a la misma en dos grupos. Sujetos con edad menor a 67,3 años y mayor o igual a 67,3 años que podrían tener un consumo de alimentos diferente. Así, se realizó un análisis de comparación de frecuencias de consumo mediante t de Student y se obtuvieron los valores de la significación indicativos de las diferencias de medias existentes entre grupos ($p < 0,05$). En la tabla 4.14 se muestra la frecuencia de consumo semanal de aquellos alimentos para los que se obtuvieron diferencias significativas entre grupos de edad tras el análisis de comparación de medias. No se

observaron diferencias significativas de consumo energético entre los dos grupos (<67,3 años $2205,8 \pm 549,4$ y >67,3 años $2161,2 \pm 616,0$ Kcal; $P=0,344$). Los individuos mayores de 67,3 años tuvieron una frecuencia de consumo mayor de leche entera y galletas tipo maria que los menores ($P<0,001$ y $P=0,014$). Sin embargo, el grupo de menor edad mostró una frecuencia de consumo significativamente menor de huevos, ternera, cerdo, cordero, jamón serrano, gazpacho andaluz y patatas fritas que los de mayor edad (Tabla 4.14).

Tabla 4.14 Frecuencia de consumo de alimentos semanal entre los individuos de edad inferior a 67,3 o mayor o igual a 67,3 años.

Alimentos	<67,3 años	≥ 67,3 años	P
	Media (DT)	Media (DT)	
Leche entera	0,8 (2,8)	1,7 (4,0)	<0,001
Huevos	2,3 (1,5)	2,1 (1,1)	0,013
Ternera	0,9 (1,2)	0,6 (0,8)	<0,001
Cerdo	0,7 (1,1)	0,5 (0,7)	0,004
Cordero	0,6 (0,8)	0,4 (0,6)	0,002
Jamón serrano	2,3 (2,0)	2,1 (2,0)	0,051
Gazpacho andaluz	0,5 (1,1)	0,3 (0,8)	0,020
Patatas fritas	0,6 (0,9)	0,5 (0,7)	0,024
Galletas	2,1 (4,2)	2,9 (6,1)	0,014

**Se empleó la prueba T de Student para comparar medias.DT: desviación estándar*

4.2.3.3 CONSUMO DE ALCOHOL

En la tabla 4.15 se detalla la frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas en la población PREDIMED.

Tabla 4.15 Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas entre semana por sexo en la población PREDIMED.

Frecuencia de consumo	Total (n=945) Media(DT)	Hombres (n=340) Media (DT)	Mujeres (n=605) Media (DT)	P
<i>Una caña de cerveza</i>	0,8 (2,0)	1,5 (3,0)	0,4 (1,1)	<0,001
<i>Un vaso de vino blanco</i>	0,1 (1,3)	0,2 (2,1)	0,03(0,6)	0,099
<i>Un vaso de vino tinto añejo</i>	0,3 (1,6)	0,5 (2,5)	0,13(0,8)	0,002
<i>Un vaso de vino tinto joven</i>	2,0 (4,5)	3,9 (6,3)	0,9 (2,4)	<0,001
<i>Un vaso de whisky</i>	0,2 (1,1)	0,6 (1,8)	0,01(0,13)	<0,001

P: valor de probabilidad en la comparación entre los grupos; prueba de la t Student

4.2.3.4 ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Para estudiar la adherencia que esta muestra tenía en su alimentación a la dieta mediterránea partimos del cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos (Schröder H et al, 2011). Se comprobó el porcentaje de individuos que había obtenido cada una de las puntuaciones posibles. Así, pudimos comprobar que nuestra muestra tenía un adherencia media a la Dieta Mediterránea, ya que la mayoría de nuestros participantes obtuvieron una puntuación entre 7 (15,3%), 8 (19,9%) y 9 (18,3%) puntos. Ninguno de los participantes obtuvo una puntuación inferior a 3 puntos. Posteriormente, dividimos a la población en 4 grupos según la adherencia a la dieta mediterránea. Estos 4 grupos se realizaron en función de la puntuación alcanzada, y aunque no representaron verdaderos cuartiles estadísticos, utilizamos la denominación de cuartil (Q) para referirnos a cada uno de ellos. Así, el Q1 comprendía aquellos individuos que tenían una adherencia a la dieta mediterránea entre 3-6 puntos (15,6%), adherencia baja. El Q2, formado por aquellos individuos que habían obtenido entre 7 y 8 puntos (adherencia media) (35,2 %). El Q3, formado por aquellos individuos que habían obtenido entre 9-10 puntos, adherencia media-alta, donde se encontraban el 32,6% de la muestra de estudio y por último el Q4 para aquellos que habían obtenido una puntuación 11-14 puntos, de mayor adherencia a la dieta mediterránea adherencia alta (16,6%). (Figura 4.2).

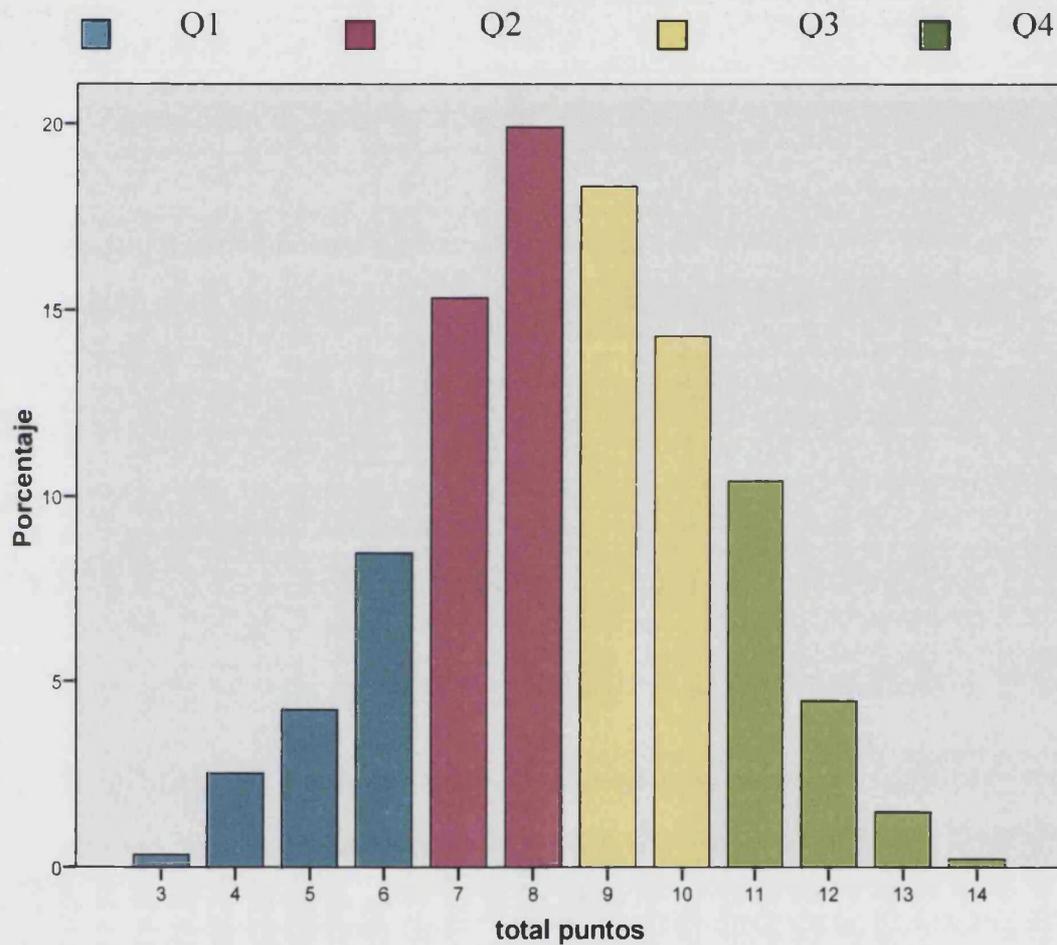


Figura 4.2 Porcentaje de individuos que han obtenido cada una de las puntuaciones posibles con el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos. División por cuartiles.

A continuación estudiamos la relación que había entre la adherencia a la dieta mediterránea y factores de riesgo cardiovascular (obesidad, diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia). En la tabla 4.16 se muestra el porcentaje de individuos que se adhieren más o menos a la dieta mediterránea teniendo en cuenta la condición de obesidad o diabetes.

Se observa que aquellos individuos que no tenían obesidad presentaban mayor adherencia a la dieta mediterránea que los que sí. Esta diferencia fue más notable para los individuos que se encontraban en el Q3 y Q4 de mayor adherencia a la dieta mediterránea. Valores similares se observaron en el caso de la diabetes.

Tabla 4.16 Porcentaje de individuos que se adhieren más o menos a la dieta mediterránea teniendo en cuenta la condición de obesidad o diabetes.

		Q1	Q2	Q3	Q4	P*	P**
Obesidad (%)	si	62,5	55,9	49,3	38,5	<0,001	<0,001
	no	37,5	44,1	50,7	61,5		
Diabetes (%)	si	54,4	53,4	47,0	37,9	0,009	0,001
	no	45,6	46,6	53,0	62,1		

*Se empleó el test de Chi- Cuadrado para las comparaciones. ** P de tendencia lineal

4.2.3.5 CONSUMO DE ALIMENTOS Y OBESIDAD, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

4.2.3.5.1 CONSUMO DE ALIMENTOS

Para analizar la correlación entre el consumo de alimentos y la concentración de triglicéridos y parámetros relacionados se empleó el análisis de correlaciones bivariadas con el test de Spearman.

En la tabla 4.17 se presentan las correlaciones obtenidas para el consumo de alimentos (veces por semana) y concentraciones de triglicéridos así como fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular relacionados en la población general. Se obtuvieron correlaciones negativas entre el consumo de lácteos y verduras y hortaliza y las concentraciones de triglicéridos ($\rho = -0,081$; $p = 0,018$ y $\rho = -0,126$; $p = 0,001$, respectivamente). También los frutos secos y las legumbres se correlacionaron negativamente con el IMC ($-0,106$; $p = 0,002$).

Tras realizar el análisis estratificado por sexo, se siguió manteniendo la correlación negativa entre el consumo de verduras y hortalizas y las concentraciones de triglicéridos en hombres ($\rho = -0,220$; $p = 0,001$); en el caso de las mujeres se observó una tendencia a la significación ($\rho = -0,070$; $p = 0,099$). Asimismo, de manera similar a lo que ocurre en la población general las mujeres también presentaron una correlación negativa entre el consumo de frutos secos y legumbres y el IMC ($\rho = -0,156$; $p = 0,001$ y $\rho = -0,106$; $p = 0,012$; respectivamente).

Tabla 4.17 Correlaciones entre el consumo de alimentos en veces por semana y las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la población general.

	TG (mg/dL)		IMC (Kg/m ²)	
	ρ	P	ρ	P
Lácteos	-0,081	0,018	0,067	0,051
Carnes	0,009	0,796	0,044	0,198
Embutidos	0,039	0,256	0,026	0,451
Pescado	-0,023	0,504	-0,021	0,532
Verduras y hortalizas	-0,126	0,001	-0,051	0,136
Frutas	-0,023	0,304	0,005	0,875
Frutos secos	-0,035	0,304	-0,097	0,004
Legumbres	-0,011	0,745	-0,106	0,002
Cereales	0,029	0,392	0,023	0,494
Aceites	0,013	0,702	0,054	0,112

ρ : coeficiente de correlación (rho de Spearman). P valor, significación estadística $P < 0,05$ IMC: índice de masa corporal, TG: triglicéridos.

Se consideró estudiar la asociación entre la frecuencia de consumo de grupos de alimentos y factores de riesgo cardiovascular además de la obesidad y hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, la diabetes, hipertensión. No se obtuvieron diferencias significativas para la hipertensión, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. No obstante, se obtuvieron resultados significativos entre algunos grupos de alimentos y la obesidad o la diabetes. El consumo de energía entre los obesos y no obesos no fue significativamente diferentes (no: 2196 ± 564 ; si: $2199,1 \pm 604,9$ Kcal; $P=0,944$) Las tablas 4.18 y 4.19 muestran la frecuencia de consumo de algunos grupos de alimentos, aquellos que mostraron diferencias significativas o cerca de la significación, entre tener o no obesidad o diabetes y la frecuencia de consumo de grupos de alimentos específicos. Así, se observó que los obesos consumían más alimentos del grupo de lácteos que los que no eran obesos ($P=0,021$). En cambio, los no obesos tenían un consumo mayor de verduras y hortalizas ($P=0,053$), frutos secos ($P=0,097$), y chocolates ($P=0,029$). Realizando un análisis por sexo se vio que los hombres obesos consumían más embutidos y aceites y grasas que los que no ($5,7 \pm 3,7$ vs $4,8 \pm 3,7$ v/s, $P=0,043$ y $29,8 \pm 13,2$ vs $26,0 \pm 13,5$ v/s, $P=0,016$ respectivamente). En el grupo de las mujeres, aquellas que presentaban un consumo mayor de alimentos del grupo de lácteos eran obesas ($18,7 \pm 8,1$ vs $17,3 \pm 7,6$ v/s; $P=0,049$).

Tabla 4.18 Comparación de la frecuencia de consumo (veces/semana) de alimentos en una muestra que presenta o no obesidad.

Grupo de alimentos	No obeso	Obeso	p*
	Media (DT)	Media (DT)	
Lácteos	16,6 (7,8)	17,8 (8,3)	0,021
Verduras y hortalizas	26,8 (11,2)	25,4 (9,7)	0,053
Frutos secos	2,5 (3,3)	2,1 (3,4)	0,097
Chocolate	0,5 (1,4)	0,3 (1,0)	0,029

* P: valor P en la comparación de las correspondientes variables entre hombres y mujeres. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar.

Por otro lado, los individuos que presentaban diabetes tenían un consumo menor de pescados frescos ($P < 0,001$), carnes ($P = 0,049$), legumbres ($0,035$) y frutos secos ($0,052$) que los que no presentaban diabetes mientras que mostraron un consumo mayor de carnes ($P = 0,049$). En el análisis por sexo, los hombres diabéticos presentaron un menor consumo de legumbres ($2,2 \pm 1,0$ vs $2,5 \pm 1,6$ v/s, $P = 0,049$) y tanto los hombres como las mujeres diabéticas mostraron una frecuencia de consumo menor de pescado fresco ($3,8 \pm 2,1$ vs $4,5 \pm 2,6$ v/s, $P = 0,005$ para los hombres y $3,8 \pm 1,9$ vs $4,3 \pm 2,3$ v/s, $P = 0,006$ para las mujeres). El consumo de energía entre diabéticos y no diabéticos fue significativamente diferente, de manera que los no diabéticos presentaron un consumo superior de energía ($2266,8 \pm 556,9$ Kcal vs diabéticos: $2129,9 \pm 608,9$ Kcal; $P = 0,001$). Tras ajustar el consumo por energía, las legumbres y las carnes perdieron la significación ($P = 0,210$ y $P = 0,121$ respectivamente).

Tabla 4.19 Comparación de la frecuencia de consumo de alimentos (veces/semana) en una muestra que presenta o no diabetes.

Grupo de alimentos	No diabético	Diabético	p
	Media (DT)	Media (DT)	
Carnes	5,9 (3,2)	5,5 (2,6)	0,049
Pescados frescos	4,4 (2,4)	3,8 (2,0)	<0,001
Legumbres	2,2 (1,4)	2,1 (1,0)	0,035
Frutos secos	2,5 (3,4)	2,1 (3,3)	0,052
Chocolate	0,5 (1,5)	0,3 (1,0)	0,006

P: valor *P* en la comparación de las correspondientes variables entre hombres y mujeres. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar.

4.2.3.5.2 CONSUMO DE VINO, CERVEZA Y OTRAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

En la tabla 4.20 se presentan las correlaciones obtenidas para el consumo de bebidas y algunos fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular. Se encontró una correlación negativa entre el consumo de vino tinto (agrupado como consumo de vino tinto joven y consumo de vino tinto añejo) y el IMC ($\rho=-0,138$; $P=0,001$)

Tabla 4.20 Correlaciones entre el consumo de bebidas en veces por semana y fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular en la población general.

	TG (mg/dL)		IMC (Kg/m ²)	
	ρ	<i>P</i>	ρ	<i>P</i>
Vino tinto	0,21	0,551	-0,138	0,001
Cerveza	0,004	0,918	-0,048	0,187
Otras bebidas alcohólicas	0,036	0,298	-0,093	0,007

ρ : coeficiente de correlación (*rho* de Spearman). *P* valor, significación estadística $P<0,05$. IMC: índice de masa corporal, TG: triglicéridos.

Aunque en la población general no se obtuvo una correlación significativa para el consumo de vino tinto y las concentraciones de HDL-C, al estratificar por sexo, tanto en hombres como en mujeres se observó una correlación positiva entre el consumo de vino tinto y el HDL (hombres: $r=0,195$; $P<0,001$; mujeres: $\rho=0,092$; $=0,032$).

Por otro lado, en esta población se observa un patrón de consumo mixto en el sentido de que existe una correlación positiva entre el consumo de vino, cerveza y

otras bebidas alcohólicas (licores y destilados) (correlación entre el consumo de vino tinto y cerveza: $\rho=0,276$, $P=0,001$; correlación entre el consumo de vino tinto y otras bebidas alcohólicas: $\rho=0,196$; $P<0,001$).

4.2.4 ESTUDIO GENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS ASOCIACIONES

4.2.4.1 ESTUDIO DE PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN LA POBLACIÓN GENERAL.

4.2.4.1.1 PREVALENCIA DE LOS GENOTIPOS

A partir de los resultados obtenidos mediante las técnicas de análisis de polimorfismos descritas en el apartado 3 de material y métodos, se realizó un estudio de prevalencia para cada una de las variantes de los polimorfismos estudiados. En la tabla 4.21 y 4.22 se muestran las prevalencias de los polimorfismos en los genes estudiados tanto de manera global como por sexo.

Tabla 4. 21 Frecuencia genotípica de los polimorfismos en genes implicados en parámetros antropométricos y relacionados.

SNP	Genotipo	Total n, (%)	Hombres n, (%)	Mujeres n, (%)	p*	P*
<i>SSTR2</i> rs1466113	GG	375 (40,4)	128 (39,5)	238 (40,8)	0,893	0,988
	GC	430 (46,3)	154 (47,5)	268 (45,9)		
	CC	123 (13,3)	42 (13,0)	78 (13,4)		
<i>FAIM2</i> rs7138803	GG	396 (44)	138 (42,3)	259 (44,7)	0,821	0,623
	GA	397 (10,8)	148 (46,7)	248 (42,8)		
	AA	107 (11)	35 (11)	72 (12,4)		
<i>TMEM18</i> rs7561317	AA	34 (3,8)	9 (2,8)	25 (4,4)	0,973	0,662
	AG	271 (30,2)	102 (31,9)	166 (28,9)		
	GG	593 (66)	209 (65,3)	383 (66,7)		
<i>NEGR1</i> rs2568958	AA	400 (44,6)	151 (46,5)	248 (43,7)	0,305	0,764
	AG	395 (44)	141 (43,4)	252 (44,2)		
	GG	102 (11,4)	33 (10,2)	69 (12,1)		

<i>SCD1</i> rs2167444	TT	668 (70,5)	227 (71)	418 (70,1)	0,768	0,08
	TA	264 (27,8)	92 (27,5)	168 (28,2)		
	AA	16 (1,7)	5 (1,5)	10 (1,7)		
<i>SCD1</i> rs508384	CC	653 (68,4)	235 (70,6)	405 (67,8)	0,401	0,3
	CA	278 (29,1)	91(27,3)	178 (29,8)		
	AA	23 (2,4)	7 (2,1)	14 (2,3)		
<i>SIRT1</i> rs3818292	AA	846 (89)	290 (87,3)	536 (90,1)	0,276	0,537
	AG	103 (10,8)	42 (12,7)	57 (9,6)		
	GG	2 (0,2)	---	2 (0,3)		
<i>SIRT1</i> rs7069102	GG	355 (47,5)	117 (45,7)	238 (48,5)	0,399	0,447
	GC	327 (43,7)	114 (44,5)	212 (43,2)		
	CC	66 (8,8)	25 (9,8)	41 (8,4)		
<i>APOA2</i> rs5085	TT	407 (40,8)	124 (37,1)	253 (43,2)	0,088	0,12
	TC	442 (44,3)	152 (44,1)	257 (43,9)		
	CC	148 (14,8)	58 (17,1)	76 (13)		
<i>IKKE</i> rs1702011 2	AA	836 (93,9)	298 (94,6)	535 (93,7)	0,54	0,218
	AC	52 (5,8)	17 (5,4)	34 (6)		
	CC	2 (0,2)		2 (0,4)		
<i>IKKE</i> rs1086343 0	GG	623 (70,5)	228 (70,8)	393 (70,4)	0,985	0,798
	GT	237 (26,8)	85 (26,4)	150 (26,9)		
	TT	24 (2,7)	9 (2,8)	15 (2,7)		
<i>IKKE</i> rs3748022	CC	524 (53,9)	137 (43,1)	231 (41,9)	0,946	0,869
	CT	312 (32,1)	135 (42,5)	239 (43,4)		
	TT	45 (4,6)	46 (14,5)	81 (14,7)		
<i>IKKE</i> rs10863389	CC	370 (42,4)	190	332 (59,2)	0,865	0,051
	CT	375 (43)	109	202 (36)		
	TT	127 (46)	17	27 (4,8)		

* Valor de P obtenido mediante la prueba T de Student para comparar medias entre hombres y mujeres **Valor de P obtenido mediante un test χ^2 , al comparar las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo.

Tabla 4.22 Frecuencia genotípica de los polimorfismos en genes implicados en el metabolismo lipídico.

SNP	Genotipo	Total n, (%)	Hombres n, (%)	Mujeres n, (%)	P*	P**
<i>APOA5</i> -1131T>C	TT	794 (86,5)	271 (84,7)	503 (87,5)	0,173	0,814
	CT	120 (13,1)	46 (14,4)	71 (12,3)		
	CC	4 (0,4)	3 (0,9)	1 (0,2)		
<i>APOA5</i> S16W	SS	837 (87,5)	297 (88,9)	520 (87,0)	0,576	0,814
	SW	115 (12)	36 (10,8)	74 (12,4)		
	WW	5 (0,5)	1 (0,3)	4 (0,7)		
<i>GCK</i> 30G>A	GG	598 (64,6)	205 (63,7)	380 (65,5)	0,594	0,144
	GA	300 (32,4)	105 (32,6)	185 (31,9)		
	AA	27 (2,9)	12 (3,7)	15 (2,6)		
<i>GCKR</i> P446L	PP	284 (29,6)	111 (32,9)	166 (27,8)	0,099	0,382
	PL	488 (50,9)	171 (50,7)	305 (51,0)		
	LL	187 (19,5)	55 (16,3)	127 (21,2)		
<i>SERPINE</i> rs6950982	AA	566 (60,5)	204 (61,4)	357 (60,9)	0,09	0,667
	AG	320 (34,2)	104 (31,3)	205 (35,0)		
	GG	49 (5,2)	24 (7,2)	24 (4,1)		

* Valor de P obtenido mediante la prueba T de Student para comparar medias entre hombres y mujeres **Valor de P obtenido mediante un test χ^2 , al comparar las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo.

4.2.4.1.2 FRECUENCIA ALÉLICA DE LAS VARIANTES ESTUDIADAS

En las siguientes tablas (4.23, 4.24) se muestra la frecuencia alélica e intervalo de confianza de los polimorfismos estudiados en la población de PREDIMED.

Tabla 4.23 Frecuencia alélica en los polimorfismos de genes implicados en parámetros antropométricos en la población de PREDIMED.

SNP	Alelo	Frecuencia alélica y 95 % IC
<i>SSTR2</i> rs1466113	G	0,64 (0,61-0,66)
	C	0,36 (0,34-0,39)
<i>FAIM2</i> rs7138803	G	0,66 (0,64-0,68)
	A	0,34 (0,32-0,36)
<i>TMEM18</i> rs7561317	A	0,21 (0,18-0,22)
	G	0,80 (0,78-0,82)
<i>NEGR1</i> rs2568958	A	0,66 (0,64-0,68)
	G	0,33 (0,31-0,35)
<i>SCD1</i> rs2167444	T	0,84 (0,82-0,86)
	A	0,16 (0,14-0,17)
<i>SCD1</i> rs508384	C	0,83 (0,81-0,82)
	A	0,17 (0,15-0,19)
<i>SIRT1</i> rs3818292	A	0,94 (0,93-0,95)
	G	0,056 (0,04-0,07)
<i>SIRT1</i> rs7069102	G	0,69 (0,67-0,71)
	C	0,31 (0,29-0,32)
<i>APOA2</i> rs5085	T	0,63 (0,62-0,64)
	C	0,37 (0,36-0,38)
<i>IKKE</i> rs17020112	A	0,97 (0,95-0,99)
	C	0,03 (0,01-0,05)
<i>IKKE</i> rs10863430	G	0,84 (0,82-0,86)
	T	0,16 (0,14-0,18)
<i>IKKE</i> rs3748022	C	0,77 (0,75-0,79)
	T	0,23 (0,21-0,25)
<i>IKKE</i> rs10863389	G	0,64 (0,62-0,66)
	G	0,36 (0,34-0,38)

IC: Intervalo de confianza

Tabla 4.24 Frecuencia alélica en los polimorfismos de genes implicados en el metabolismo lipídico en la población de PREDIMED

SNP	Alelo	Frecuencia alélica y 95 % IC
<i>APOA5</i> (-1131T>C)	T	0,93 (0,92-0,94)
	C	0,07 (0,06-0,08)
<i>APOA5</i> (S16W)	S	0,94 (0,92-0,95)
	W	0,06 (0,05-0,07)
<i>GCK</i> -30G>A	G	0,81 (0,79-0,83)
	A	0,19 (0,17-0,21)
<i>GCKR</i> P446L	P	0,55 (0,53-0,57)
	L	0,45 (0,43-0,47)
<i>SERPINE</i> rs6950982	A	0,78 (0,76-0,80)
	G	0,22 (0,20-0,24)

IC: Intervalo de confianza

4.2.4.2 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

4.2.4.2.1 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs1466113 DEL GEN *SSRT2* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

La tabla 4.25 muestra la asociación del polimorfismo rs1466113 del gen *SSTR2* con variables antropométricas y obesidad en la muestra de población general y por sexo. Se decidió crear un modelo recesivo para el rs1466113 del gen *SSTR2*. Así, se establecieron dos grupos, por un lado los homocigotos para el alelo común (o ancestral) y los heterocigotos (GG y GC) y por otro lado, los homocigotos mutados (CC).

Se observa que los portadores de la variante mutada en homocigosis tienen menores valores de IMC ($29,9 \pm 4,5$ Kg/m²; P=0,037), peso ($75,1 \pm 10,5$ Kg; P=0,039) que los no portadores.

Tabla 4.25 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs1466113 del gen *SSRT2*.

Variable		rs1466113		P*
		GG/GC Media(DT)	CC Media(DT)	
Peso (kg)	Hombres	81,7 (12,1)	77,4 (8,9)	0,032
	Mujeres	75,4 (12,3)	73,9 (11,1)	0,303
	Total	77,7 (12,6)	75,1 (10,5)	0,039
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	0,629
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,55 (0,05)	0,148
	Total	1,58 (0,08)	1,58 (0,07)	0,592
IMC (Kg/m²)	Hombres	29,6 (4,1)	28,4 (3,2)	0,098
	Mujeres	31,8 (5,2)	30,7 (4,8)	0,099
	Total	31,0 (4,9)	29,9 (4,5)	0,032
Cintura (cm)	Hombres	105,7 (11,7)	101,7 (7,9)	0,039
	Mujeres	103,7 (12,1)	102,9 (10)	0,564
	Total	104,5 (12,0)	102,5 (9,3)	0,095
Cadera (cm)	Hombres	110,7 (11,8)	109,8 (5,7)	0,858
	Mujeres	114,3 (12,2)	113,7 (9,0)	0,863
	Total	113,2 (12,1)	112,2 (8,0)	0,754

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Al analizar las asociaciones del polimorfismo por sexo se observaron diferencias estadísticamente significativas. Así, los hombres portadores de la variante mutada en homocigosis presentaban valores significativamente menores de cintura ($101,7 \pm 7,9$ cm; $P=0,039$) y peso ($77,4 \pm 8,9$ Kg; $P=0,032$). Estas diferencias no se observaron en el caso de las mujeres.

Posteriormente analizamos las asociaciones entre el polimorfismo de estudio y los factores de riesgo cardiovascular. Se observaron asociaciones

significativas para la obesidad ($P=0,027$) (Tabla 4.26). Asimismo, el riesgo de obesidad también fue menor en los homocigotos CC (Tabla 4.27).

Tabla 4.26 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.

Variable		rs1466113		P*	P**
		GG/GC (%)	CC (%)		
Sobrepeso	Sí	86,9	84,5	0,682	0,611
	No	13,1	15,5		
Obesidad	Sí	54,1	42,6	0,027	0,022
	No	45,9	57,4		

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral. **P de tendencia lineal.

Tabla 4.27 Riesgo de obesidad asociado con el polimorfismo rs1466113 en el gen SSTR2. Estimaciones en crudo y ajustadas para hombres y mujeres.

SSTR2(rs1466113)	OR	IC 95%	P
<i>Crudo</i>			
GG+GC (ref.)	1		
CC	0.631	0.424-0.938	0.023
<i>Ajustado por sexo y edad</i>			
GG+GC (ref.)	1		
CC	0.627	0.419-0.937	0.023
<i>Ajustado por sexo, edad, ADM, Tabaco diabetes y medicacion</i>			
GG+GC(ref.)	1		
CC	0.6	0.383-0.940	0.026

OR: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; AMD: Adherencia a la Dieta Mediterranea.

4.2.4.2.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs7138803 DEL GEN FAIM2 Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

La tabla 4.28 muestra la asociación del polimorfismo rs7138803 del gen FAIM2 con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

Se creó un modelo recesivo ya que se ajustaba mejor al patrón de herencia para estas variables. Así, se establecieron dos grupos, por un lado los homocigotos para el alelo común (o ancestral) y los heterocigotos (GG y GA) y por otro lado, los homocigotos mutados (AA).

No se observan diferencias significativas para ninguna variable. Sin embargo, encontramos diferencias en cuanto a la energía consumida, de tal manera que los homocigotos mutados AA presentaron un menor consumo de energía que los GG+GA tras ajustar por edad y sexo (AA: 2107,5±605,3 kcal vs GG+GA: 2258,3±658; p=0,045).

Tabla 4.28 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs7138803 del gen *FAIM2*.

Variable	rs7138803		P*	
	GG+GA Media (DT)	AA Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81,3 (11,7)	78,1 (11,9)	0,126
	Mujeres	75,4 (12)	74 (13,3)	0,450
	Total	77,5 (12,2)	75,5 (12,9)	0,110
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,65 (0,06)	0,263
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,53 (0,06)	0,229
	Total	1,58 (0,08)	1,57 (0,08)	0,095
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,5 (3,9)	28,7 (3,9)	0,246
	Mujeres	31,7 (5,2)	31,6 (5,4)	0,879
	Total	30,9 (4,9)	30,7 (5,1)	0,634
Cintura (cm)	Hombres	105,5 (11,8)	102 (10,3)	0,1
	Mujeres	114,6 (12,4)	116,5 (11,2)	0,836
	Total	104,3 (11,9)	102,9 (11,5)	0,255
Cadera (cm)	Hombres	110,2 (11,4)	107,5 (13,3)	0,622
	Mujeres	114,6 (12,4)	116,5 (11,2)	0,653
	Total	113,2 (12,2)	113,3 (12,3)	0,971

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

En la tabla 4.29 se presentan las diferencias en porcentaje para la obesidad y sobrepeso en función el genotipo. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4.29 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.

Variable		rs7138803 (<i>FAIM2</i>)		P*
		GG+GA (%)	AA (%)	
Obesidad	Sí	52,7	52,9	0,529
	No	47,3	47,1	
Sobrepeso	Sí	86,9	80,9	0,125
	No	13,1	19,1	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

4.2.4.2.3 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs7561317 DEL GEN *TMEM18* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

La tabla 4.30 muestra la asociación del polimorfismo rs7561317 del gen *TMEM18* con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

Se observa que los homocigotos AA presentan significativamente menores valores de cintura que los GG y GA ($p=0,030$) tanto en hombres como en mujeres ($p=0,012$; $p=0,047$ respectivamente) (Figura 4.3).

Tabla 4.30 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs7561317 del gen *TMEM18*.

Variable	rs7561317 (<i>TMEM18</i>)			P*	
	GG Media (DT)	GA Media (DT)	AA Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81,3 (12)	80, (11,3)	82,3 (12,3)	0,621
	Mujeres	75,5 (12,1)	75,1 (12,2)	72,1 (11,2)	0,403
	Total	77,5 (12,4)	77 (12,1)	74,8 (12,1)	0,412
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	0,921
	Mujeres	1,55 (0,07)	1,54 (0,06)	1,54 (0,06)	0,904
	Total	1,58 (0,08)	1,59 (0,08)	1,58 (0,08)	0,707
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,5 (4)	28,9 (3,7)	29,9 (4,5)	0,328
	Mujeres	31,8 (5,4)	31,6 (4,9)	30,1 (4,2)	0,251
	Total	31 (5,1)	30,6 (4,7)	30,1 (4,2)	0,328
Cintura (cm)	Hombres	106,5 (12,7)	102,1 (8,8)	104,6 (13,3)	0,012
	Mujeres	103,9 (11,6)	104,3 (12,4)	98,1 (11,6)	0,047
	Total	104,8 (12)	103,5 (11,2)	99,8 (12,2)	0,030
Cadera (cm)	Hombres	108,5 (11,3)	109,1 (10,6)	117,2 (8,8)	0,548
	Mujeres	114,9 (12,7)	114,9 (11,8)	109,7 (5,8)	0,710
	Total	112,8 (12,5)	112,8 (12,5)	112,2 (7,1)	0,981

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

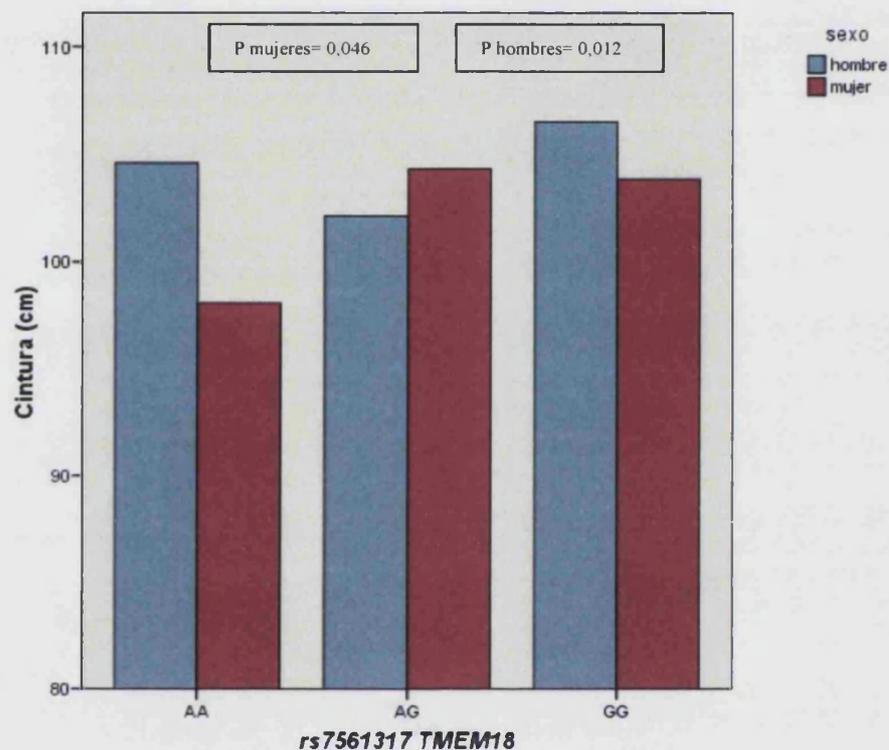


Figura 4.3 Asociación del polimorfismo rs7561317 del gen *TMEM18* con valores de cintura según sexo.

Posteriormente, tras ajustar la cintura por edad, sexo actividad física, diabetes, hipertensión y tabaco las diferencias siguieron siendo significativas, siendo los homocigotos AA los que menores valores presentaron ($p=0,002$). Aunque tras ajustar, el peso y el IMC fue también inferior en los homocigotos AA, las diferencias no llegaron a ser significativas ($p=0,214$ y $p=0,115$ respectivamente).

Finalmente, analizamos las asociaciones entre el polimorfismo de estudio y sobrepeso y obesidad (Tabla 4.31). No se observaron diferencias significativas.

Tabla 4.31 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo.

Variable		rs7561317 (<i>TMEM18</i>)			P*
		GG (%)	GA (%)	AA (%)	
Sobrepeso	Sí	86,7	83,5	89,5	0,577
	No	13,3	16,5	10,5	
Obesidad	Sí	52,2	53	51,5	0,971
	No	47,8	47	48,5	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

4.2.4.2.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs2568958 DEL GEN *NEGR1* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En la tabla 4.32 se muestra la asociación del polimorfismo rs2568958 del gen *NEGR1* con variables antropométricas la muestra de población general.

Tras el estudio de los descriptivos obtenidos para dicho polimorfismo se decidió establecer un modelo dominante. Así, se establecieron dos grupos, por un lado los homocigotos AA y por otro los heterocigotos y homocigotos mutados (GA+GG).

Se observaron diferencias significativas para el peso, donde los homocigotos AA presentaron valores superiores que los GG+GA (AA: 78,2±12,6 kg vs GG+GA: 76,5±12 kg, P=0,037).

Tabla 4.32 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs2568958 del gen *NEGR1*.

Variable	rs2568958 (<i>NEGR1</i>)			P*
	AA	GG+GA		
	Media (DT)	Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	82,4 (11,5)	79,3 (11,6)	0,017
	Mujeres	75,6 (12,5)	75 (11,9)	0,549
	Total	78,2 (12,6)	76,5 (12)	0,037
Talla (m)	Hombres	1,65 (0,06)	1,66 (0,06)	0,175
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,54 (0,06)	0,735
	Total	1,58 (0,08)	1,59 (0,08)	0,239
IMC (Kg/m²)	Hombres	29,8 (4,1)	28,9 (3,7)	0,031
	Mujeres	31,9(5,4)	31,6 (5,1)	0,471
	Total	31,1 (5)	30,6 (4,8)	0,176
Cintura (cm)	Hombres	106,6 (11,8)	103,7 (11,5)	0,031
	Mujeres	104 (12,5)	103,4 (11,5)	0,568
	Total	105 (12,3)	103,5 (11,5)	0,074
Cadera (cm)	Hombres	113,3 (12,8)	106,5 (9,1)	0,020
	Mujeres	115,1 (12,3)	114,5 (12,4)	0,818
	Total	114,4 (12,5)	112 (12)	0,217

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Al estudiar las asociaciones por sexo se observaron diferencias significativas para el peso, el IMC y la cintura en el caso de los hombres ($p=0,017$, $p=0,031$, $p=0,031$) siendo los homocigotos AA los que mayores valores presentaron.

En la tabla 4.33 se muestran las diferentes prevalencias de sobrepeso y obesidad en función del genotipo. Se observan diferencias significativas para el sobrepeso según la distribución genotípica ($p=0,024$).

Tabla 4.33 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo.

Variable	rs2568958 (NEGRI)		P*
	AA (%)	AG+GG (%)	
Sobrepeso	Sí	89,3	0,024
	No	10,7	
Obesidad	Sí	54	0,115
	No	46	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral. **P de tendencia lineal.

Tras hacer una exploración sobre posibles asociaciones del polimorfismo con otros factores de riesgo cardiovascular observamos que tanto en hombres como en mujeres las prevalencia de hipertensión era superior en los homocigotos AA en comparación con los GA+GG ($p=0,018$ y $p=0,003$, respectivamente para hombres y mujeres).

Finalmente, estimamos el riesgo de obesidad. Se observó, que tras una regresión logística multivariante (ajusta por edad, sexo, tabaco, diabetes y actividad física), los heterocigotos y homocigotos mutados (GA+GG) presentaban menor riesgo de obesidad en comparación con los homocigotos AA (OR: 0,307, IC95% [0,094-0,998]; $P=0,05$).

4.2.4.2.5 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS rs2167444 Y rs508384 DEL GEN SCD1 Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En este apartado se analizarán los polimorfismos rs2167444 y rs508384

Polimorfismo rs216744

La tabla 4.34 muestra la asociación del polimorfismo rs2167444 del gen *SCD1* con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

Se observa que los homocigotos AA presentan menores valores de peso, IMC, cintura que los GG y GA sin ser significativo.

Tabla 4.34 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs2167444 del gen *SCD1*.

Variable	rs2167444		P*	
	GG+GA	AA		
	Media (DT)	Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81,4 (12,2)	79,6 (7,3)	0,791
	Mujeres	75,7 (13,1)	70,9 (13,7)	0,761
	Total	77,5 (12,5)	75,9 (9,8)	0,260
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,70 (0,05)	0,128
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,54 (0,05)	0,974
	Total	1,58 (0,08)	1,59 (0,09)	0,706
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,5 (4,1)	27,3 (2,4)	0,298
	Mujeres	31,8 (5,5)	29,7 (4,4)	0,634
	Total	31 (5,2)	28,9 (4)	0,154
Cintura (cm)	Hombres	105,4 (11,9)	102,2 (12,3)	0,598
	Mujeres	114,1 (12,2)	95,6 (12,3)	0,067
	Total	104,6 (12,1)	98 (12)	0,074
Cadera (cm)	Hombres	109,9 (11,6)	106,5 (10,3)	0,772
	Mujeres	114,1 (12,4)	118 (11,1)	0,296
	Total	113,1 (12,3)	112,2 (8,1)	0,917

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Como el gen *SCD1* está implicado en el metabolismo de lípidos (ver sección de introducción), analizamos la asociación de este polimorfismo con variables lipídicas. Observamos diferencias significativas para las concentraciones de triglicéridos. Los homocigots AA presentaron mayores concentraciones de triglicéridos que los heterocigotos y homocigotos GG (AA: $151,2 \pm 109,4$ mg/dL vs GG+GA: $128,7 \pm 68,1$ mg/dL, $p=0,04$).

Por último, la tabla 4.35 muestra la prevalencia de obesidad y sobrepeso en función del genotipo.

Tabla 4.35 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo.

Variable		rs2167444		P*
		GG+GA (%)	AA (%)	
Sobrepeso	Sí	86,1	71,4	0,258
	No	13,9	28,6	
Obesidad	Sí	53,2	38,5	0,218
	No	46,8	61,5	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral. **P de tendencia lineal.

Polimorfismo rs508384

La tabla 4.36 muestra la asociación del polimorfismo rs508384 del gen *SCD1* con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

La tabla 4.37 muestra el porcentaje de individuos que presenta sobrepeso y obesidad en función del genotipo.

Tabla 4.36 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs508384 del gen *SCD1*.

Variable	<i>rs508384(SCD1)</i>			P*	
	CC	CA	AA		
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81,3 (12,4)	80,8 (11,5)	85,9 (12,9)	0,547
	Mujeres	75,2 (11,6)	75,8 (13,8)	74,9 (9,9)	0,835
	Total	77,4 (12,1)	77,5 (13,2)	78,7 (12)	0,904
Talla (m)	Hombres	1,68 (0,09)	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	0,565
	Mujeres	1,53 (0,05)	1,55 (0,06)	1,54 (0,06)	0,457
	Total	1,58 (0,10)	1,58 (0,08)	1,58 (0,08)	0,992
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,5 (4,1)	29,3 (3,7)	30,4 (4,5)	0,783
	Mujeres	31,7 (4,9)	31,7 (6)	31,6 (2,8)	0,993
	Total	30,9 (4,9)	30,8 (4,7)	31,2 (3,5)	0,963
Cintura (cm)	Hombres	105,3 (11,8)	104,7 (11,4)	109,1 (14,2)	0,618
	Mujeres	103,8 (12,2)	104,2 (12,8)	96,4 (11,3)	0,107
	Total	104,4 (12,1)	104,4 (12,3)	101,1 (13,6)	0,508
Cadera (cm)	Hombres	109,6 (11,1)	110,2 (12,9)	106,5 (13,4)	0,949
	Mujeres	115,5 (10,6)	113,2 (16,1)	113 (7)	0,706
	Total	113,5 (11,1)	113,3 (15)	110,8 (6,2)	0,796

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: *desviación estándar*; IMC: *índice de masa corporal*

Tabla 4.37 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo.

Variable		rs508384 (SCDI)			P*
		CC (%)	CA (%)	AA (%)	
Sobrepeso	Si	85,9	87,3	86,7	0,914
	No	14,1	12,7	13,3	
Obesidad	Si	54,1	47,5	61,9	0,138
	No	45,9	52,5	38,1	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

Analizamos el riesgo de obesidad en función del genotipo para este polimorfismo y observamos que tras un análisis de regresión logística ajustado por varios factores de confusión (edad, sexo, tabaco, actividad física) los individuos con el genotipo CA+AA presentaban un menor riesgo de obesidad que los CC ($p=0,037$) (Tabla 4.38).

De igual modo que en el caso del polimorfismo anterior, analizamos la asociación de este polimorfismo con variables lipídicas. El riesgo de hipertrigliceridemia fue significativamente mas elevado en los portadores de la mutación.

Tabla 4.38 Riesgo de obesidad asociado con el polimorfismo rs508384 en el gen SCDI. Estimaciones en crudo y ajustadas para hombres y mujeres.

Polimorfismo rs508384 (dominante)	OR	95%IC	P
<i>OBESIDAD (ajustado por edad, sexo, fumar, AF)</i>			
CC (ref.)	1		
CA+AA	0,715	0,522-0,981	0,037
<i>HIPERTRIGLICERIDEMIA (ajustado por edad, sexo, fumar, AF, obesidad)</i>			
CC (ref.)	1		
CA+AA	1,427	1,007-2,02	0,045

R: Odds ratio; IC: Intervalo de confianza; AF: Actividad Física

4.2.4.2.6 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS rs3818292 Y rs7069102 DEL GEN *SIRT1* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

Polimorfismo rs3818292

La tabla 4.39 muestra la asociación del polimorfismo rs3818292 del gen *SIRT1* con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

La tabla 4.40 muestra el porcentaje de individuos que presenta sobrepeso y obesidad en función del genotipo.

Tabla 4.39 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs3818292 del gen *SIRT1*.

Variable	<i>rs 3818292 (SIRT1)</i>			P*	
	AA Media (DT)	AG Media (DT)	GG Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81,4 (11,9)	78,1 (9,2)	0,086	
	Mujeres	75,1 (12,3)	77,1 (11,4)	86,9 (19,9)	0,227
	Total	76,4 (12,5)	77,5 (10,5)	86,9 (10)	0,549
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)		0,824
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,55 (0,05)	1,59 (0,03)	0,343
	Total	1,58 (0,08)	1,60 (0,08)	1,59 (0,03)	0,231
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,5 (4)	28,2 (2,7)		0,050
	Mujeres	31,7 (5,2)	32,1 (4,9)	34,2 (6,7)	0,650
	Total	30,9 (4,9)	30,5 (4,6)	34,2 (6,7)	0,476
Cintura (cm)	Hombres	105,9 (12)	100,4 (7,3)		0,006
	Mujeres	103,7 (11,9)	104,2 (12,5)	94	0,688
	Total	104,5 (12)	102,6 (10,7)	94	0,241
Cadera (cm)	Hombres	109,4 (10,9)	105,4 (7,8)		0,469
	Mujeres	114,5 (12,6)	116,1 (9,2)		0,656
	Total	112,8 (12,2)	113,7 (9,9)		0,759

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

No se obtuvieron diferencias significativas tras ajustar por distintos factores de confusión.

Tabla 4.40 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.

Variable	<i>rs3818292 (SIRT1)</i>			P*	
	AA (%)	AG (%)	GG (%)		
Sobrepeso	Sí	86,3	86,8	100	0,919
	No	13,7	13,2	0	
Obesidad	Sí	52,7	47,9	50	0,671
	No	47,3	52,1	50	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral. **P de tendencia lineal.

Polimorfismo rs7069102

La tabla 4.41 muestra la asociación del polimorfismo rs7069102 del gen *SIRT1* con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

La tabla 4.42 muestra el porcentaje de individuos que presenta sobrepeso y obesidad en función del genotipo.

Tabla 4.41 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs7069102 del gen *SIRT1*.

Variable	rs7069102 (<i>SIRT1</i>)			P*	
	GG Media (DT)	GC Media (DT)	CC Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	80,4 (11,6)	80,5 (12,1)	81,8 (12,4)	0,866
	Mujeres	74,7 (12,8)	76,1 (11,6)	77,3 (13,6)	0,33
	Total	76,6 (12,7)	77,6 (11,9)	79,1 (13,2)	0,281
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,65 (0,06)	1,68 (0,07)	0,045
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,54 (0,06)	1,54 (0,05)	0,776
	Total	1,58 (0,09)	1,58 (0,08)	1,59 (0,09)	0,410
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29 (3,9)	29,5 (4)	29,4 (5)	0,637
	Mujeres	31,6 (5,4)	32 (5,1)	32,4 (5,3)	0,586
	Total	30,7 (5,1)	31,1 (4,9)	31,3 (5,4)	0,538
Cintura (cm)	Hombres	105,4 (13,3)	104,3 (10,3)	102,5 (10,9)	0,522
	Mujeres	103,5 (11,7)	103 (11,1)	105,6 (16,6)	0,482
	Total	104,1 (12,3)	103,5 (10,8)	104,4 (14,6)	0,732
Cadera (cm)	Hombres	109,5 (10,3)	108,9 (11,5)	116 (14,6)	0,388
	Mujeres	114,8 (14,2)	114 (10,3)	120 (9,4)	0,516
	Total	113 (13,2)	112,3 (10,9)	117,9 (11,7)	0,298

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Tras realizar un análisis ajustado observamos que los homocigotos mutados (CC) presentaban mayor peso e IMC que los GG y GC pero sin alcanzar la significación estadística (peso: $p=0,132$; IMC: $p=0,099$).

Tabla 4.42 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo

Variable		Rs7069102 (<i>SIRT1</i>) (%)			P*
		GG	GC	CC	
Sobrepeso	Sí	84,4	86,5	84,6	0,815
	No	15,6	13,5	15,4	
Obesidad	Sí	52,3	55,3	52,4	0,724
	No	47,7	44,7	47,6	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

4.2.4.2.7 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs5082 DEL GEN *APOA2* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

Tras hacer un análisis exploratorio observamos que los efectos de este polimorfismo eran recesivos por lo que creamos un modelo recesivo. La tabla 4.43 muestra la asociación del polimorfismo rs5082 del gen *APOA2* con variables antropométricas en la muestra de población general y por sexo.

La tabla 4.44 muestra el porcentaje de individuos que presenta sobrepeso y obesidad en función del genotipo

Tabla 4.43 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs5082 del gen *APOA2*.

Variable		rs5082		P*
		TT+TC Media (DT)	CC Media (DT)	
Peso (kg)	Hombres	80,6 (11,9)	83,4 (11,4)	0,104
	Mujeres	75,3 (12,0)	75,2 (12,3)	0,953
	Total	77,2 (12,2)	78,8 (12,8)	0,168
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	0,774
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,54 (0,06)	0,636
	Total	1,58 (0,08)	1,59 (0,08)	0,556
IMC (Kg/m²)	Hombres	29,2 (3,9)	30,2 (3,9)	0,086
	Mujeres	31,7 (5,0)	31,8 (5,8)	0,898
	Total	30,8 (4,9)	31,1 (5,1)	0,556
Cintura (cm)	Hombres	104,7 (12,0)	107,1 (9,6)	0,173
	Mujeres	103,9 (11,7)	102,0 (13,6)	0,219
	Total	104,2 (11,8)	104,3 (12,2)	0,966
Cadera (cm)	Hombres	108,9 (11,1)	113,7 (12,7)	0,259
	Mujeres	114,5 (10,4)	122,6 (15,8)	0,025
	Total	112,7 (10,9)	118,6 (14,8)	0,034

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Tras ajustar por sexo, edad, tabaco, alcohol, y diabetes el SNP de *APOA2* estuvo asociado con IMC y peso ($p=0,049$ y $p=0,047$ respectivamente). La obesidad no se asoció significativamente con el genotipo CC, tampoco tras el ajuste multivariante (OR: 1.28; IC 95%: 0,83–1,96; $P=0,264$)

Tabla 4.44 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo

Variable		rs5085 (APOA2)		P*
		TT+TC (%)	CC (%)	
Sobrepeso	Sí	85,8	91,9	0,103
	No	14,2	8,1	
Obesidad	Sí	47,7	46	0,398
	No	52,3	54	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

4.2.4.2.8 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS rs17020112, rs10863430, rs3748022 Y rs10863389 DEL GEN IKKE Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En las tabas 4.45, 4.47, 4.47, 4.51 presentamos las principales asociaciones de los polimorfismos rs17020112, rs10863430, rs3748022 y rs10863389 respectivamente con las variables antropométricas en la muestra en la población general y por sexo.

La tablas 4.46, 4.48, 4.50, 4.52 muestran el porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo para cada polimorfismo estudiado en el gen *IKKE*.

Destacamos que el polimorfismo rs17020112, a pesar del escaso número que presentaron la mutación podría ser un gen candidato para el estudio de la obesidad dado que en esta población los individuos homocigotos mutados presentaron estadísticamente mayores niveles de IMC ($p=0,008$). También los homocigotos mutados para el rs10863389 presentaron menor circunferencia de la cintura que los CC y TC ($p=0,042$).

rs17020112

Tabla 4.45 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs17020112 del gen *IKKE*.

Variable	Rs17020112 (<i>IKKE</i>)			P*	
	AA Media (DT)	AC Media (DT)	CC Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81,1 (11,9)	80,5 (10,8)	0,856	
	Mujeres	74,9 (12,1)	78 (12,3)	93,1 (16,1)	0,042
	Total	77,1 (12,4)	78,8 (11,8)	93,1 (16,1)	0,121
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,05)		0,904
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,55 (0,07)	1,50 (0,03)	0,365
	Total	1,58 (0,09)	1,59 (0,08)	1,50 (0,03)	0,338
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,3 (4)	29,4 (3,7)		0,860
	Mujeres	31,5 (5,1)	32,4 (5,7)	41,3 (5,6)	0,022
	Total	30,8 (4,9)	31,6 (5,4)	41,3 (5,6)	0,008
Cintura (cm)	Hombres	105,4 (11,9)	102,6 (10,2)		0,343
	Mujeres	103,4 (11,9)	106,5 (13,2)	118 (9,9)	0,088
	Total	104,1 (12)	105,2 (12,3)	118 (9,4)	0,225
Cadera (cm)	Hombres	109,8 (11,7)	97		0,285
	Mujeres	114,9 (12,6)	111 (5,3)		0,599
	Total	113,2 (12,5)	107,5 (8,2)		0,363

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Tabla 4.46 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.

Variable		<u>rs17020112 (IKKE) (%)</u>			P*
		AA	AC	CC	
Sobrepeso	Sí	84,4	93,1	100	0,404
	No	15,1	6,9	0	
Obesidad	Sí	51,3	56,3	100	0,312
	No	48,8	43,8		

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

rs10863430 IKKE

Tabla 4.47 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs10863430 del gen *IKKE*.

Variable	rs10863430 (<i>IKKE</i>)			P*
	GG	GT+TT		
	Media (DT)	Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	81 (12,2)	80,5 (10,9)	0,745
	Mujeres	75,1 (12,3)	74,9 (12,1)	0,846
	Total	77,3 (12,6)	76,9 (11,9)	0,728
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	0,779
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,55 (0,06)	0,062
	Total	1,58 (0,08)	1,59 (0,08)	0,201
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,4 (4,1)	29,2 (3,7)	0,627
	Mujeres	31,8 (5,4)	31,2 (4,8)	0,193
	Total	31 (5,1)	30,5 (4,5)	0,213
Cintura (cm)	Hombres	105,7 (12,7)	103,7 (9)	0,161
	Mujeres	103,8 (11,7)	103,2 (12,3)	0,581
	Total	104,5 (12,1)	103,4 (11,3)	0,196
Cadera (cm)	Hombres	109,7 (12,4)	110,1 (9,1)	0,905
	Mujeres	115,5 (11,2)	110,9 (15,5)	0,129
	Total	113,6 (11,9)	110,6 (13,3)	0,211

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Tras ajustar los valores de IMC por edad, sexo, actividad física aunque el valor de *p* estuvo mas cerca de la significación estadística no llegó a alcanzarla ($p=0,069$).

Tabla 4.48 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo

Variable		rs10863430 (<i>IKKE</i>)		P*
		GG (%)	GT+TT (%)	
Sobrepeso	Sí	86,2	84,7	0,384
	No	13,8	15,3	
Obesidad	Sí	53,6	48,2	0,088
	No	46,4	51,8	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

En cuanto al riesgo de obesidad, observamos que tras el análisis multivariante ajustado por edad, sexo, tabaco, actividad física y diabetes, los individuos portadores de la mutación GT+TT presentaban menor riesgo de obesidad aunque sin alcanzar la significación estadística (GT+TT: OR, IC 95%: 0,739 [0,521-1,04]; p=0,089)

rs3748022 (IKKE)

Tabla 4.49 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs3748022 del gen *IKKE*.

Variable	rs3748022 (<i>IKKE</i>)			P*
		CC+TC	TT	
		Media (DT)	Media (DT)	
Peso (kg)	Hombres	81,3 (11,6)	77,9 (10,5)	0,248
	Mujeres	75,4 (12,1)	74,5 (11,9)	0,714
	Total	77,5 (75,8)	75,8 (11,4)	0,382
Talla (m)	Hombres	1,58 (0,08)	1,58 (0,09)	0,558
	Mujeres	1,66 (0,06)	1,66 (0,05)	0,929
	Total	1,58 (0,08)	1,58 (0,09)	0,558
IMC (Kg/m²)	Hombres	29,5 (3,8)	28,2 (3,2)	0,187
	Mujeres	31,6 (5,1)	32,3 (6,3)	0,540
	Total	30,9 (4,8)	30,7 (5,7)	0,789
Cintura (cm)	Hombres	105,6 (11,9)	100 (5,8)	0,06
	Mujeres	103,7 (11,9)	106,4 (11,6)	0,234
	Total	104,4 (11,9)	104 (10,3)	0,862
Cadera (cm)	Hombres	110,3 (11,4)	99 (10,1)	0,331
	Mujeres	114,5 (11,7)	118 (6,6)	0,612
	Total	115,1 (11,8)	113,3 (10,9)	0,979

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Tabla 4.50 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo

Variable	rs3748022 (IKKE)		P*
	CC+TC (%)	CC (%)	
Sobrepeso	Sí	86,9	0,165
	No	13,1	
Obesidad	Sí	52,4	0,438
	No	47,6	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

rs10863389 (IKKE)

Tabla 4.51 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs10863389 del gen *IKKE*.

Variable	rs10863389 (IKKE)			P*
		CC+TC Media (DT)	TT Media (DT)	
Peso (kg)	Hombres	80,6 (11,8)	81,1 (11,6)	0,785
	Mujeres	75,1 (12,2)	75,6 (12,3)	0,720
	Total	77,2 (12,3)	77,6 (12,3)	0,7
Talla (m)	Hombres	1,66 (0,06)	1,66 (0,06)	0,850
	Mujeres	1,54 (0,06)	1,54 (0,06)	0,523
	Total	1,58 (0,08)	1,58 (0,08)	0,520
IMC (Kg/m ²)	Hombres	29,3 (4,8)	29,5 (3,3)	0,695
	Mujeres	31,6 (5,2)	32 (5,6)	0,471
	Total	30,8 (4,9)	31,1 (5,1)	0,418
Cintura (cm)	Hombres	104,6 (11)	107,2 (15,3)	0,192
	Mujeres	103,4 (11,9)	105,4 (11,6)	0,179
	Total	103,9 (11,6)	106 (12,9)	0,068
Cadera (cm)	Hombres	109,2 (11,5)	108,2 (12,7)	0,875
	Mujeres	113,9 (12,2)	121,8 (11,9)	0,033
	Total	118,6 (13,1)	112 (12,1)	0,042

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Tabla 4.52 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo

Variable		rs10863389 (IKKE)		P*
		CC+CT (%)	TT (%)	
Sobrepeso	Sí	84,5	90,5	0,116
	No	15,5	9,5	
Obesidad	Sí	51,3	54,5	0,208
	No	48,7	45,5	
Diabetes	Sí	47	56,5	0,032
	No	53	43,5	
Síndrome metabólico	Sí	67,1	77,2	0,014
	No	32,9	22,9	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

No encontramos diferencias significativas para el riesgo de obesidad pero sí para el riesgo de diabetes y síndrome metabólico al hacer un análisis exploratorio tras ajustar por edad, sexo, tabaco, actividad física (Diabetes: TT: OR: 1,702 [1,08-2,7], p=0,021 y Síndrome metabólico: TT: OR: 1,68 [1,07-2,66], p=0,025).

4.2.4.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

4.2.4.3.1 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA APOA5 Y SUS ASOCIACIONES CON CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

Polimorfismo -1131T>C

En la tabla 4.53 se muestra la asociación del polimorfismo -1131T>C con concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la muestra de población general y por sexo. Se decidió hacer agrupaciones de los polimorfismos en no portadores y portadores del alelo menos común (portadores del alelo C) debido al escaso número de personas que presentaban el alelo menos común en homocigosis. Se observaron diferencias significativas para el HDL-C (p<0,019) donde los portadores de C tienen menores valores que los no portadores. Sin

embargo, los portadores de C mostraron valores significativamente más altos de triglicéridos que los no portadores ($148,6 \pm 125,7$ vs $127,9 \pm 68,4$ mg/dL; $P=0,008$).

Para ajustar por posibles factores de confusión, es decir, variables que pueden distorsionar la medida de asociación entre otras dos variables, se realizó un test de regresión lineal múltiple. Se crearon dos modelos. En el primer modelo se ajustaron los triglicéridos por edad, sexo e IMC. Los resultados obtenidos indicaron un valor de p ajustada de 0,007 indicativo de que los portadores del alelo C tenían valores mayores y significativos de triglicéridos. En el segundo modelo, además, se ajustó por tratamiento hipolipemiente y la p ajustada se mantuvo significativa ($P=0,028$). Igualmente, tras ajustar los valores de LDL por edad, sexo, en un primer modelo, por edad, sexo e IMC, en un segundo modelo y por edad, sexo, tratamiento hipolipemiente, en un tercer modelo los valores de p permanecieron significativos sólo en el primer caso ($P=0,028$; $P=0,070$; $P=0,116$, respectivamente). En un análisis exploratorio observamos que el IMC fue estadística y significativamente inferior en los portadores de C en comparación con los TT (TT: $31,1 \pm 5,3$ mg/dL vs CT+CC: $29,9 \pm 4,6$ mg/dL; $p=0,031$).

Tabla 4.53 Valores de las variables lipídicas de la población según los diferentes genotipos.

Variable	Promotor -1131 T>C			
		TT Media(DT)	Portador de C Media(DT)	P*
TG (mg/dL)	Hombres	135,4 (72,7)	150,8 (88,4)	0,197
	Mujeres	124,1 (65,9)	147,8 (147,6)	0,118
	Total	127,9 (68,4)	148,6 (125,7)	0,032
CT (mg/dL)	Hombres	201,7 (37,9)	203,1 (39,6)	0,813
	Mujeres	215,1 (40,3)	205,8 (42,1)	0,070
	Total	210,4 (39,9)	205,1 (41,0)	0,185
HDL-C (mg/dL)	Hombres	48,6 (12,4)	50,1 (12,1)	0,458
	Mujeres	55,9 (14)	54,1 (13,8)	0,310
	Total	53,3 (13,9)	52,7 (13,4)	0,663
LDL-C (mg/dL)	Hombres	125,9 (36,3)	122,9 (39,8)	0,597
	Mujeres	133,9 (35,5)	122,1 (35,6)	0,010
	Total	131,5 (37,3)	122,7 (37,1)	0,019

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; CT: colesterol total.

A continuación se estudió la asociación entre el polimorfismo -1131T>C y algunos factores de riesgo cardiovascular (Tabla 4.54). No se observaron diferencias significativas entre genotipos para variables clínicas.

Tabla 4.54 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo en la población general.

Variables		Promotor -1131 T>C (%)		P*
		TT	Portadores de C	
Hipercolesterolemia	Sí	68,3	73,3	0,332
	No	31,7	26,7	
Hipertigliceridemia	Sí	28,2	36,6	0,233
	No	71,8	63,4	

*Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

Tras hacer el análisis según el sexo, se observó que en el caso de los hombres portadores del alelo C presentaban unas tasas de hipertigliceridemia mayores que los no portadores (42,6% vs 31,8%; P=0,180). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Figura 4.4.A). Resultados similares, se obtuvieron en el caso de presentar hipercolesterolemia en hombres (62,0% no portadores vs 76,6% portadores; P=0,069) (Figura 4.4.B).

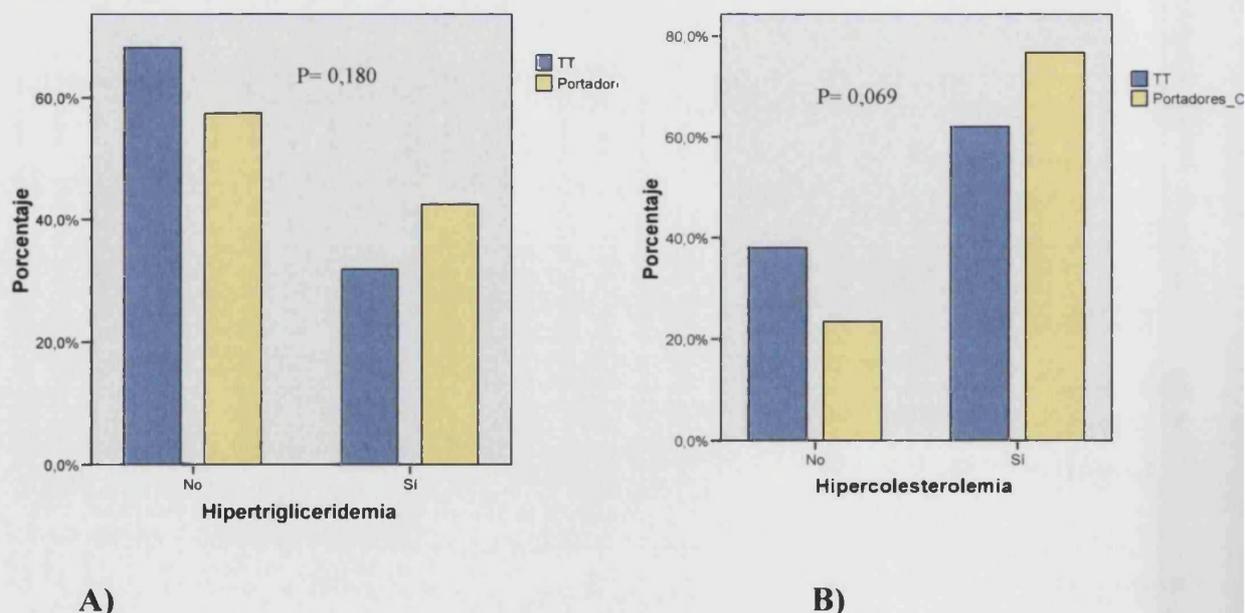


Figura 4.4 A) Porcentaje de individuos con hipertigliceridemia según genotipo en hombres. B) Porcentaje de individuos con hipercolesterolemia según genotipo en hombres.

Polimorfismo S19W

El número de personas homocigotas para la variante W fue bajo. Por ello, decidimos agrupar a los individuos según si eran portadores (SW y WW) o no portadores (SS). En la tabla 4.55 se muestran las principales asociaciones de este polimorfismo con variables lipídicas. Se observa una diferencia significativa entre portadores y no portadores del alelo menos común para HDL-C siendo mayores en los no portadores ($P=0,009$). Se realizó el análisis de asociación estratificado por sexo (Tabla 4.26) y se observó que en mujeres, el polimorfismo S19W no se asociaba con las concentraciones de triglicéridos pero sí en hombres. En hombres, los portadores de la variante mutada, mostraban significativamente mayores concentraciones de triglicéridos ($162,0 \pm 84,8$ mg/dL, $P=0,029$) que los homocigotos no mutados. Las mujeres portadoras del alelo menos común presentaron significativamente menores concentraciones de colesterol total ($203,9 \pm 43,5$ mg/dL, $P=0,038$), HDL-C ($120,6 \pm 36,6$ mg/dL, $P=0,006$), así como menor peso ($72,5 \pm 12,2$ Kg; $P=0,034$) que los no mutados.

Tabla 4.55 Valores de las variables lipídicas de la población según los diferentes genotipos.

Variable		S19W		P*
		SS Media(DT)	Portador de W Media(DT)	
Triglicéridos (mg/dL)	Hombres	133,7 (72,3)	161,9 (84,8)	0,028
	Mujeres	126,7 (81,4)	132,1 (104,6)	0,783
	Total	129,1 (78,1)	141,0 (98,1)	0,327
CT (mg/dL)	Hombres	200,4 (37,7)	200,2 (41,1)	0,973
	Mujeres	214,4 (40,4)	203,9 (43,5)	0,038
	Total	209,2 (40,0)	203,2 (42,5)	0,129
HDL-C (mg/dL)	Hombres	48,9 (12,3)	49,1 (11,4)	0,897
	Mujeres	55,9 (14,2)	55,9 (14,3)	0,937
	Total	53,2 (13,9)	53,9 (13,7)	0,645
LDL-C (mg/dL)	Hombres	124,8 (36,9)	118,6 (33,7)	0,337
	Mujeres	132,9 (35,4)	120,6 (36,6)	0,006
	Total	129,9 (36,1)	120,4 (35,4)	0,009

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; CT: colesterol total.

Posteriormente, y dada la bibliografía al respecto, analizamos las asociaciones del polimorfismo S19W para homocigotos, heterocigotos y homocigotos mutados. Se observó que los homocigotos presentaban concentraciones de triglicéridos inferiores que los heterocigotos y estos que los homocigotos mutados ($129,1 \pm 78,1$ (SS) vs $133,3 \pm 76,5$ (SW) vs $313,4 \pm 277,3$ (WW) mg/dL, (Figura 4.5). Sin embargo, tras aplicar un test no paramétrico, debido al bajo número de casos en el grupo de homocigotos mutados, sólo se mantiene la significación estadística en el caso de los hombres ($P=0,04$) (Tabla 4.56).

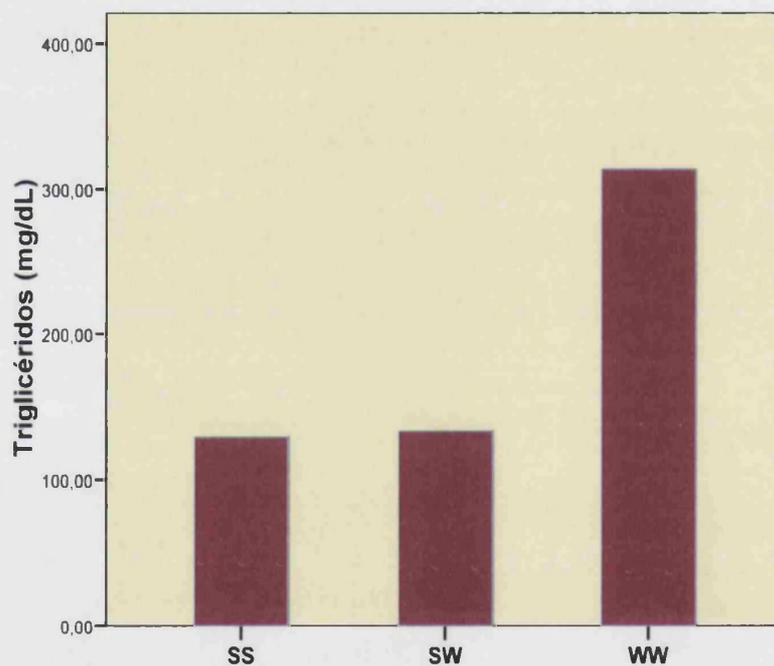


Figura 4.5 Medias estimadas de triglicéridos según el genotipo para el polimorfismo S19W del gen *APOA5*.

Tabla 4.56 Datos de asociación del polimorfismo S19W del gen *APOA5* para la concentración de triglicéridos entre hombres y mujeres.

		SS	SW	WW	P*
		Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
TG(mg/dL)	Hombre	133,7 (72,3)	158,0 (82,5)	304,0 (0,0)	0,040
	Mujer	126,7 (81,4)	121,7 (72,4)	315,7 (320,1)	0,210

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para comparar medias. DT: desviación estándar.

Posteriormente, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para ajustar los triglicéridos por edad, sexo e IMC para el modelo dominante. No se obtuvieron diferencias significativas ($P=0,135$), tampoco tras ajustar por tratamiento hipolipemiente ($P=0,071$).

Por otro lado, los valores de HDL-C inferiores en portadores permanecieron significativos tras ajustar por edad, sexo e IMC ($P=0,003$) y también por tratamiento hipolipemiente ($P=0,001$).

A continuación, se estudiaron las asociaciones entre el polimorfismo S19W y algunos factores de riesgo cardiovascular. (Tabla 4.57). No se observaron diferencias significativas entre genotipos para variables clínicas. Tampoco por sexo.

Tabla 4.57 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo.

Variable		S19W		P*
		SS (%)	Portadores de W(%)	
Hipercolesterolemia	Sí	70,3	69,0	0,826
	No	29,7	31,0	
Hipertrigliceridemia	Sí	27,8	33,6	0,226
	No	72,2	66,4	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

Concentraciones de APOA5 y su asociación con parámetros bioquímicos y con los polimorfismos de la APOA5 (-1131T>C; S19W)

Estudiamos, mediante la técnica ELISA, la concentración en suero de la APOA5 en una muestra seleccionada de la población PREDIMED y su relación con las variantes genéticas estudiadas en este gen. Debido a la baja frecuencia alélica de estos polimorfismos seleccionamos todos aquellos portadores de 1131C o 19W. Las muestras TT o SS fueron elegidas apareadas por edad, sexo, IMC y % de fumadores.

La media de APOA5 en la muestra seleccionada fue de $215,4 \pm 128,1$ ng/mL. Encontramos diferencias significativas entre sexos. Las mujeres presentaron mayores concentraciones de APOA5 comparado con hombres ($228,7 \pm 13,5$ vs $191,2 \pm 120,6$ ng/ml respectivamente, $p=0.032$).

Además, estudiamos la asociación entre las concentraciones de APOA5 en suero y los parámetros bioquímicos. Las concentraciones de APOA5 fueron correlacionadas positivamente con las concentraciones de TG ($r=0.146$, $p=0.034$) tras el ajuste multivariante. Estratificamos, además, por hipertrigliceridemia y observamos que las concentraciones de APOA5 estaban significativamente y positivamente correlacionadas con las concentraciones de TG solo en aquellos que presentaban hipertrigliceridemia (SÍ: $r=0.247$, $p=0.044$ vs NO: $r=0.115$, $p=0.162$).

En cuanto al efecto de los SNPs -1131T>C y S19W en las concentraciones de APOA5, observamos que los portadores de 19W presentaban significativamente mayores concentraciones de APOA5 que los homocigotos S19 (SS: $181,4 \pm 85,5$, SW: $266,5 \pm 141,8$ and WW: $712,9 \pm 200$; $p<0,001$) (Tabla 4.56). Por el contrario, la presencia del alelo -1131C estuvo asociado con menores concentraciones de APOA5 (TT: $233,8 \pm 143,5$; TC: $182,2 \pm 83,6$ and CC: $83,7 \pm 6,7$; $p=0,003$) tanto en la población general como en hombres y mujeres (figura 4.6) (Tabla 4.58).

Tabla 4.58 Concentraciones de APOA5 (ng/ml) de acuerdo con las variants -1131T>C y S19W en el gen *APOA5* en hombres y mujeres.

<i>-1131T>C</i>	<i>Concentraciones de APOA5</i>	
	<i>Hombres</i> (<i>n=81</i>)	<i>Mujeres</i> (<i>n=145</i>)
<i>TT</i>	215,8±143,3	243,8±143,7
<i>TC</i>	163,3±63	195,2±93,7
<i>CC</i>	83,7±6,7	
<i>P</i>	0,058	0,031
<i>S19W</i>	<i>Hombres</i> (<i>n=82</i>)	<i>Mujers</i> (<i>n=151</i>)
<i>SS</i>	162,2±74,6	192,7±89,8
<i>SW</i>	241,8±131,9	280,6±145,4
<i>WW</i>	805,3	666,7±259,4
<i>P*</i>	<0,001	<0,001

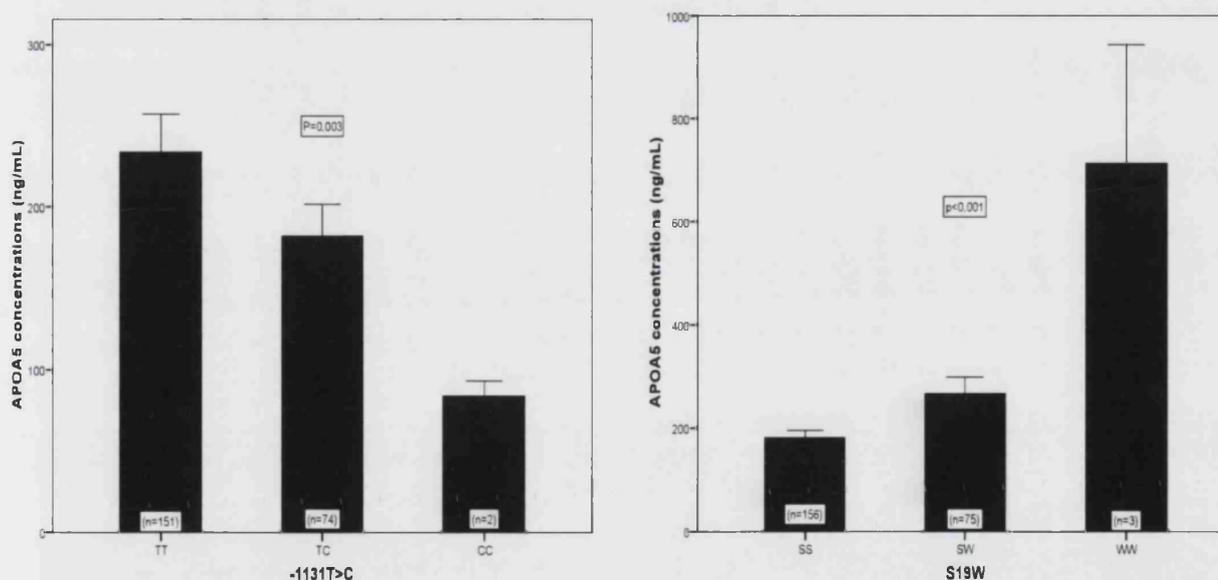


Figura 4.6 Asociación entre el S19W y -1131T>C y las concentraciones de APOA5 (ng/ml). Los datos son expresados como media±DT. P valor para el log de las concentraciones de APOA5.

4.2.4.3.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs1799884 DEL GEN GCK Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

Tras realizar un análisis de asociación entre distintas variables y el polimorfismo a estudiar según el modelo co-dominante observamos que los heterocigotos tienen un riesgo similar a los homocigotos por lo que creamos un modelo recesivo al ser este más adecuado. Así, se establecieron dos grupos, por un lado los homocigotos para el alelo común y los heterocigotos y por otro lado, los homocigotos mutados. En la tabla 4.59 se muestra la asociación del polimorfismo rs1799884 (-30G>A) del gen *GCK* con variables lipídicas en la muestra de población general y por sexo. A pesar de que no se observaron diferencias significativas para las variables analizadas, sí que hubo una tendencia a la significación para las concentraciones de triglicéridos. De tal manera que los mutados en homocigosis presentaron menores concentraciones de triglicéridos que los heterocigotos y homocigotos salvajes. (Triglicéridos (mg/dL): GG/GA: $130 \pm 72,8$ vs AA: $110,1 \pm 55,3$; $P=0,100$)

Tabla 4.59 Valores de las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados según los diferentes genotipos.

Variable		rs1799884 (-30G>A)		P*
		GG/GA Media(DT)	AA Media(DT)	
Triglicéridos (mg/dL)	Hombres	137,8 (74,9)	105,4 (54,8)	0,079
	Mujeres	126,1 (71,6)	114,2 (57,2)	0,489
	Total	130,1 (72,8)	110,1 (55,3)	0,100
CT (mg/dL)	Hombres	200 (38,2)	209,7 (40,2)	0,391
	Mujeres	212,7 (41,1)	201,3 (32,2)	0,450
	Total	208,2 (40,5)	206,8 (35,4)	0,863
HDL-C (mg/dL)	Hombres	48,9 (12,4)	50,7 (9,7)	0,622
	Mujeres	55,6 (13,6)	55,4 (15,2)	0,965
	Total	53,2 (13,6)	53,3 (12,96)	0,995
LDL-C (mg/dL)	Hombres	124,5 (35,7)	137,8 (36,7)	0,206
	Mujeres	131,2 (35,9)	126,1 (31,8)	0,598
	Total	128,8 (35,9)	131,5 (34,0)	0,709

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; CT: colesterol total

Tras ajustar las concentraciones de triglicéridos por un primer modelo que incluía edad, sexo e IMC y por un segundo modelo al que se le añadió las variables

diabetes, medicación antilipemiente y tabaco, observamos diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de triglicéridos de tal manera que los homocigotos mutados presentaban menores concentraciones de triglicéridos (Modelo 2: GG+GA: 130.7 ± 2.7 vs AA: 103.6 ± 16.1 mg/dL, $p=0.033$).

Dada la bibliografía referente a la asociación de este polimorfismo con las concentraciones de glucosa estudiamos su posible asociación. Así, observamos que las asociaciones según el genotipo van en sentido inverso a las concentraciones de triglicéridos. Así, los homocigotos mutados presentan valores superiores de glucosa que los homocigotos normales y heterocigotos con tendencia a la significación (GG/GA: $121,9 \pm 39,1$ vs AA: $136,6 \pm 48,8$; $P=0,061$).

La figura 4.7 muestra las concentraciones de triglicéridos por sexo y genotipo. Las diferencias son más acusadas en hombres que en mujeres.

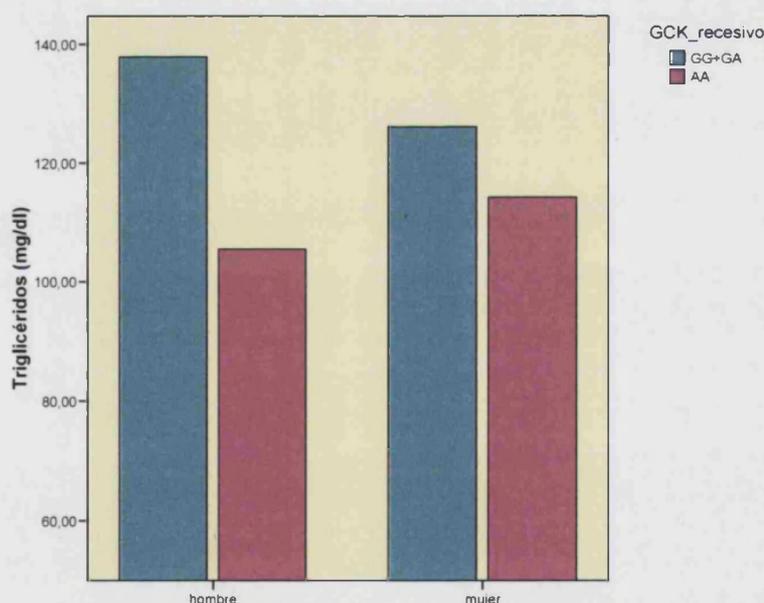


Figura 4.7 Asociación del polimorfismo -30G>A en el gen *GCK* con concentraciones de triglicéridos según sexo.

Por otro lado, al analizar las asociaciones de esta variante con factores de riesgo se obtuvieron diferencias significativas en la población general para la diabetes. Los homocigotos mutados presentaron mayor prevalencia de diabetes. (tabla 4.60).

Tabla 4.60 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo en la población general.

Variable		-30 G>A		P*
		GG/GA (%)	AA (%)	
Diabetes	Sí	48,7	76,9	0,005
	No	51,3	23,1	
Hipertrigliceridemia	Sí	28,4	26,9	0,536
	No	71,6	73,1	

*Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

Además, el alelo -30AA estuvo asociado con un incremento en el riesgo de diabetes tras ajustar por sexo, edad e IMC, tabaco e hipertrigliceridemia tras el análisis de regresión logística binaria (tabla 4.61).

Tabla 4.61 Riesgo de hipertrigliceridemia y diabetes asociado al polimorfismo -30G>A del gen *GCK*. Estimación cruda y ajustada.

HIPERTRIGLICERIDEMIA	OR	95%IC	P
<i>Crudo</i>			
GG+GA (ref.)	1		
AA	0,93	0,4-2,2	0.873
<i>Ajustado por edad y sexo</i>			
GG+GA (ref.)	1		
AA	0,68	0,27-1,76	0,431
<i>Edad, sexo, Tabaco, IMC</i>			
GG+GA (ref.)	1		
AA	0,66	0,23-1,92	0.447
DIABETES	OR	95%IC	P
<i>Crudo</i>			
GG+GA (ref.)	1		
AA	3,51	1,39-8,82	0,008
<i>Ajustado por edad y sexo</i>			
GG+GA (ref.)	1		
AA	3,38	1,33-8,55	0,01
<i>Edad, sexo, Tabaco, IMC, HTG</i>			
GG+GA (ref.)	1		
AA	3,95	1,446-10,79	0,007

IC: intervalo de confianza, IMC: Índice de masa corporal, HTG: hipertrigliceridemia

4.2.4.3.3 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs1260326 (P446L) DEL GEN *GCKR* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

La tabla 4.62 muestra la asociación del polimorfismo rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* con variables lipídicas en la muestra de población general y por sexo.

Se observa un incremento en la concentración de triglicéridos de manera que los heterocigotos y los homocigotos mutados presentan los mayores niveles en concentración ascendente (PP: 117,6±51,2; PL: 133,5±78,2; LL: 139,4±80,0 mg/dL; P=0,006). Esta significación estadística se mantuvo tras ajustar por sexo, edad, IMC y tratamiento hipolipemiente (P=0,020).

De igual modo que en el caso anterior, dada la bibliografía existente estudiamos la asociación genotipo-glucosa para este polimorfismo. Contrariamente a los valores de triglicéridos, los homocigotos mutados presentan menores valores de glucemia en ayunas que los homocigotos salvajes. Sin embargo, no alcanzó la

significación estadística ($P=0,151$). Tras ajustar por sexo, edad, IMC, tabaco y tratamiento anti-glucemiante observamos que los mutados en homocigosis presentaron niveles inferiores de glucosa en comparación con los homocigotos salvajes y los heterocigotos (PP: $121,3\pm 37,7$ vs LL: $113,2\pm 31,4$; $P=0,043$).

Tabla 4.62 Valores de las variables lipídicas de la población general según los diferentes genotipos del rs1260326 (P446L) del gen *GCKR*

Variable		rs1260326 (P446L)			P*	P**
		PP Media(DT)	PL Media (DT)	LL Media(DT)		
Triglicéridos (mg/dL)	Hombres	121,2 (55,9)	147,2 (84,3)	139,9 (65,6)	0,025	0,083
	Mujeres	115,6 (48)	126,2 (74)	139 (86)	0,05	0,015
	Total	117,6 (51,2)	133,5 (78,2)	139,4 (80,0)	0,006	0,003
CT-total (mg/dL)	Hombres	198 (36,7)	204,1 (39,4)	194,9 (36,5)	0,190	0,672
	Mujeres	212,5 (38,3)	212 (43,9)	215,9 (37,5)	0,652	0,476
	Total	206,8 (38,3)	209,0 (42,4)	209,5 (38,4)	0,715	0,480
HDL-C (mg/dL)	Hombres	50,1 (11,7)	48,4 (13,1)	47,7 (9,7)	0,388	0,230
	Mujeres	56,4 (14,8)	55,8 (13,7)	54,4 (13,7)	0,458	0,222
	Total	54,0 (14,0)	53,2 (13,9)	52,2 (13,0)	0,421	0,190
LDL-C (mg/dL)	Hombres	124,3 (36,6)	126,9 (36,3)	120,7 (32,4)	0,526	0,548
	Mujeres	133,5 (36,6)	129 (35,6)	133,7 (35,6)	0,303	0,960
	Total	130,0 (36,7)	128,1 (35,7)	129,8 (35,1)	0,746	0,948

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. ***P* de tendencia lineal DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal, CT: Colesterol total.

Al analizar las asociaciones del polimorfismo por sexo se mantuvieron las diferencias estadísticamente significativas para las concentraciones de triglicéridos. Así, tanto los hombres como las mujeres portadores de la mutación, en heterocigosis o homocigosis mostraron concentraciones de triglicéridos superiores. (Hombres: PP: $121,2\pm 55,9$; PL: $147,2\pm 84,3$; LL: $139,9\pm 65,6$; $P=0,025$; Mujeres: PP: $115,6\pm 48,0$; PL: $126,2\pm 74,0$; LL: $139,0\pm 86,0$ mg/dL; $P=0,015$;) (Figura 4.8).

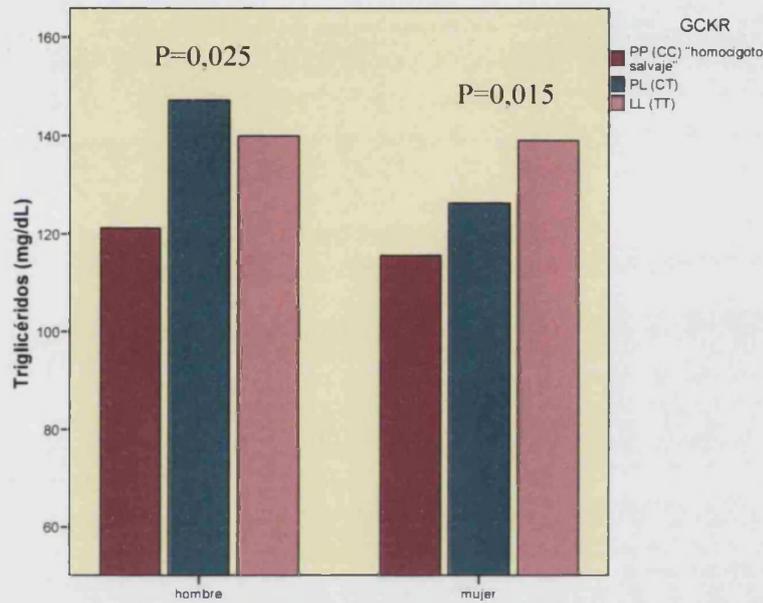


Figura 4.8 Concentraciones medias de triglicéridos (mg/dL) por sexo según el genotipo (rs1260326 (P446L) del gen *GCKR*.

Posteriormente analizamos las asociaciones entre el polimorfismo de estudio y los factores de riesgo cardiovascular. Se observaron asociaciones significativas para la hipertrigliceridemia ($P=0,002$) (Tabla 4.63).

Tabla 4.63 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo.

Variable		rs1260326 (P446L)			P*
		PP (%)	PL (%)	LL (%)	
Hipertrigliceridemia	Sí	20,6	32,2	32,6	0,002
	No	79,4	67,9	67,4	
Diabetes	Sí	49,3	50,9	42,9	0,197
	No	50,7	49,1	57,1	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral.

Por sexo observamos similares resultados en cuando a la prevalencia de hipertrigliceridemia según el genotipo. En hombres, la prevalencia fue mayor para los 446LL en comparación con los PP446 (36,4% vs 22,9% respectivamente; $P=0,019$). Esto mismo ocurrió también en el caso de las mujeres (Figura 4.9).

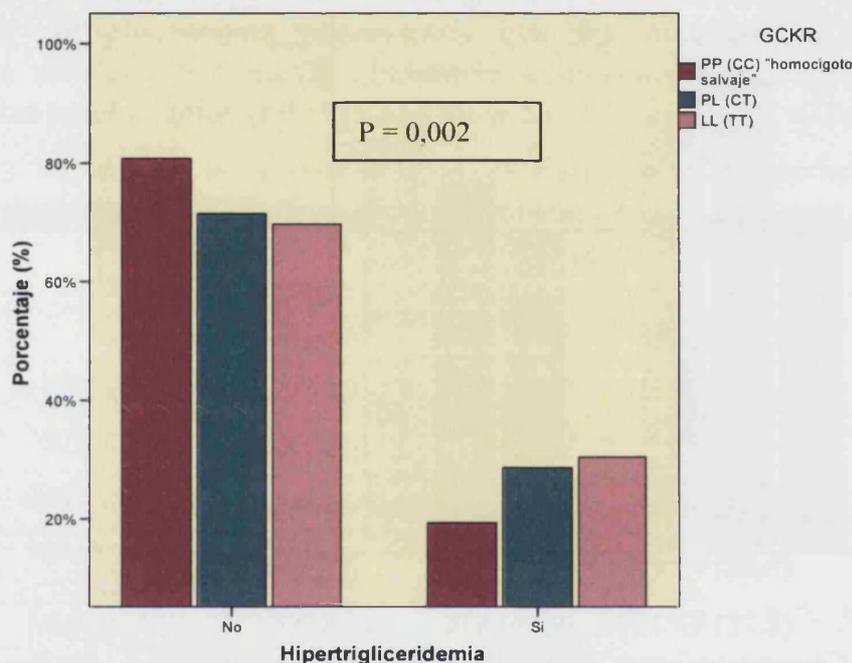


Figura 4.9 Porcentaje de hipertrigliceridemia en mujeres según genotipo.

Por otro lado el alelo 446L estuvo asociado con un incremento en el riesgo de hipertrigliceridemia en crudo y tras ajustar por sexo, edad e IMC, tabaco y actividad física, el análisis de regresión logística binaria (Tabla 4.64).

Tabla 4.64 Riesgo de hipertrigliceridemia asociado al polimorfismo P446L del gen *GSKR*. Estimación cruda y ajustada.

<i>Polimorfismo P446L (GSKR)</i>	<i>OR</i>	<i>95%IC</i>	<i>P</i>
<i>Crudo</i>			
PP (ref.)	1		
PL+LL	1,86	1,33-2,61	<0,001
<i>Ajustado por edad y sexo</i>			
PP (ref.)	1		
PL+LL	1,90	1,34-2,68	<0,001
<i>Edad, sexo, Tabaco, IMC, AF</i>			
PP (ref.)	1		
PL+LL	2,06	1,35-3,15	0,001

IC: intervalo de confianza, IMC: Índice de masa corporal, AF: Actividad física.

4.2.4.3.4 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs6950982 DEL GEN DE LA *SERPINE1* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En la tabla 4.65 se muestra la asociación del polimorfismo rs695098 del gen de la *SERPINE1* con variables lipídicas en la muestra de población general.

Tras el estudio de los descriptivos obtenidos para dicho polimorfismo se decidió establecer un modelo recesivo. Así, se establecieron dos grupos, por un lado los homocigotos para el alelo común y los heterocigotos y por otro lado, los homocigotos mutados.

Se observaron diferencias significativas para las concentraciones de triglicéridos donde los homocigotos GG tuvieron mayores valores que los AA y AG ($154,1 \pm 111,7$ mg/dL vs $129,4 \pm 78,2$; $P=0,042$ respectivamente).

Tabla 4.65 Datos de asociación para el polimorfismo rs695098 del gen *SERPINE1* en población general.

Variable		rs 695098		P*
		AA/AG Media(DT)	GG Media(DT)	
Triglicéridos (mg/dL)	Hombres	135,9 (73,7)	152,2 (76,1)	0,217
	Mujeres	125,9 (80,7)	155,7 (136,5)	0,064
	Total	129,4 (78,2)	154,1 (111,7)	0,042
CT-total (mg/dL)	Hombres	198,3 (37,0)	224,6 (4,4)	0,001
	Mujeres	212,9 (40,5)	211,7 (50,3)	0,878
	Total	207,8 (39,8)	217,7 (47,6)	0,081
HDL-C (mg/dL)	Hombres	49 (12,3)	47,5 (9,4)	0,560
	Mujeres	55,8 (14,2)	56,6 (13,8)	0,768
	Total	53,4 (13,9)	52,2 (12,6)	0,554
LDL-C (mg/dL)	Hombres	122,1 (35,5)	146,6 (45,2)	0,001
	Mujeres	131,9 (37,6)	126,4 (40,8)	0,460
	Total	128,4 (37,1)	136,1 (37,5)	0,151

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; CT: colesterol total.

Posteriormente, tras ajustar el colesterol total por edad, sexo y tratamiento hipolipemiente, se obtuvieron valores significativos, siendo los portadores del alelo en homocigosis los que presentan mayores concentraciones de colesterol total ($P=0,011$). Resultados similares se obtuvieron para las concentraciones de HDL-C y triglicéridos ($P=0,027$ y $P=0,029$ respectivamente).

Por otro lado, al analizar las asociaciones de esta variante con factores de riesgo no se obtuvieron diferencias significativas en la población general ni estratificada por sexo (datos no mostrados).

4.2.4.4 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES GEN-AMBIENTE EN LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

4.2.4.4.1 POLIMORFISMO rs1466113 DEL GEN SSRT2.

En los estudios de asociación, en la población general no se encontraron asociaciones significativas para el polimorfismo del gen *SSRT2* y el IMC o cintura, sin embargo sí que se presentó en hombres. Dado que los estudios de barrido genómico encontraron asociación de este polimorfismo con variables antropométricas (IMC, perímetro de la cintura), nos propusimos estudiar alguna posible interacción gen-dieta. Así, no se observó interacción para la adherencia a la dieta mediterránea tanto para el IMC como para el perímetro de la cintura (tabla 4.66).

Tabla 4.66 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de IMC, cintura para el modelo de interacción del polimorfismo del rs1466113 del gen del *SSRT2*-adherencia a la dieta mediterránea.

	Cuartiles de dieta mediterránea					
	Q1+Q2+Q3			Q4		
	<i>GG/CG</i>	<i>CC</i>	<i>P*</i>	<i>GG/CG</i>	<i>CC</i>	<i>P*</i>
<i>rs1466113</i>	<i>Media (ET)</i>	<i>Media(ET)</i>		<i>Media (ET)</i>	<i>Media (ET)</i>	
IMC (Kg/m ²)	30,9(0,2)	29,9(0,5)	0,083	29,4(0,4)	29,5(0,5)	0,942
Cintura (cm)	105,1(0,5)	103(1,2)	0,110	102,9(1,3)	102 (3)	0,901

*Valores de *P* ajustados por sexo, edad, en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta. IMC: índice de masa corporal.

Finalmente, estudiamos la asociación entre el polimorfismo en el gen *SSTR2* y la ingesta de comida. Observamos que la ingesta de energía fue inferior en los sujetos con el genotipo *CC*, sin alcanzar la significación estadística (Tabla 4.67).

Algo similar ocurrió para la ingesta de hidratos de carbono. Sin embargo, la ingesta de proteínas fue significativamente inferior en los participantes con el genotipo *CC* que lo portadores de *G*. Teniendo en cuenta que los individuos con el genotipo *CC* tenían menor prevalencia de obesidad que los portadores del alelo *G*,

ajustamos las comparaciones por la obesidad. Incluso, tras ajustar, la ingesta de proteínas fue estadísticamente inferior en los individuos con el genotipo CC. En cuanto a los grupos de alimentos, observamos diferencias significativas para el consumo diario de lácteos, carne total y legumbres tras ajustar por edad, sexo y obesidad (Sotos-Prieto M et al, 2010).

Tabla 4.67 Consumo de energía, nutrientes en hombres y mujeres en función del polimorfismo rs1466113 en el gen *SSTR2*.

	GG+GC (n= 719)	CC (n=126)	P*	P**
Energía total (kcal/d)	2262±661	2155±671	0,127	0,133
Hidratos de carbono, (g/d)	240,5±84,8	227,6±87,3	0,154	0,338
Proteínas, (g/d)	96,0±27,8	87,9±22,8	0,006	0,009
Grasa total, (g/d)	97,6±33,1	94,7±33,4	0,428	0,328
AGMI, (g/d)	47,7±16,7	46,2±16,1	0,459	0,359
AGPI, (g/d)	15,8±8,05	15,2±7,2	0,460	0,507
AGS, (g/d)	25,8±10,1	24,9±11,5	0,423	0,210
Total de carnes, (g/d)	142,3±74,0	126,5±52,8	0,038	0,045
Frutas, (g/d)	310,2±168,7	304,7±247	0,778	0,821
Verduras, (g/d)	385,3±159,1	359,2±177	0,134	0,151
Lácteos, (g/d)	389,9±223,4	345,2±204	0,043	0,035
Legumbres, (g/d)	20,9±13,1	18,3±9,6	0,054	0,019
Pescado, (g/d)	95,4±55,1	90,9±45,8	0,436	0,456

Los valores son presentados como medias ± desviación estándar para variables continuas. * P valor sin ajustar para la media de comparaciones **P valor ajustado por edad, sexo y obesidad.

4.2.4.4.2 POLIMORFISMO rs7138803 DEL GEN *FAIM2*

En la figura 4.10 se presenta la interacción gen*tabaco. Los individuos AA tienen mayor IMC cuando son fumadores que cuando no lo son. Y sin embargo, los individuos AA tienen menor peso cuando tienen una vida no sedentaria (figura 4.11).

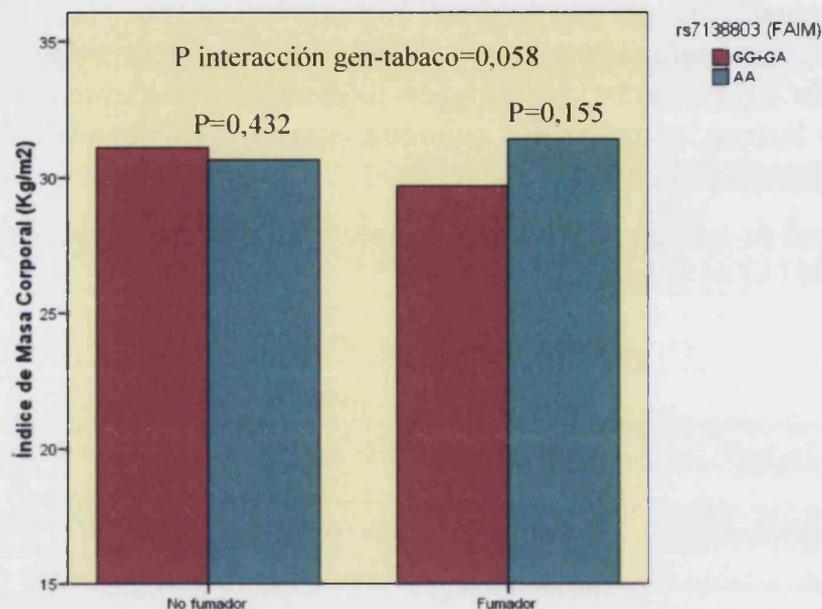


Figura 4.10 Interacción rs7138803 del gen *FAIM2**tabaco ajustado por edad, sexo, actividad física.

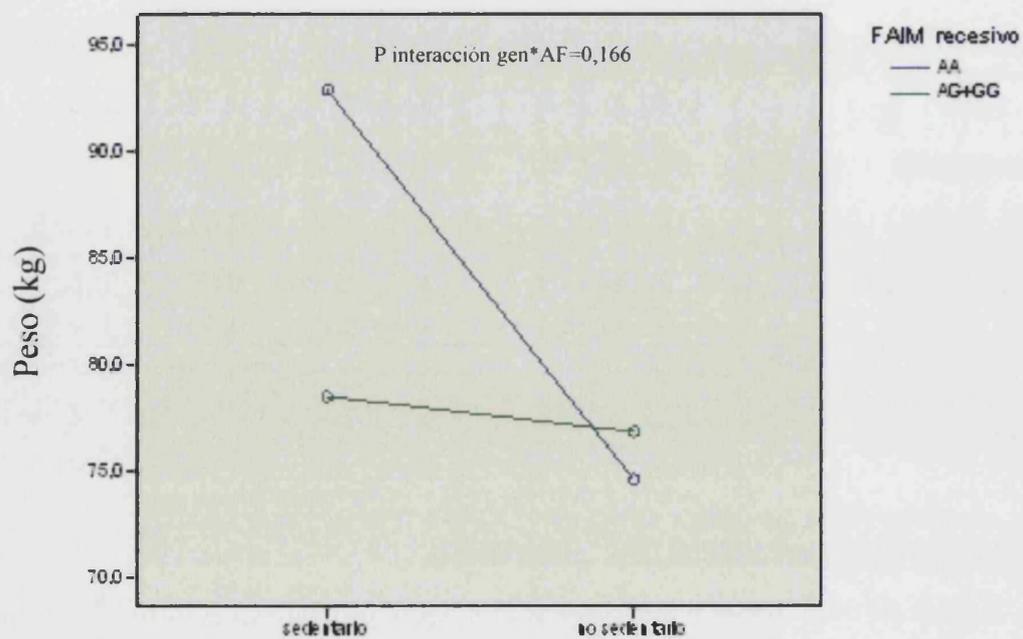
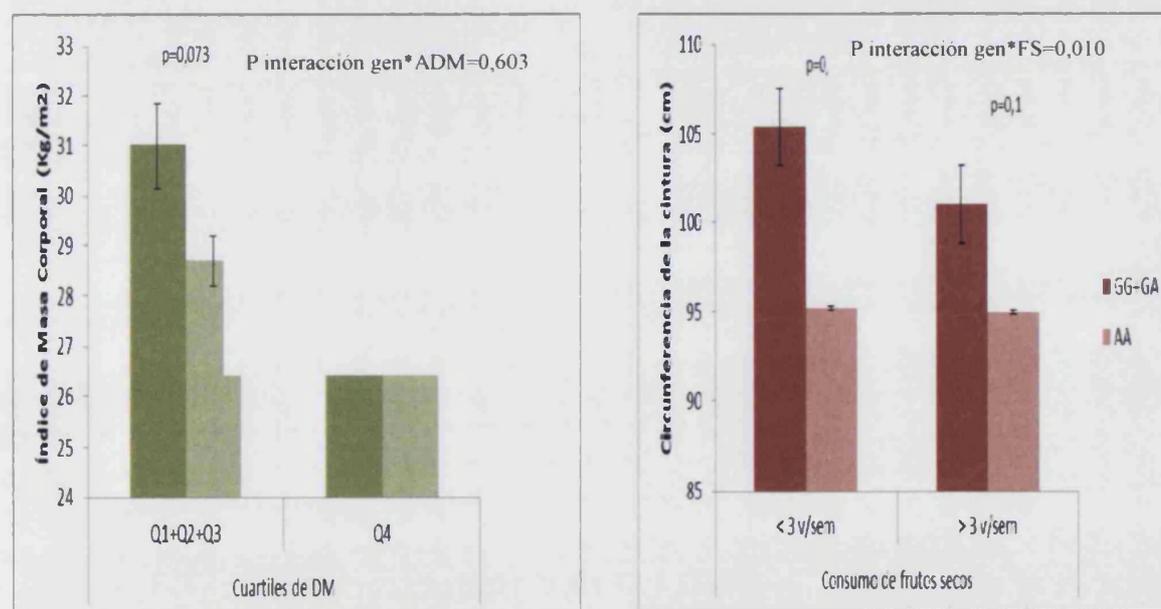


Figura 4.11 Interacción rs7138803 del gen *FAIM2**actividad física (AF) ajustado por edad, sexo.

4.2.4.4.3 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs7561317 DEL GEN *TMEM18* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En el estudio de asociación del polimorfismo con variables antropométricas se observa que los individuos con el genotipo GG tenían mayores valores de circunferencia de la cintura y de IMC (en este último caso sin llegar a la significación estadística). En el estudio de interacción gen*ambiente, observamos que los individuos con el genotipo GG+GA que tenían una alta adherencia a la dieta mediterránea no tenían diferencias significativas en cuanto al IMC en comparación con los individuos AA. En cambio, cuando la adherencia era baja, los individuos GG+GA presentaron mayores niveles de IMC (GG+GA: $31,0 \pm 0,2$ vs AA: $28,7 \pm 1,2$; $p=0,073$) (figura 4.12 A). Esto mismo sucede para la circunferencia de la cintura al analizar el consumo alto y bajo de frutos secos (figura 4.12 B).



A)

B)

Figura 4.12 Valores del índice de masa corporal (A) y circunferencia de la cintura (B) en función de la adherencia a la dieta mediterránea (ADM) y el consumo de frutos secos (FS) respectivamente según el polimorfismo rs7561317 del gen *TMEM18* Valores de P ajustados por sexo, edad, actividad física y tabaco.

4.2.4.4.4 POLIMORFISMO rs2568958 DEL GEN *NEGR1*

En el estudio de asociación genética los individuos AA tenían mayores niveles de IMC y peso corporal.

En el estudio de interacción gen*ambiente encontramos una modulación del IMC en función de la actividad física al considerar la variable dicotómica sedentario/no sedentario, de tal manera que los individuos AA solo presentaban mayores niveles de IMC cuando eran sedentarios, mientras que esto no ocurría cuando los individuos AA tenían una vida activa (figura 4.13)

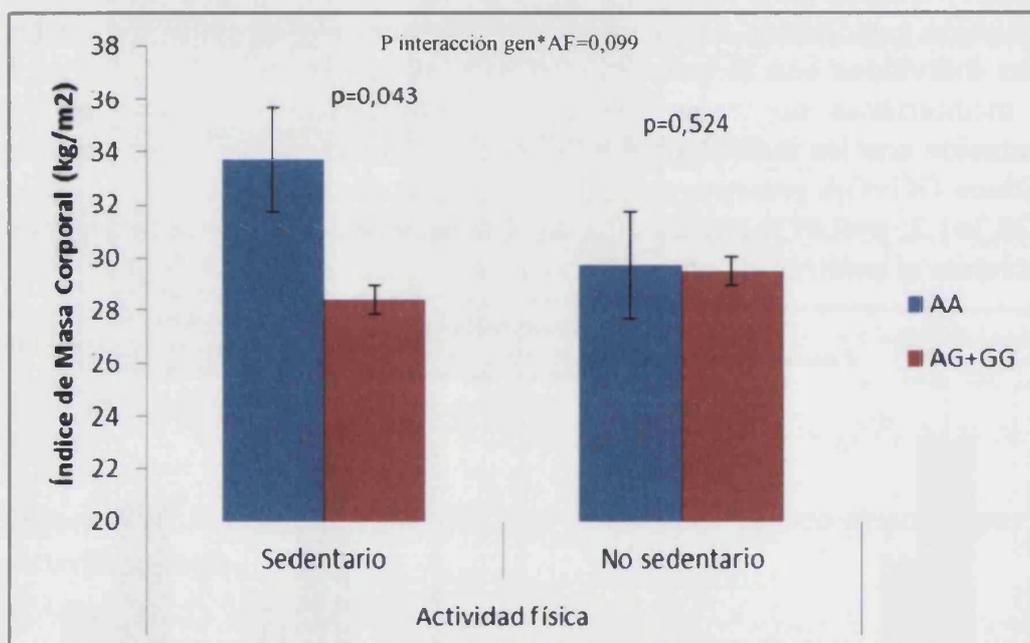


Figura 4.13 Valores del índice de masa corporal en función de la actividad física según el polimorfismo rs2568958 del gen *NEGR1*. Valores de P ajustados por sexo, edad, diabetes y tabaco.

4.2.4.4.5 POLIMORFISMO rs2167444 DEL GEN *SCD1*

No se observaron interacciones gen*ambiente para este gen en cuanto a parámetros antropométricos. Sin embargo, se observó una modulación gen*dieta para las concentraciones de triglicéridos (figura 4.14). En el estudio de asociación gen con parámetros bioquímicos ya encontramos una asociación estadística de este polimorfismo con las concentraciones de triglicéridos, de tal manera que los homocigotos AA presentaron mayores concentraciones. En el estudio de interacción gen*ambiente observamos que los homocigotos AA presentaron mayores concentraciones de triglicéridos solo cuando la adherencia a la dieta fue baja (TT+TA: 128,3±2,9 vs 183,4±26,2 mg/dL; p=0,037) en cambio, cuando la adherencia fue alta los homocigotos AA ya no presentaron esta elevación en la concentración de triglicéridos (TT+TA: 134,3±3,5 vs 125,0±44,4 mg/dL; p=0,836).

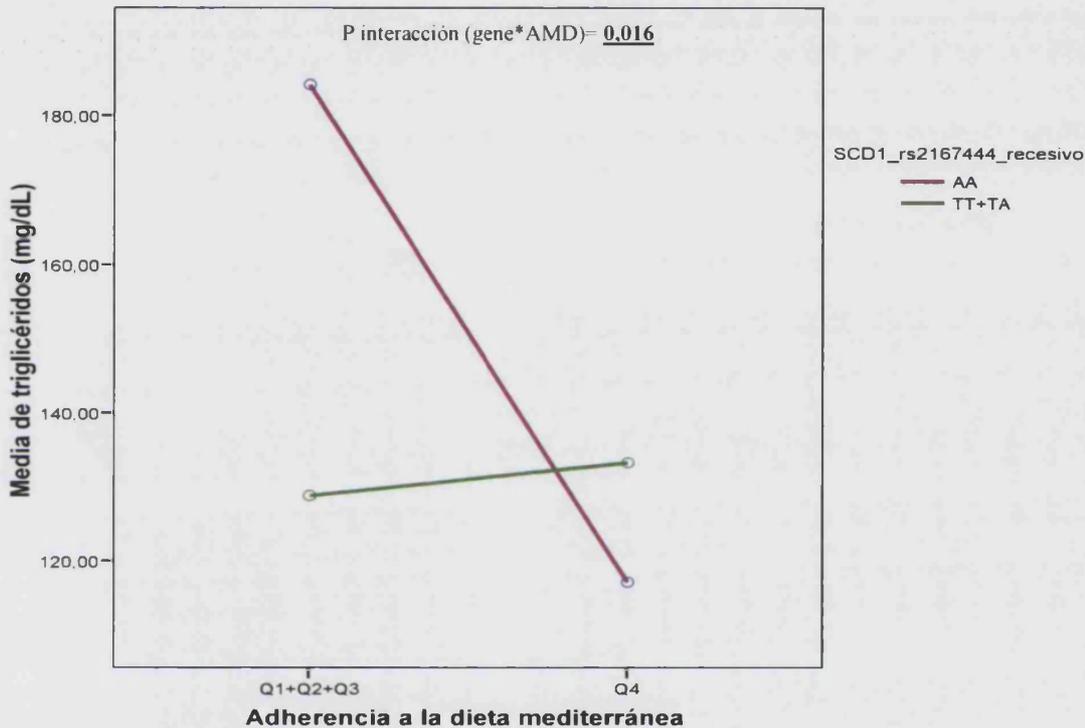


Figura 4.14 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo rs2167444 del gen *SCD1*. Valores de P ajustados por sexo, edad, tratamiento hipolipemiante e IMC.

4.2.4.4.6 POLIMORFISMOS rs3818292 Y rs7069102 DEL GEN *SIRT1*

No se obtuvieron resultados significativos para la interacción de estos polimorfismos y factores ambientales.

4.2.4.4.7 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs5085 DEL GEN *APOA2* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

Para este polimorfismo y dados los artículos previamente publicados por nuestro grupo, encontramos una interacción gen*ingesta de ácidos grasos saturados. Las figuras y datos presentados están extraídos de nuestra publicación (Corella et al, 2011). Se crearon dos categorías de ingesta de ácidos grasos saturados (ingesta baja <22 g/día y ingesta alta >22g/día. Encontramos una

interacción significativa para el SNP *APOA2* y la grasa saturada para el IMC tras realizar un modelo multivariante ajustado ($p=0,030$). Aquellos individuos que estaban en el estrato de menor consumo de grasa saturada ($<22\text{g/día}$) el polimorfismo en el gen de la *APOA2* no estuvo asociado con con mayor IMC ($p=0,316$). Sin embargo, los individuos con el genotipo CC que presentaron unconsumo de grasa saturada $> 22\text{ g/día}$ tuvieron un mayor IMC ($p=0,018$) (Figura 4.15)

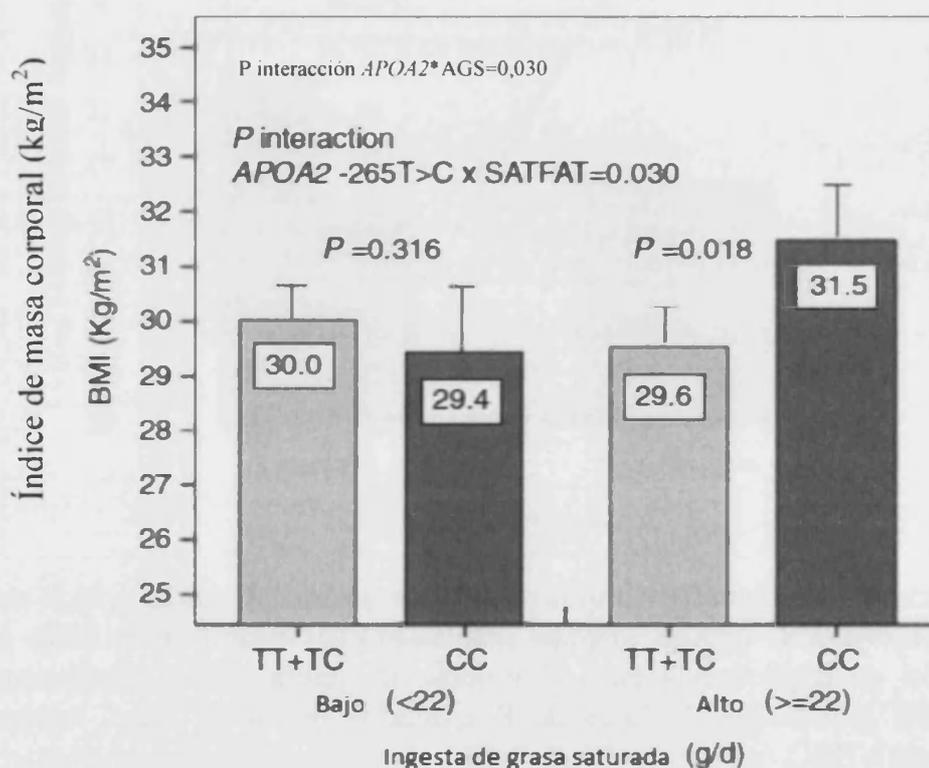


Figura 4.15 Interacción entre el polimorfismo rs5082 en el gen *APOA2* y la ingesta de ácidos grasos saturados (AGS) para el IMC. Las medias fueron ajustadas por sexo, edad, tabaco, consumo de alcohol, diabetes, tratamiento hipolipemiante e ingesta de energía. (Corella et al, 2011).

4.2.4.4.8 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS rs17020112, rs10863430, rs3748022 Y rs10863389 DEL GEN *IKKE* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En el análisis de interacción gen*ambiente para los polimorfismos estudiados en el gen *IKKE* sólo obtuvimos datos significativos para el polimorfismo rs10863430. Los individuos con el genotipo GT+TT presentaron menor riesgo de obesidad ($p=0,029$) cuando tenían una alta adherencia a la dieta mediterránea, en caso contrario no se encontraron estas diferencias significativas ($p=0,399$) (Tabla 4.68).

Tabla 4.68 Asociación entre rs10863430 del gen *IKKE* y la obesidad dependiendo de la alta o baja adherencia a la dieta mediterránea. Análisis logístico multivariante.

	Genotipo	OR	IC 95%	P*
Baja ADM	GG (ref.)	1		
	GT+TT	0,847	0,577-1,245	0,399
Alta ADM	GG (ref)	1		
	GT+TT	0,340	0,129-0,894	0,029

OR: Odds Ratio, IC: intervalo de confianza, ADM adherencia a la dieta mediterránea. * P valor del análisis multivariante ajustado por edad, sexo, Tabaco, y actividad física.

4.2.4.5 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES GEN-AMBIENTE EN LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LAS CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

4.2.4.5.1 POLIMORFISMO -1131T>C DEL GEN APOA5

En primer lugar se estudió si la asociación entre el polimorfismo del promotor de la *APOA5* y las mayores concentraciones de triglicéridos en los portadores del alelo mutado observadas para el conjunto de la población, se mantenían o se modificaban en función del tipo de dieta consumida. Para este estudio se consideraron los cuatro cuartiles de dieta mediterránea, y se observó que la asociación entre el polimorfismo del promotor y las concentraciones de triglicéridos no era homogénea para todos los cuartiles. Si bien en los primeros cuartiles de dieta mediterránea (Q1, Q2 y Q3), sí que se observaba una asociación significativa entre el polimorfismo -1131T>C y las mayores concentraciones de triglicéridos (Figura 4.16) en el cuarto cuartil de mayor adherencia a la dieta mediterránea (Q4), los portadores del alelo mutado en el polimorfismo del promotor de la *APOA5* ya no presentaron significativamente mayores concentraciones de TG que los homocigotos normales en dicho cuartil, sugiriendo un efecto beneficioso de una estricta dieta mediterránea en los portadores del alelo mutado en el promotor de la *APOA5* para no incrementar sus concentraciones de triglicéridos debido a su mayor susceptibilidad genética.

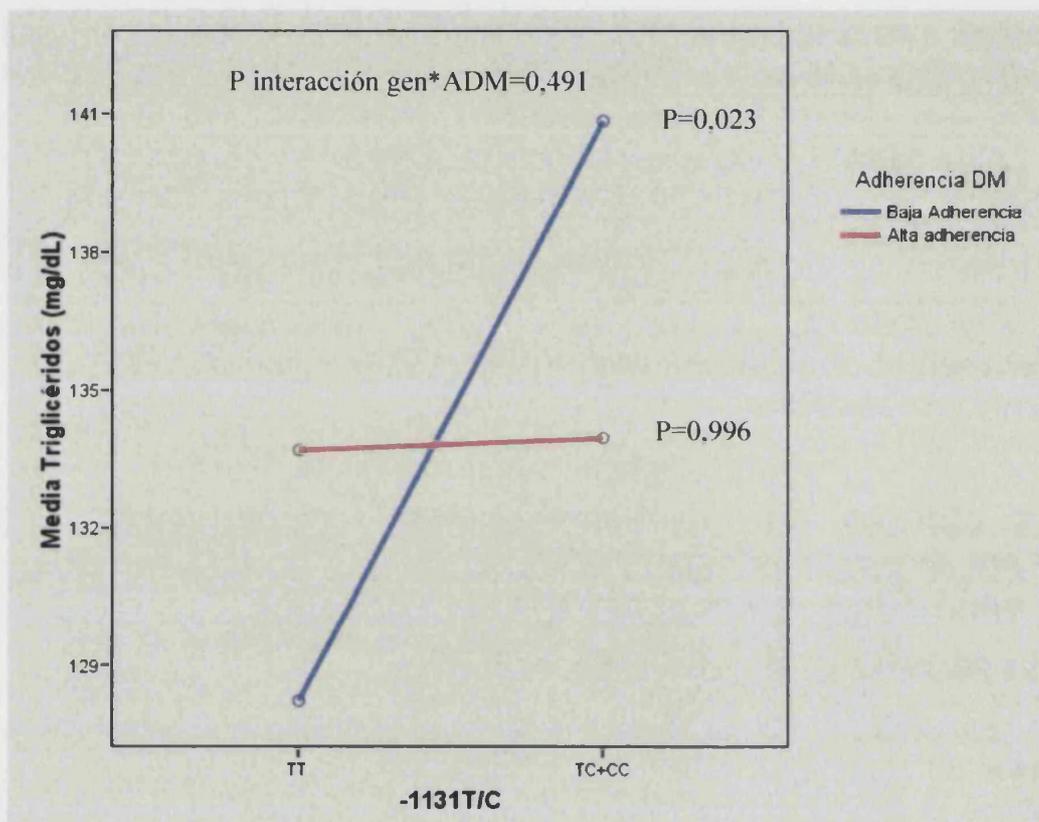


Figura 4.16 Valores de las medias estimadas de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo -1131T>C-adherencia a la dieta mediterránea (ADM). Valores de P estimada para la variable log TG, ajustados por sexo, edad, obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta. TG: triglicéridos

Por otra parte, los valores de HDL-C, que resultaron significativamente menores en el total de la población asociados al alelo mutado del promotor de la *APOA5*, perdieron significación estadística ($P=0,054$), al considerar la adherencia a la dieta mediterránea como variable de control en el modelo multivariante, sugiriendo una modulación por la dieta de los efectos de este polimorfismo en las concentraciones de HDL-C. Sin embargo, no hubo interacción.

Para comprobar si el consumo de aceite de oliva podía explicar los resultados de no incremento de TG en el cuartil más alto de adherencia a la dieta mediterránea, se creó una nueva variable para el consumo de aceite de oliva según si tomaban 4 o más cucharadas al día (consumo elevado) o no (menos de 4 cucharadas). Se observó que la asociación entre el polimorfismo del promotor y las concentraciones de triglicéridos eran similares en los dos estratos, alto o bajo consumo de aceite de oliva, sin alcanzar la significación estadística en ninguno de los dos casos. Aunque los portadores del alelo mutado presentaban mayores concentraciones de triglicéridos que los homocigotos normales para el promotor de

la *APOA5* con un mayor consumo de aceite de oliva, si que queremos hacer notar que en el estrato más alto de consumo de aceite de oliva, las concentraciones de triglicéridos tanto en homocigotos normales como en portadores de la mutación, son inferiores en magnitud a las de sus homónimos en el estrato más bajo de consumo de aceite de oliva (Bajo consumo: portadores de C: $149 \pm 16,6$ vs Alto consumo: portadores de C $139 \pm 28,5$).

Posteriormente, analizamos si el consumo de alcohol podría modular las concentraciones de triglicéridos asociada a este polimorfismo. Para ello se creó una nueva variable de consumo de alcohol que agrupaba el consumo de vino tinto (tinto joven, y tinto añejo), cerveza y otras bebidas alcohólicas (licores y destilados). Posteriormente, se halló la frecuencia de consumo medio (2,6 veces a la semana) y se creó una variable dicotómica para el consumo alto (por encima de la media) o bajo (por debajo de la media). No hubo interacción para el consumo de bebidas alcohólicas y el polimorfismo -1131T>C en la modulación de las concentraciones de triglicéridos, aunque se observó un mayor aumento de los triglicéridos en los mutados que mayor consumo de alcohol presentaron (alto consumo de alcohol TT $131,6 \pm 5,7$ vs TC+CC: $155,9 \pm 15,7$ mg/dL; $p=0,150$)

Para comprobar si la actividad física estaba implicada en los resultados de no incremento de TG en aquellos que no eran sedentarios, utilizamos la variable dicotómica de sedentario-no sedentario. Se observó que la asociación entre el polimorfismo del promotor y las concentraciones de triglicéridos eran similares en los dos estratos, de sedentario-no sedentario, sin alcanzar la significación estadística en ninguno de los dos casos.

Se estudió si la asociación entre el polimorfismo del promotor de la *APOA5* y las mayores concentraciones de triglicéridos en los portadores del alelo mutado observadas para el conjunto de la población, se mantenía o se modificaba en función de ser fumador o no fumador, puesto que esta condición representó modificaciones en la población general. Se observó que la asociación entre el polimorfismo del promotor y las concentraciones de triglicéridos no era homogénea según la condición de ser fumador o no. Si bien los fumadores presentaron una asociación significativa entre el polimorfismo -1131T>C y las mayores concentraciones de triglicéridos (Figura 4.17); los no fumadores y portadores del alelo mutado en el polimorfismo del promotor de la *APOA5* ya no presentaron significativamente mayores concentraciones de TG que los homocigotos normales no fumadores, sugiriendo un efecto beneficioso de no ser fumador en los portadores del alelo mutado en el promotor de la *APOA5* para no incrementar sus concentraciones de triglicéridos.

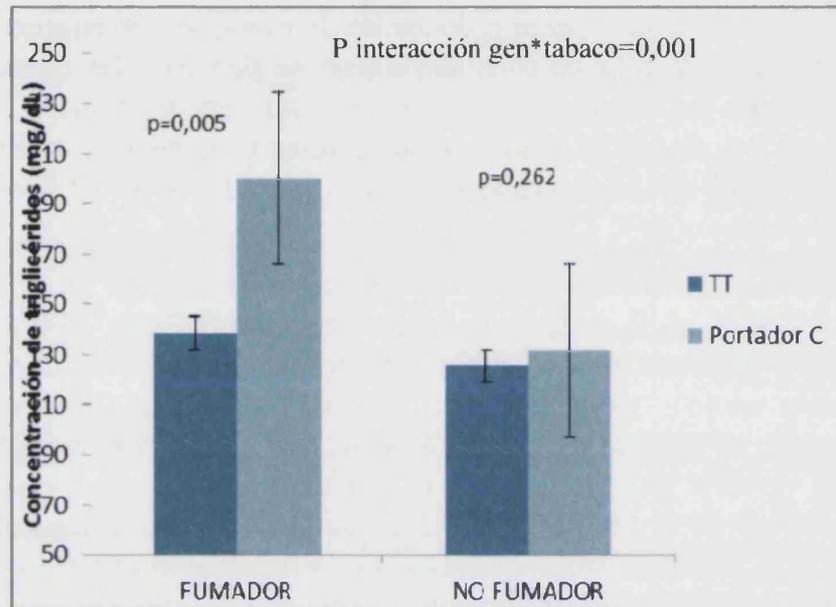


Figura 4.17 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo -1131T>C-hábito tabáquico. Valores de P ajustados por sexo, edad, IMC y tratamiento hipolipemiante en la comparación de los genotipos en función del hábito tabáquico.

4.2.4.5.2 POLIMORFISMO S19W DEL GEN APOA5

En el estudio de asociación entre adherencia a la dieta mediterránea definido por cuartiles, las concentraciones de triglicéridos y el polimorfismo S19W del gen de la *APOA5* según el modelo dominante no se observó modificación del efecto. Al igual que en el estudio de asociación no hubieron diferencias significativas entre ser portador de la variante mutada y la concentración de triglicéridos independientemente de la dieta; aunque si que se observan valores superiores en el caso de los portadores de la mutación. Asimismo, en el modelo multivariante, los valores de C- LDL permanecieron significativos tras ajustar por adherencia a la dieta mediterránea, sexo y edad ($P=0,001$). Por último tampoco se observó modificación del efecto para el consumo alto o bajo de aceite de oliva

El consumo de alcohol tampoco modificó las concentraciones de triglicéridos en los portadores de la mutación del polimorfismo S19W.

En el estudio sobre el papel de actividad física en la capacidad para modular las concentraciones de triglicéridos observamos que los portadores de la mutación que no eran sedentarios presentaron menores concentraciones de triglicéridos que aquellos que si que eran sedentarios (Figura 4.18).

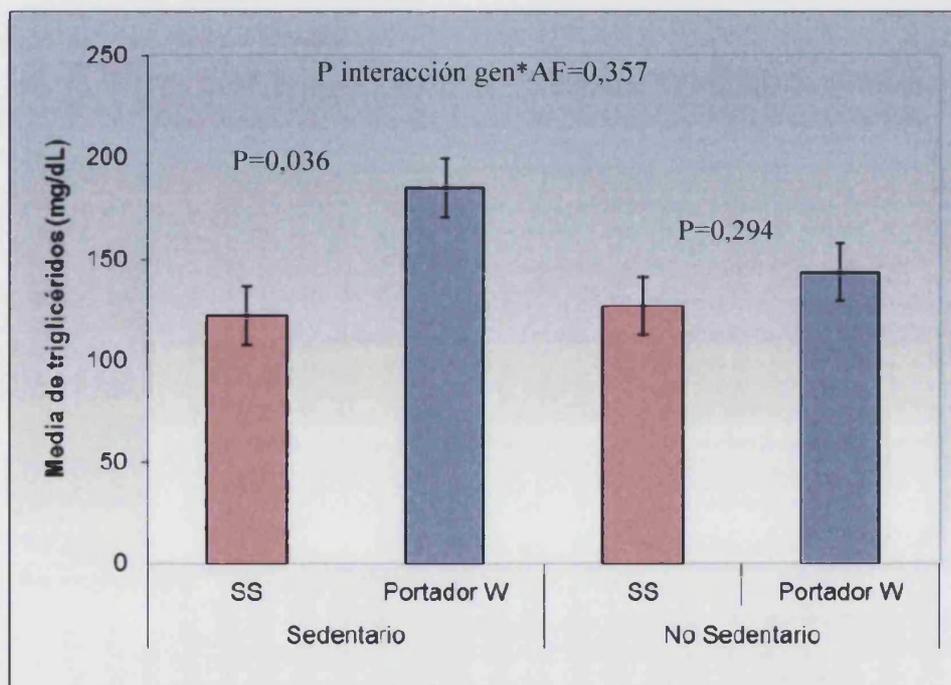


Figura 4.18 Valores de las medias estimadas de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo S19W-actividad física (AF). Valores de P estimados para log TG ajustados por sexo, edad, IMC, tratamiento hipolipemiante en la comparación de los genotipos en función de la actividad física. TG: triglicéridos

El tabaco no moduló significativamente el efecto de las concentraciones de triglicéridos.

4.2.4.3.3 POLIMORFISMO rs1799884 DEL GEN GCK

En el estudio de interacción del polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* con la dieta, para ver el efecto de la adherencia a la dieta mediterránea, sobre la glucemia en ayunas se observó que la asociación entre el polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* y los niveles de glucosa no eran homogéneos para todos los cuartiles. De esta manera, mientras que en los primeros cuartiles de dieta mediterránea (Q1, Q2 y Q3) sí que se observaba una asociación significativa entre el polimorfismo y los mayores niveles de glucosa (Figura 4.19) en el cuarto cuartil de mayor adherencia a

la dieta mediterránea (Q4), los homocigotos mutados del polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* ya no presentaron significativamente mayores niveles de glucosa que los homocigotos normales y heterocigotos en dicho cuartil, sugiriendo un efecto beneficioso, al igual que en el caso del polimorfismo del promotor de la *APOA5*, de la dieta mediterránea en los homocigotos mutados del polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* para no incrementar sus niveles de glucosa debido a su mayor susceptibilidad genética.

Posteriormente se estudió si la asociación entre el polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* y los valores de glucosa se modificaba en función de la cantidad de aceite consumido. Para este estudio se consideró el consumo alto o bajo del aceite de oliva estableciendo dos grupos tal y como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

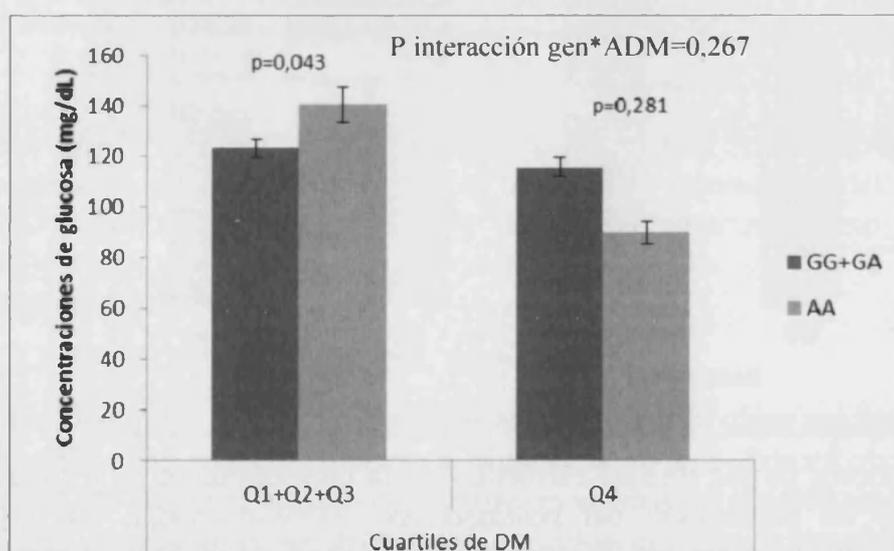


Figura 4.19 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de glucosa para el modelo de interacción del polimorfismo rs1799884 del gen *GCK*-adherencia a la dieta mediterránea (ADM). Valores de P estimados para glucosa en ayunas ajustados por sexo, edad y obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta

Posteriormente se estudió si la asociación entre el polimorfismo de polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* y los valores de glucosa se modificaba en función de la cantidad de alcohol consumido. No se observó asociación significativa entre el polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* y los valores de glucosa

En el estudio de la actividad física y su asociación con el polimorfismo rs1799884 del gen *GCK* y los valores de glucosa, no se pudo analizar si existía interacción gen-actividad física debido a que, dado que la frecuencia genotípica del alelo AA es baja, no se encontró ningún homocigoto mutado que fuera sedentario.

Por otro lado, en el estudio de hábito tabáquico tampoco encontramos diferencias significativas (datos no mostrados)

4.2.4.5.4 POLIMORFISMO rs1260326 (P446L) DEL GEN *GCKR*.

En primer lugar se estudió si la asociación entre el polimorfismo rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* y las mayores concentraciones de triglicéridos en los portadores del alelo mutado observadas para el conjunto de la población, se mantenía o se modificaba en función del tipo de dieta consumida. Se observó que la asociación entre el polimorfismo y las concentraciones de triglicéridos no era homogénea para todos los cuartiles. Si bien en los primeros cuartiles de dieta mediterránea (Q1, Q2 y Q3), sí que se observaba una asociación significativa entre el polimorfismo rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* y las mayores concentraciones de triglicéridos (Figura 4.20) en el cuarto cuartil de mayor adherencia a la dieta mediterránea (Q4), concretamente en los homocigotos mutados se observó una disminución de las concentraciones de triglicéridos en comparación con los homocigotos mutados en el cuartil de menor adherencia, sugiriendo un efecto beneficioso de una precisa dieta mediterránea en los homocigotos mutados en el polimorfismo rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* para no incrementar sus concentraciones de triglicéridos debido a su mayor susceptibilidad genética.

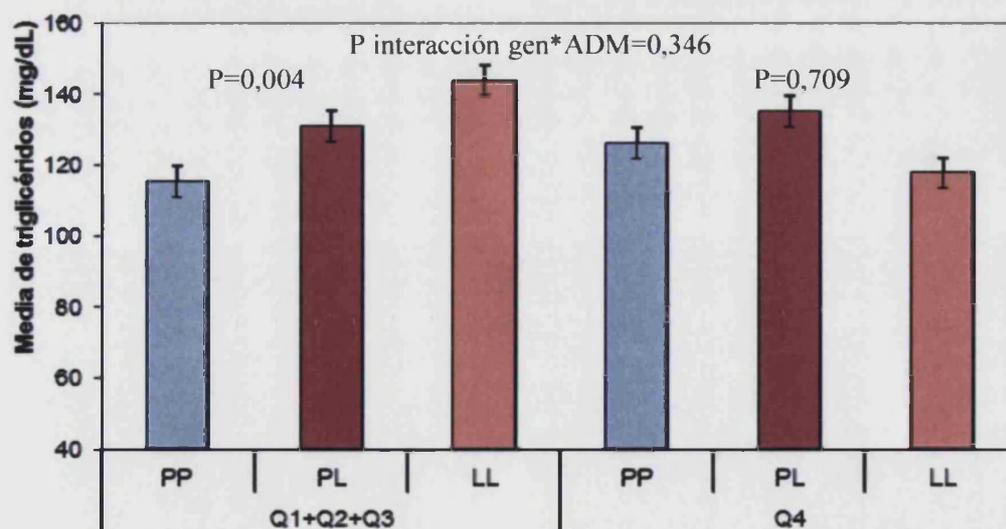


Figura 4.20 Valores de las medias estimadas de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo del rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* -adherencia a la dieta mediterránea. Valores de P ajustados por sexo, edad, obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta.

Por último, examinamos la asociación conjunta entre el SNP P446L y los principales alimentos que caracterizan la DM, basándonos en el cuestionario de 12 puntos, en relación a las concentraciones de TG (Tabla 4.69). Considerando el AOV como uno de los elementos más emblemáticos de la DM, los individuos que presentaban el mayor riesgo genético y el menor consumo de AOV tenían un 8,2 % más (21,86 mg/dl) de TG que aquellos con el alelo de no riesgo y mayor consumo de AOV (> 4 cucharadas) ($p=0,033$) (Figura 4.21).

Encontramos diferencias estadísticamente significativas para el consumo de verdura, carne, mantequilla, bebidas carbonatadas y FS ($p=0,012$, $p=0,017$, $p=0,039$, $p=0,036$, $p=0,038$). Los individuos con mayor riesgo genético (PL+LL) que tenían un consumo elevado de bebidas carbonatadas (<1/día), tenían 16,7 mg/dl más elevada las concentraciones de TG que aquellos el alelo PP y menor consumo de estas bebidas (≤ 1 día). Con respecto a los otros ítems principales que caracterizan la dieta mediterránea, aquellos individuos PL+LL que consumían menos de 2 raciones de verduras a la semana, o más de 1 vez al día de carne roja, o menos de 3 veces a la semana de FS tenían 26,3 (23%) o 5,1 (4,2%) o 10 (8,2%) mg/dL más alto las concentraciones de TG.

Tabla 4.69 Interacción y efecto conjunto de los principales componentes de la dieta mediterránea (14 puntos) y el polimorfismo del gen *GCKR* en las concentraciones de TG (mg/dL).

	PP		PL+LL		P para efectos conjuntos*	P alimento*
	Media	DT	Media	DT		
AOV (c/día)						
<4	127,7	7,2	144,4	6,4	0,035	0,116
≥4	115,3	5,1	132	3,6		
Verdura(r/día)^a						
<2	124,4	5,9	140,5	4,5	0,012	0,022
≥2	114,2	5,3	130,3	3,8		
Fruta incluyendo zumo natural (r/día)^b						
<3	117,5	5,5	133,6	4	0,084	0,931
≥3	118,7	5,7	134,8	4,3		
Carne roja, hamburguesa o productos derivados (r/día)^c						
≥1	109,4	7,7	125,3	7	0,017	0,035
<1	120,2	5,1	136	3,3		
Mantquilla, margarina o crema (r/día)^d						
≥1	106,2	9,7	122,5	8,9	0,039	0,145
<1	119,5	4,9	135,6	3,2		
Bebidas carbonatadas (r/día)^e						
≥1	113,2	9	129,8	7,9	0,036	0,896
<1	118,4	5	135,1	3,3		
Vino (r/semana)^f						
<7	116,5	5,1	125,4	6	0,051	0,230
≥7	125,4	7,6	141,7	6,7		
Legumbres (r/semana)^g						
<3	117,9	5,2	134,2	3,5	0,116	0,703
≥3	118,9	5,5	135,2	5,6		
Pescado/marisco (r/semana)^h						
<3	116,6	5,5	132,6	4,1	0,104	0,541
≥3	119,9	5,7	135,9	4,2		
Dulces/pastas (r/semana)ⁱ						
<2	118,5	6,3	134,7	5,1	0,101	0,476
≥2	118	5,2	134,3	3,6		
Frutos secos (r/semana)^j						
<3	116,1	5,2	132,5	3,5	0,038	0,314
≥3	122,5	6,6	138,9	5,5		
Consumo preferente de pollo, pavo, conejo en lugar de ternera, hamburguesa o embutido^k						
NO	112,4	6,8	128,6	5,7	0,099	0,480
SI	120	5,1	136,2	3,5		
Vegetales, pasta arroz con sofrito de verdura (r/semana)^l						
<2	117,2	5,7	133,6	4,4	0,088	0,693
≥2	118,4	5,5	134,7	3,9		

Los análisis han sido ajustados por edad, sexo, IMC, Tabaco, medicación para lípidos y diabetes.

DT, Descuación Típica, c, cucharadas; r, raciones.

^a Ración de verdure es 200 g

^b Ración de fruta es: 100-250 g

^c Racion de carne es: 100-150 g

^d Racion de mantequilla, margarina o crema es 12 g

^e Racion de bebidas carconatadas es 200 cc

^f Ración de vino es una copa, 100 cc

^g Ración de legumbres es 150 g

^h Ración de pescados es 100-150 g y 200g (4-5 unidades) para el marisco

ⁱ Ración de dulces y pasta es 50 g amenos que otra cosa se especifique en el cuestionario

^j Racion de FS 30 g

^k Racion de pollo 100 - 150 g

^l Ración de sofritos es 200 g

* P valor para log TG

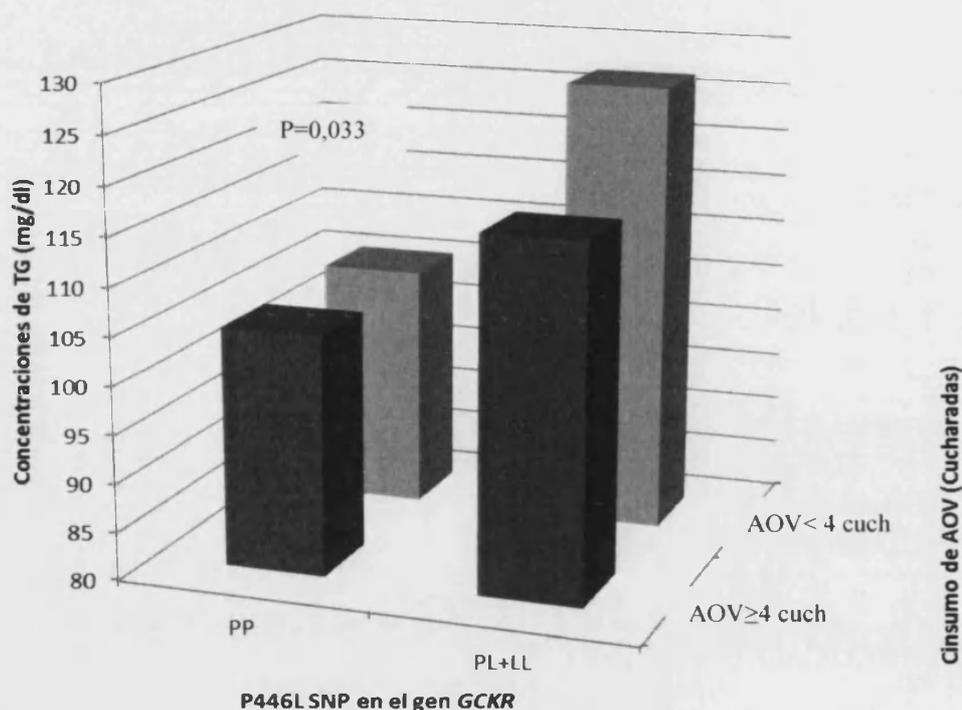


Figura 4.21 Concentraciones de TG de acuerdo con los efectos conjuntos del consumo de AOV (en cucharadas (cuch), <4cuch y ≥4 cuch) y el modelo genético dominante (PP vs PL+LL). Los análisis fueron ajustados por edad, sexo, IMC, Tabaco, diabetes y tratamiento hupolipemiente. (Artículo enviado para publicar, Sotos-Prieto M et al, BJN 2011)

4.2.4.5.5 POLIMORFISMO rs6950982 DEL GEN DE LA *SERPINE1*.

En el estudio de interacción del polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1* con la dieta, para ver el efecto de la adherencia a la dieta mediterránea, sobre las concentraciones de triglicéridos se observaron resultados significativos. Se observó que la asociación entre el polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1* y las concentraciones de triglicéridos no era homogénea para todos los cuartiles. De esta manera mientras que en los primeros cuartiles de dieta mediterránea (Q1, Q2 y Q3) sí que se observaba una asociación significativa entre el polimorfismo y las mayores concentraciones de triglicéridos (Figura 4.22) en el cuarto cuartil de mayor adherencia a la dieta mediterránea (Q4), los portadores del alelo mutado en homocigosis en el polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1* ya no presentaron significativamente mayores concentraciones de TG que los homocigotos normales y heterocigotos en dicho cuartil, sugiriendo un efecto beneficioso, al igual que en el caso del polimorfismo del promotor de la *APOA5*, de la dieta mediterránea en los portadores del alelo mutado en el polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1* para no incrementar sus concentraciones de triglicéridos debido a su mayor susceptibilidad genética.

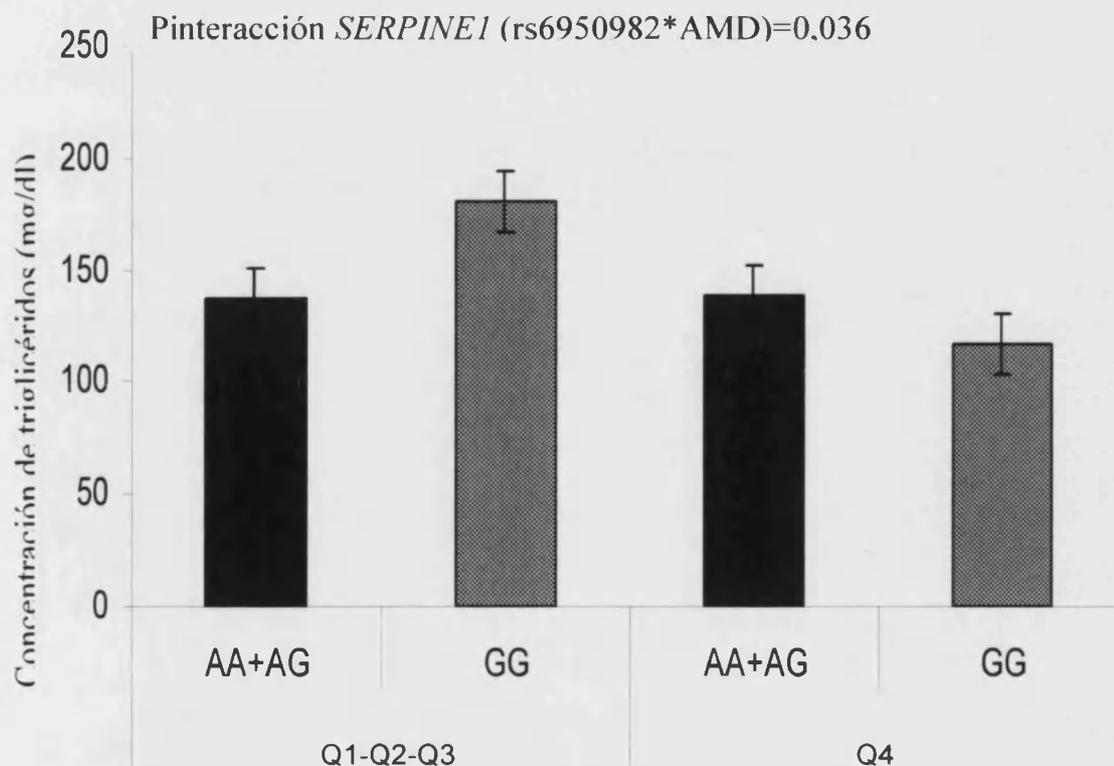


Figura 4.22 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo

rs6950982 del gen de la *SERPINE1*-adherencia a la dieta mediterránea. Valores de P estimados para logTG ajustados por sexo, edad y obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta. (Q1+Q2+Q3: Grupo 1,2,3 de adherencia a la dieta mediterránea; Q4: grupo 4 grupo mas alto de adherencia a la dieta mediterránea).

Asimismo, al igual que en los estudios de asociación, los valores de colesterol total, HDL-C permanecieron significativos tras ajustar por adherencia a dieta mediterránea (cuartiles), edad y sexo para el polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1* (P=0,012 colesterol total, 0,040 para HDL-C). No obstante, se observó una modulación del efecto del consumo de frutos secos en las concentraciones de triglicéridos según el polimorfismo, ya que tras ajustar por consumo de frutos secos las concentraciones de triglicéridos dejaron de ser significativos (P=0,070), es decir, no había diferencias significativas entre ser homocigoto mutado o no y las concentraciones de triglicéridos.

4.3 POBLACIÓN INDIMED (INTERVENCIÓN CON DIETA MEDITERRÁNEA)

4.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA ESTUDIADA

En esta sección se muestran las características generales de la muestra de la población general para el estudio de intervención nutricional INDIMED. En la muestra desarrollamos las características tanto antropométricas y bioquímicas como de edad, sexo, origen geográfico, estado civil, número de hijos, nivel de estrés laboral y de la vida cotidiana, y en las mujeres la edad de aparición de la menarquia.

Siguiendo el esquema para el estudio PREDIMED otras variables del estilo de vida y características sociodemográficas serán comentadas en otro apartado.

- **Sexo y edad**

La muestra estudiada, al inicio del estudio (a nivel basal), consta de un total de 133 participantes voluntarios. De ellos, y de acuerdo con el diseño del estudio y los criterios del estudio, 53 son hombres y 80 mujeres con edades comprendidas entre 25 y 55 años.

La media de edad global es de $38,9 \pm 9,4$, $39,5 \pm 9,6$ años para el grupo masculino y $38,5 \pm 9,3$ años en el grupo femenino.

- **Origen geográfico**

La mayoría de la población pertenece originariamente a la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha (provincia mayoritaria Albacete) seguida de la Comunidad de Valencia (provincia mayoritaria Valencia). En la figura 4.23 se muestra el origen según la comunidad autónoma de nacimiento.

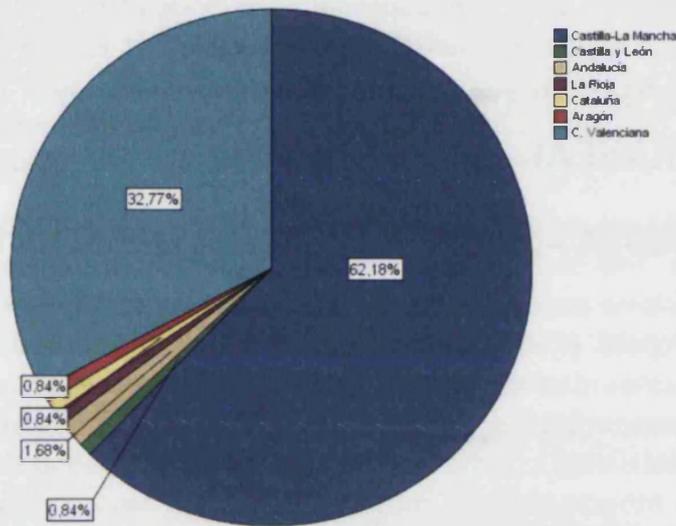


Figura 4.23 Origen geográfico según la comunidad autónoma de nacimiento en la población INDIMED.

- **Estado civil**

La situación civil de la población estudiada presenta un 36,9% de solteros, un 59% de casados y 4,1% de divorciados. No hubo diferencias estadísticamente significativas por sexo ($p=0,457$). En la figura 4.24 se presentan la situación civil por sexo.

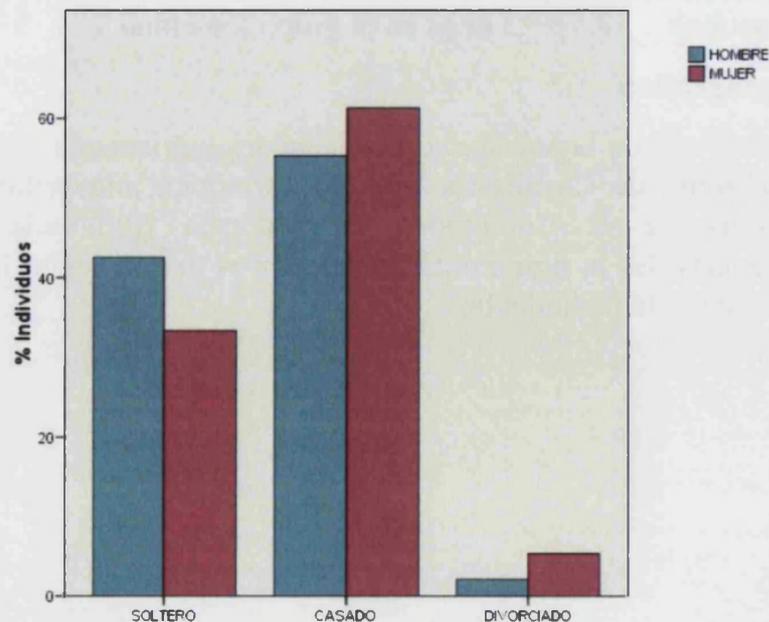


Figura 4.24 Situación civil según sexo en la población INDIMED.

- **Número de hijos**

En la muestra, la media de número de hijos es de $1,1 \pm 1,1$ por persona con un mínimo de 0 hijos y un máximo de 4 hijos, aunque esto sólo se halló en un individuo. La mayor parte de la población estudiada no tienen hijos (43,4%), un 31,1 % tiene 2 hijos, mientras que un 14,8 % tiene un hijo y 9,8% tres.

- **Nivel de estrés laboral y en la vida cotidiana**

Medido con una escala del 1 al 5, la media del estrés que produce el trabajo fue de $2,9 \pm 1,1$ sin diferencias significativas entre hombres y mujeres. Sin embargo, el estrés que produce la vida fue de $2,5 \pm 0,7$ en hombres y de $3 \pm 0,9$ en mujeres con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,003$).

- **Características antropométrica y bioquímicas en la muestra estudiada por sexo**

En la tabla 4.70 se reflejan los valores medios de los parámetros antropométricos y bioquímicos para el total de la población estudiada y según el sexo.

Tabla 4.70 Valores medios de los parámetros antropométricos y bioquímicos en la población general y por sexo.

Variable	Total (n=133)	Hombre(n=53)	Mujer(n=80)	p
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
Edad (años)	38,9 (9,4)	39,5 (9,6)	38,5 (9,3)	0,571
Peso (kg)	72,6 (13,3)	80,2 (10,1)	67,5 (12,7)	<0,001
Talla (m)	1,67 (0,09)	1,74 (0,07)	1,62 (0,06)	<0,001
IMC (kg/m ²)	26 (4,1)	26 (3,4)	25,6 (5,6)	0,222
% Grasa	27,9 (8,3)	22,0 (6,0)	31,8 (7,3)	<0,001
Grasa Visceral	6,4 (3,6)	8,3 (0,7)	5,1 (2,6)	<0,001
Cintura (cm)	87,3 (12,4)	83,8 (12,3)	87,3 (12,4)	<0,001
Cadera (cm)	103,7 (8,3)	102,8 (5,4)	104,3 (9,8)	0,320
Colesterol (mg/dL)	210,7 (40,1)	219,4 (41,8)	204,9 (38,2)	0,042
HDL-C (mg/dL)	62,3 (13,5)	56,5 (12,4)	66,2 (12,8)	<0,001
LDL-C (mg/dL)	127,8 (35,4)	136,5 (38,8)	122,1 (32,0)	0,022
TG (mg/dL)	102,0 (61,6)	130,3 (81,4)	83,3 (32,9)	<0,001
APOA (mg/dL)	164,5 (22,1)	156,2 (17,8)	169,4 (23)	0,005
APOB (mg/dL)	97,2 (26,5)	106,6 (30,6)	91,3 (21,8)	0,002
Lpa (mg/dL)	26,3 (7,6)	25,0 (25,6)	27,1 (26,4)	0,637
GOT (mg/dL)	22,8 (6,7)	26,2 (7,6)	20,5 (5,0)	<0,001
GPT (mg/dL)	22,8 (12,2)	29,7 (15,1)	22,8 (6,7)	<0,001
GTP (mg/dL)	22,9 (12,2)	29,7 (15,1)	18,5 (6,7)	<0,001
Acido úrico (mg/dL)	4,9 (1,3)	6,0 (1,2)	4,2 (0,8)	<0,001
Glucosa (mg/dL)	88,9 (9,5)	89,9 (11,4)	88,2 (8,0)	0,320
PCRus (mg/dL)	2,2 (3,3)	1,9 (2,0)	2,4 (3,9)	0,346
Insulina (mg/dL)	8,3 (5,6)	7,8 (4,9)	8,6 (6,0)	0,399

P valor para la comparación entre los grupos, prueba de la *t* de Student

• **Factores de riesgo cardiovascular y antecedentes clínicos en la muestra estudiada.**

En la tabla 4.71 se reflejan los antecedentes clínicos personales de las distintas enfermedades actuales o pasadas de la población general y por sexo así como los antecedentes familiares. Con respecto al consumo de medicamentos en esta muestra, se observó que el 4,9% seguía un tratamiento antihipertensivo, el 5,7% para la hipercolesterolemia sin diferencias entre sexo. El consumo de anticonceptivos o tratamiento hormonal sustitutivo alcanzó al 2,5%.

Tabla 4.71 Antecedentes clínicos en la población INDIMED.

Afección		Total (n=133)%	Hombre (n=53) %	Mujer (n=80) %	P*
Hipertensión	Participantes	6,6	6,5	6,7	0,643
	Padre	28,7	25,5	30,7	0,345
	Madre	27,9	17	34,7	0,026
	Hermanos	7,4	6,4	8	0,516
	Abuelos	12,3	10,6	13,3	0,444
Colesterol	Participantes	22,1	34	14,7	0,012
	Padre	23,8	27,7	0	0,279
	Madre	29,5	25,5	32	0,290
	Hermanos	18	25,5	13,3	0,073
	Abuelos	9	8,5	9,3	0,575
Diabetes	Participantes	0	0	0	
	Padre	13,1	12,8	13,3	0,579
	Madre	11,5	8,5	13,3	0,306
	Hermanos	4,1	2,1	5,3	0,359
	Abuelos	23,8	27,7	21,3	0,279
Enfermedad del corazón	Participantes	0,8	2,1	0	0,385
	Padre	8,2	10,6	6,7	0,325
	Madre	7,4	8,5	6,7	0,481
	Hermanos	0	0	0	
	Abuelos	21,3	19,1	22,7	0,411
Obesidad	Participantes	13,1	12,8	13,3	0,579
	Padre	11,5	14,9	9,3	0,256
	Madre	9	8,5	9,3	0,575
	Hermanos	13,1	10,6	14,7	0,363
	Abuelos	7,4	6,4	8	0,519
Cancer	Participantes	0	0	0	
	Padre	13,1	12,8	13,3	0,579
	Madre	9,8	10,6	9,3	0,522
	Hermanos	4,1	6,4	2,7	0,289

*P valor para la comparación entre los grupos, prueba de la t de Student

En esta población dentro de las características de la muestra, se decidió hacer sub-apartados dado que en este estudio el cuestionario general recogía información mas detallada acerca de la obesidad, antecedentes y parámetros relacionados y hábitos dietéticos que son interesantes desde un punto de vista descriptivo.

4.3.1.1 OTRAS CARACTERÍSTICAS GENERALES: OBESIDAD Y FACTORES RELACIONADOS EN LA MUESTRA

4.3.1.1.1 PREVALENCIA DE OBESIDAD

El porcentaje de la muestra con un Índice de Masa Corporal entre 25-29,9 kg/m² (sobrepeso) es del 41,4% y con un IMC mayor a 30 Kg/m² es el 15,8% (obesidad). En la tabla 4.70 se presenta la distribución del IMC por sexo según los distintos grados de exceso de peso.

Respecto a la obesidad abdominal, siguiendo los criterios de marcador de riesgo de la ATPIII el 22,6% de los hombres presentaron un perímetro de cintura superior a 102 cm y el 36,3 % de las mujeres una cintura superior a 88 cm. El 3,8 % de los hombres presentó un índice cintura/cadera de riesgo (ICC>1) y el 28,8% de las mujeres presentó un ICC>0,85 o de riesgo.

4.3.1.1.2 OBESIDAD EN LA INFANCIA

Del total de la muestra el 7,2% de los encuestados refiere haber estado obeso durante la infancia. En la tabla 4.70 se muestran las diferencias por sexo.

4.3.1.1.3 MANTENIMIENTO DEL PESO

El 24,7 de la población refiere haber tenido variaciones en cuanto al mantenimiento o conservación de su peso corporal. En la tabla 4.70 se presentan las diferencias entre sexo.

4.3.1.1.4 ANTECEDENTES DE OBESIDAD

El 15,5% de los propios sujetos de la muestra refería haber tenido algún antecedente de exceso de peso en cualquier momento de su vida. En la tabla 4.70 se reflejan las diferencias entre sexo.

4.3.1.1.5 ANTECEDENTES FAMILIARES DE OBESIDAD

En la tabla 4.72 se reflejan los antecedentes de obesidad en los familiares mas directos (padres, hermanos, hijos, abuelos y tíos) asó como las diferencias entre sexo

Tabla 4.72 Obesidad, factores relacionados y antecedentes familiares en la población INDIMED general y por sexo.

Variable	Total (%)	Hombres (%)	Mujeres (%)	p
IMC 25-29,9 (Kg/m ²)	41,4	50,9	35	0,164
IMC>30	15,8	15,1	16,3	0,530
Obesidad en la infancia	7,2	8,3	6,6	0,519
No conservación del peso	24,7	24,6	25	0,574
<i>Padre</i>	11,5	14,9	9,3	0,256
<i>Madre</i>	9	8,5	9,3	0,575
<i>Hermanos</i>	13,1	10,6	14,7	0,363
Obesidad				
<i>Abuelos</i>	7,4	6,4	8	0,519
<i>Hijos</i>	0	0	0	
<i>Él mismo</i>	15,5	16,7	14,8	0,508

P: valor de probabilidad en la comparación entre los grupos; prueba de la *t* de Student

4.3.1.1.6 EDAD EN LA QUE AUMENTÓ DE PESO

La edad media en la que los participantes indicaron aumentar de peso fue $28,8 \pm 10,5$ siendo menor en los hombres ($26,9 \pm 9,5$ años) que en las mujeres ($29,8 \pm 11,1$) sin diferencias significativas ($p=0,317$).

4.3.1.1.7 SITUACIÓN EN LA QUE AUMENTÓ EL PESO

Respecto a la situación en la que la muestra estudiada manifestaba haber aumentado de peso destacan 4 momentos: los embarazos (23,2%), la menopausia, no sabe (18,8%), vida mas sedentaria y dejar de fumar con el mismo porcentaje (8,7%) y con la evolución de la edad (5,8 %). En la figura 4.25 se observan las distintas situaciones en las que aumentaron de peso los pacientes según su sexo.

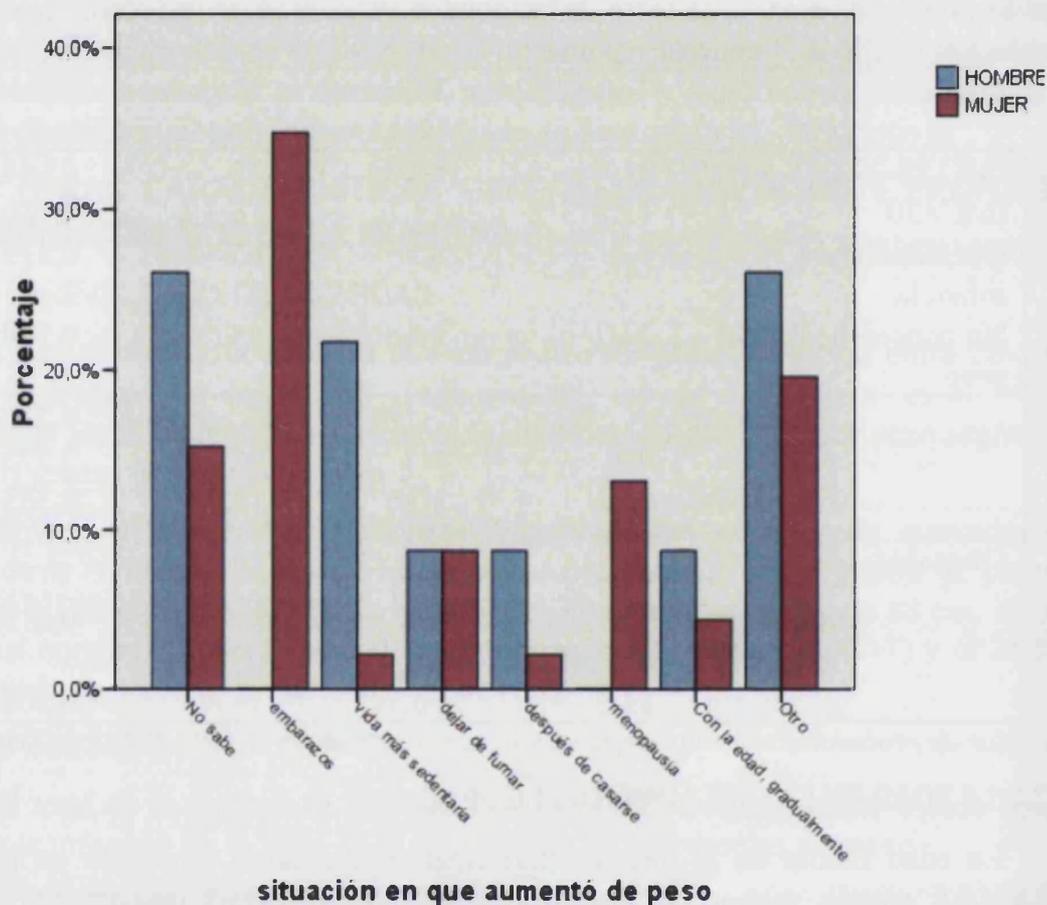


Figura 4.25 Razones por las cuales aumentaron de peso.

4.3.1.2 HÁBITOS DIETÉTICOS

4.3.1.2.1 TIPO DE ACEITE EMPLEADO PARA COCINAR

Para cocinar el 54,2% de la población emplea el aceite de oliva virgen, un 43,8% aceite de oliva, el 0,8% de girasol.

Para aliñar las ensaladas el 78,5% de la muestra emplea el aceite de oliva virgen, un 21,5% de aceite de oliva refinado.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre sexos en la utilización de aceite para cocinar ni en el aceite para aliñar las ensaladas ($p > 0,05$).

4.3.1.2.2 ELIMINACIÓN DE LA GRASA ANTES DE COMER

El 58,7% de los individuos quita la grasa de la carne frente a un 11,6% que no, y un 29,8% la elimina en algunas ocasiones. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos ($p < 0,001$).

4.3.1.2.2.3 PREFERENCIA EN LA ELABORACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Los alimentos cocinados a la plancha son los mayoritariamente preferidos (71,1%). El 21,5% prefieren los fritos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre sexos ($p=0,550$).

4.3.1.2.2.4 VALORACIÓN PERSONAL DE LOS HáBITOS DIETÉTICOS

El 67,8% de los participantes cree tener una alimentación saludable, un 5,8% piensa que su alimentación es regular y también un 5,8% piensa que podría ser mejor. En la tabla 4.73 se observa la valoración por sexo.

4.3.1.2.2.5 REALIZACIÓN DE DIETAS

La gran mayoría de la población del estudio no realizaba ningún tipo de dieta (95,9%) tal y como era de esperar dados los criterios de inclusión. El 3,3% manifestó estar realizando algún tipo de dieta, sin embargo, cuando se les preguntó qué tipo de dieta, la respuesta se refería más bien al hecho de intentar llevar una alimentación saludable rica en frutas y verduras que a estar siguiendo estrictamente una dieta.

4.3.1.2.2.6 CAMBIOS EN LA ALIMENTACIÓN

El 71,1% de la muestra refiere haber comido más o menos siempre igual. Las diferencias por sexo se muestran en la tabla 4.73. El cambio más frecuente ha sido reducir la cantidad de alimentos (24,1%). Sin embargo, el 20,7% también señalan haber aumentado la cantidad de alimento. Los siguientes motivos más destacados son la reducción de la cantidad de grasa y dulces y el aumento de fruta (con una prevalencia de 6,9% para cada uno de los motivos).

Tabla 4.73 Hábitos dietéticos por sexo en la población de Indimed por sexo.

Variable	Total (%)	Hombres (%)	Mujeres (%)	P	
<i>Elimina la grasa de la carne</i>	58,7	36,2	73	<0,001	
<i>Preferencia al cocinar</i>	<i>A la plancha</i>	71,1	72,3	70,3	0,550
	<i>Fritos</i>	21,5	42,3	57,7	0,610
<i>Realiza alguna dieta</i>	3,3	6,4	1,4	0,237	
<i>Valoran sana su alimentación</i>	67,8	68,1	67,6	0,258	
<i>No han cambiado su alimentación</i>	71,1	70,2	71,6	0,513	

p: valor de probabilidad en la comparación entre los grupos; prueba de la t de Student.

4.3.1.2.7 ¿RESPETA TODAS LAS COMIDAS?

Respecto al desayuno el 79,3% de la población total estudiada desayunaba todos los días. En la figura 4.26 se muestran las diferencias por sexo ($p=0,562$).

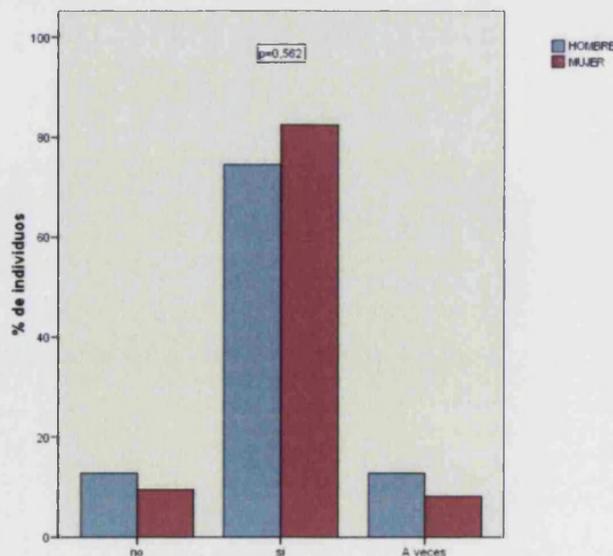


Figura 4.26 Desayuna todos los días según sexo.

Casi la mitad de la población estudiada (49,6%) almorzaba. No hay diferencias significativas para el consumo del almuerzo por sexo (figura 4.27).

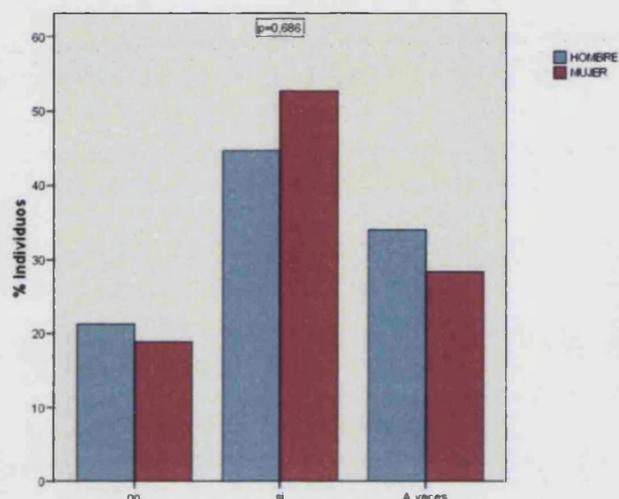


Figura 4.27 Almuerza todos los días según sexo

La comida del medio día es la más respetada, el 97,5% de la población estudiada la realizaba, sin diferencias entre sexo ($p=0,690$).

La comida menos respetada es la merienda. Sólo el 29,4% la realiza. En la figura 4.28 se aprecian las diferencias por sexo.

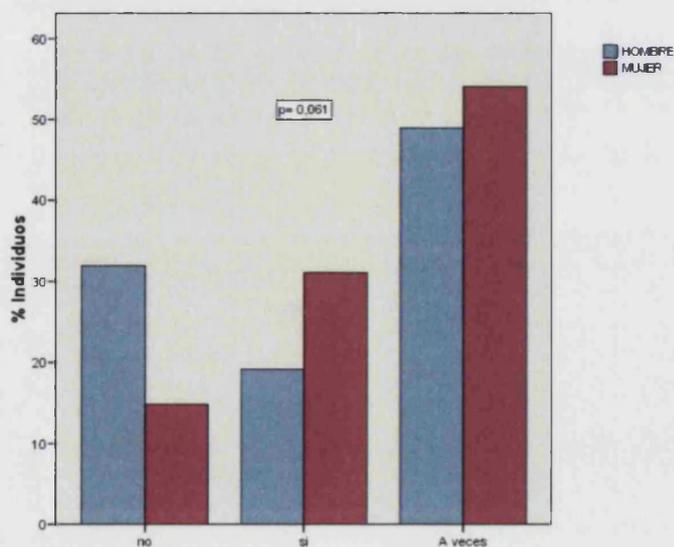


Figura 4.28 Merienda todos los días según sexo

La segunda comida del día en importancia fue la cena (82,6%). Sin diferencias entre sexos (figura 4.29).

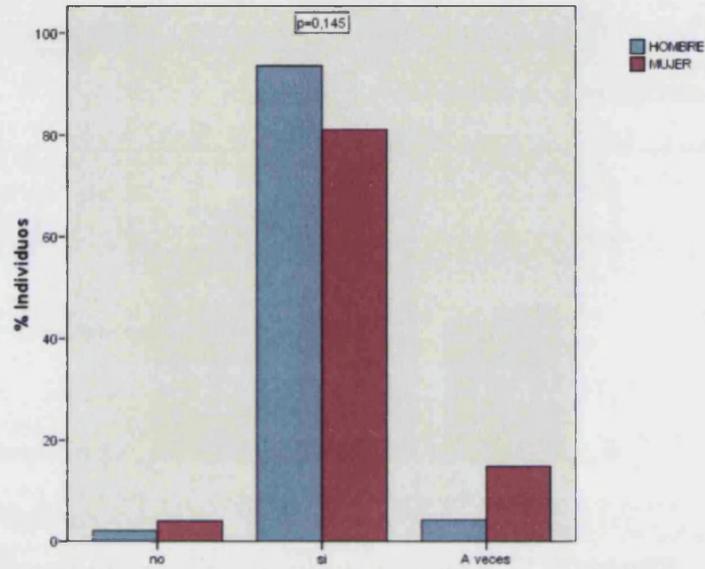


Figura 4.29 Cena todos los días según sexo

4.3.1.2.1 8 COMIDA MÁS ABUNDANTE

La comida es la comida mas abundante de todas (82,6%), un 5,8% respondió que la cena es la comida mas abundante y un 4,1% la comida y la cena y solo el 3,3% el desayuno. En la figura 4.30 se representan las diferencias observadas entre sexo ($p=0,100$).

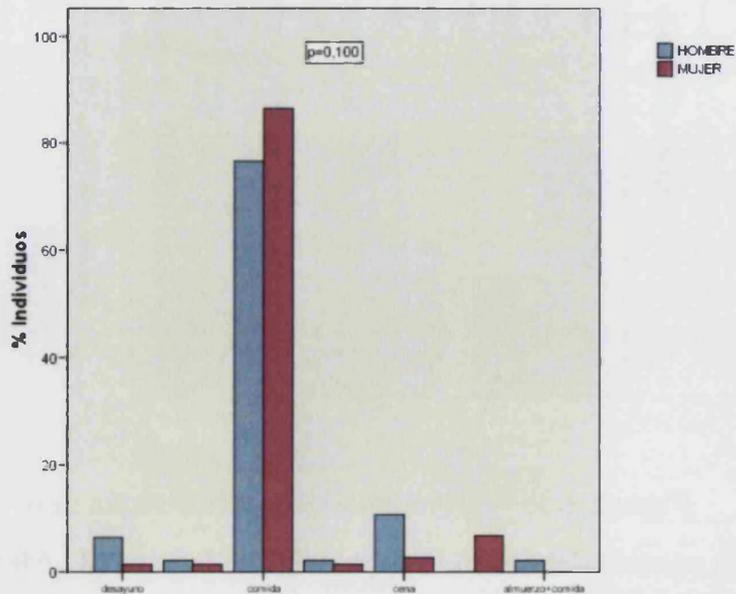


Figura 4.30 Comida más abundante según sexo.

4.3.1.2.9 HÁBITO DE PICAR ENTRE COMIDAS

El 22% de la población estudiada contestó que nunca pica entre horas, el 28,9% habitualmente, el 38% los fines de semana y el 9,1% a veces. En la figura 4.31 se muestran las diferencias por sexo.

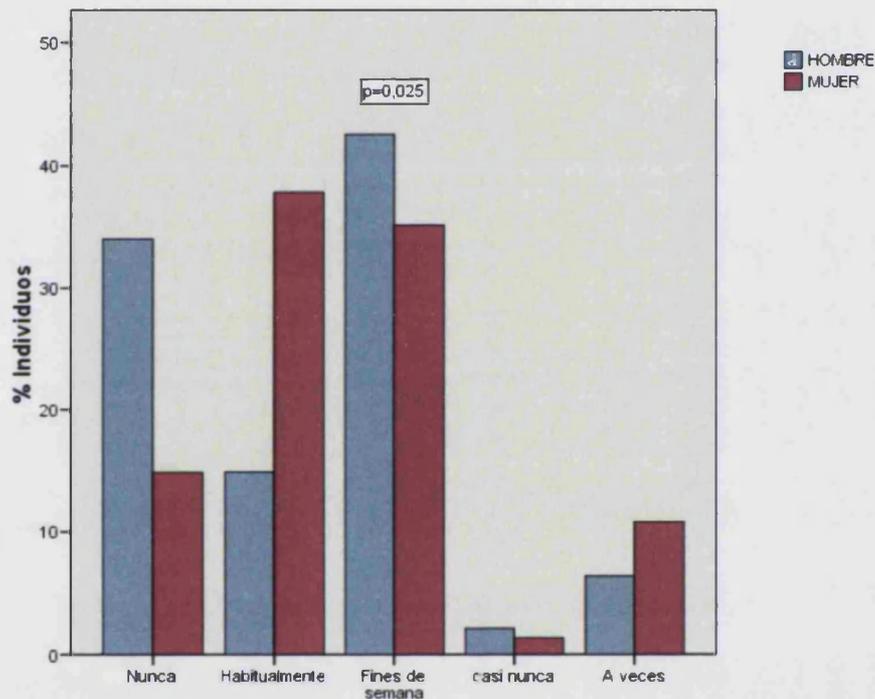


Figura 4.31 Momento en el que pica entre comidas según sexo.

4.3.2 VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTILO DE VIDA Y CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA MUESTRA SELECCIONADA. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

4.3.2.1 ACTIVIDAD FÍSICA

PREVALENCIA

El 59,2% de los participantes del estudio INDIMED caminan más de 30 minutos al día. No hubo diferencias significativas por sexo (mujeres que caminan más de 30 minutos 64,4 % vs hombres: 51,1%, $p=0,184$).

En el cuestionario general, a los participantes se les preguntó sobre la actividad física que realizaban a la semana (máximo 4 tipos diferentes).

En las figuras 4.32, 4.33, 4.34 se observa el *tipo de actividad practicado* según sexo.

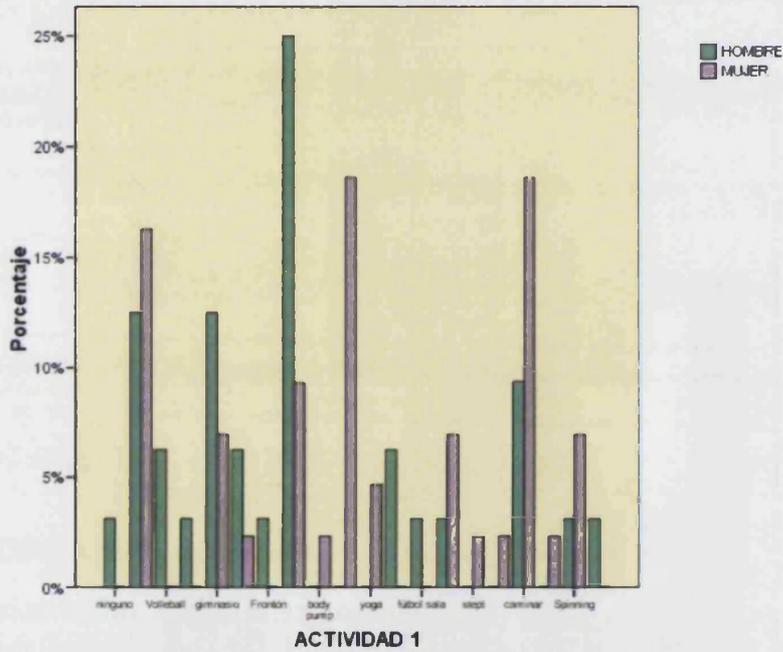


Figura 4.32 Frecuencia del tipo de actividad practicada por sexo para la ACTIVIDAD 1.

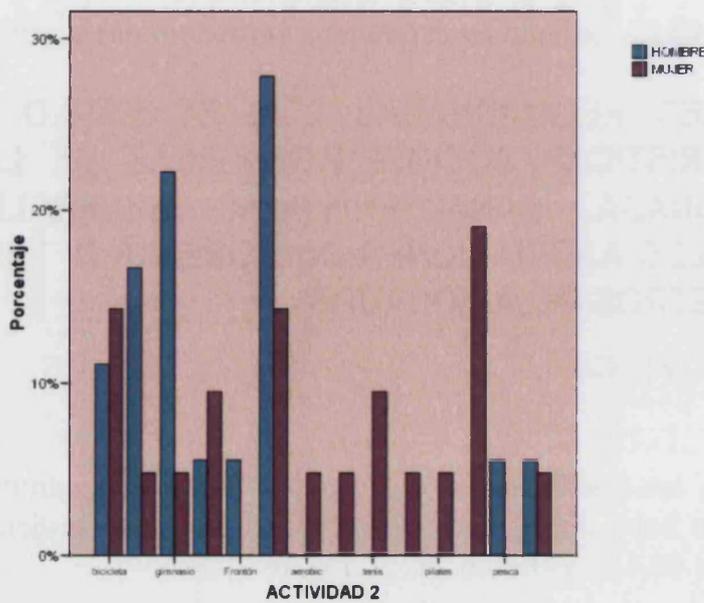


Figura 4.33 Frecuencia del tipo de actividad practicada por sexo para la ACTIVIDAD 2.

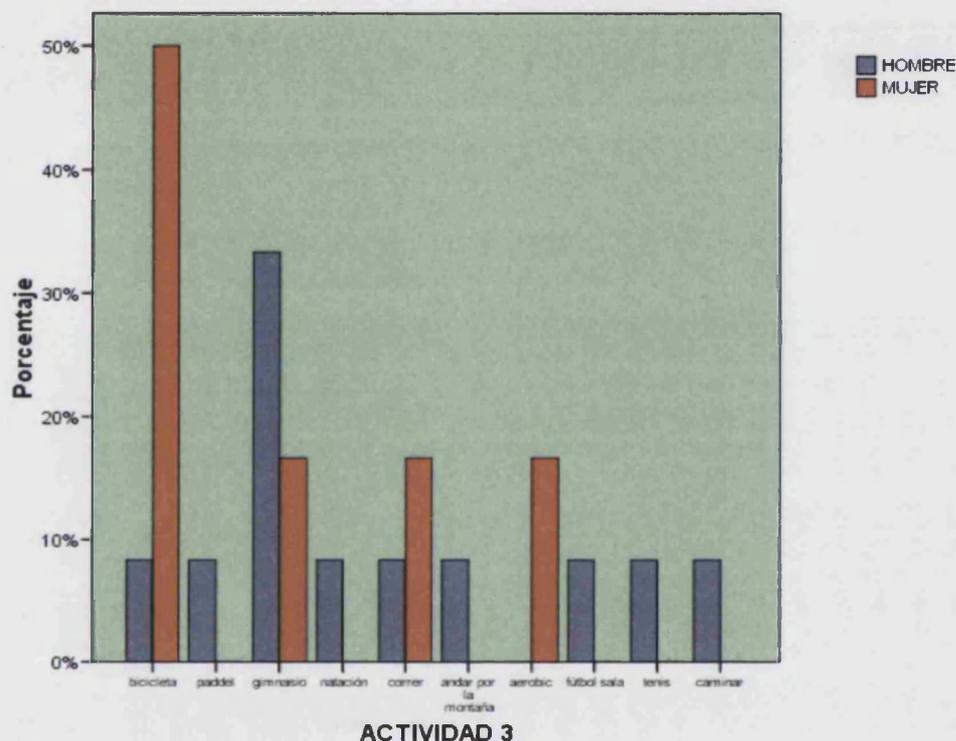


Figura 4.34 Frecuencia del tipo de actividad practicada por sexo para la ACTIVIDAD3.

El *tiempo dedicado* a la semana para la actividad 1 de media fue $51 \pm 25,0$ minutos durante dos días a la semana, actividad 2 $52,5 \pm 51,3$ minutos durante 2 días a la semana, o actividad 3 $48,3 \pm 31,3$ minutos durante 3 días a la semana. En este último caso, solo 18 individuos realizaron una tercera actividad. Solo se observaron diferencias significativas entre sexo para el tiempo dedicado a la ejercicio 3 (hombres: $60 \pm 31,6$; mujeres: $25 \pm 12,6$ minutos, $p=0,020$).

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.74 se presentan las variaciones de los parámetros antropométricos en función de la actividad física, variable dicotómica (sedentario/no sedentario) considerando sedentario aquellos que no hacían ninguna actividad y los que no andaban ni 30 min día. No se observan diferencias significativas. Tras ajustar por sexo y edad no se obtuvieron cambios en la significación estadística.

Tabla 4.74 Parámetros antropométricos en función de la actividad física.

	IMC (kg/m ²)	Peso (kg)	%grasa	Grasa viscerl	Cintura (cm)	Cadera (cm)
Sedentario	26,6 (4,1)	73,9 (11,9)	27,8 (9,2)	6,8 (3,3)	89,0 (12,1)	104,2 (7,9)
No sedentario	25,4 (4,0)	70,3 (13,6)	27,9 (7,5)	6,1 (3,8)	85,5 (12,1)	102,5 (8,0)
P	0,129	0,139	0,908	0,309	0,130	0,241

Los valores están expresados como media y (desviación estándar). P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos. IMC: Índice de Masa Corporal

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.75 se presentan las variaciones de la concentración de triglicéridos y parámetros relacionados en función de la actividad física, variable dicotómica (sedentario/no sedentario) considerando sedentario aquellos que no hacían ninguna actividad y los que no andaban ni 30 min día. Se observan diferencias significativas para las concentraciones de triglicéridos de manera que los que no eran sedentarios presentaban menores concentraciones. Para el resto de las variables estudiadas, la actividad física afecta positivamente en todas las variables a pesar de no alcanzar la significación estadística. Tras ajustar por sexo y edad no se obtuvieron cambios en la significación estadística.

Tabla 4.75 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función de la actividad física.

	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	APOA (mg/dL)	APOB (mg/dL)	Lp(a) (mg/dL)
Sedentario	119,6 (80,1)	218,0 (38,9)	61,7 (13,8)	132,0 (36,6)	162,2 (23,3)	100,7 (25,6)	17,6 (29,1)
No sedentario	91,0 (45,3)	208,6 (40,2)	63,7 (14,0)	126,8 (35,2)	166,9 (20,9)	93,5 (24,8)	16,4 (25,3)
P	0,007	0,210	0,458	0,440	0,324	0,146	1,799

Los valores están expresados como media y (desviación estándar). P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos TG: triglicéridos, CT: colesterol total, APOA: apolipoproteína A, APOB: apolipoproteína B, Lp(a): lipoproteína(a).

4.3.2.2 TABACO

PREVALENCIA

El porcentaje de fumadores, ex-fumadores y no fumadores se presenta en la figura 4.35. No se observan diferencias significativas entre sexos (mujeres fumadoras en la actualidad 20,3 vs hombres 19,3 %).

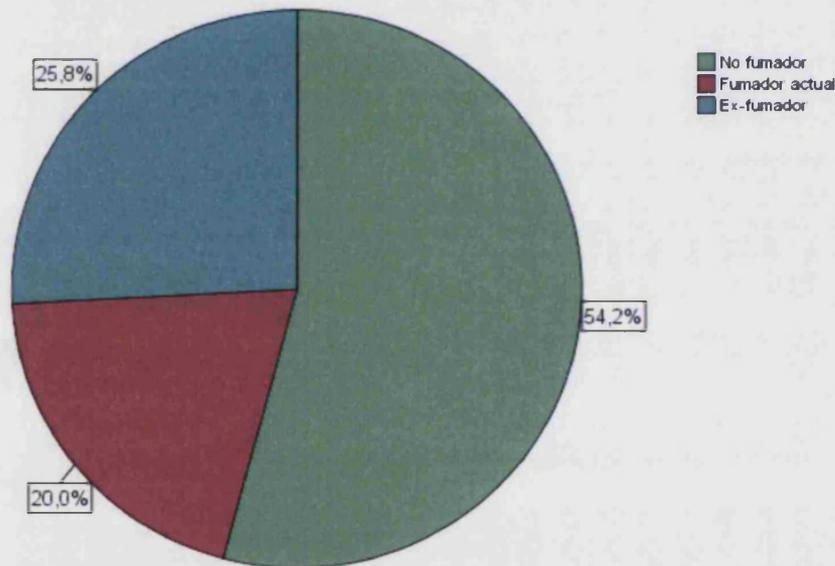


Figura 4.35 Porcentaje de fumadores en la actualidad, no fumadores y exfumadores. (INDIMED).

Respecto al *número de cigarrillos*, entre las personas que fuman en la actualidad, fuman de media $7,6 \pm 6,1$ cigarrillos al día. Los exfumadores fumaban $11,7 \pm 7,3$ cigarrillos al día. No se observaron diferencias significativas por sexo.

Respecto al *tiempo que fuman*, los fumadores actuales llevan una media de $17,6 \pm 8,1$ años fumando. Los exfumadores hace $9,5 \pm 9,6$ años que dejaron de fumar y cuando lo hicieron estuvieron $13,1 \pm 8,9$ años.

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.76 se presenta la influencia del hábito tabáquico en las variaciones de los parámetros antropométricos. Para ello se utilizó la variable fumador/no fumador en la actualidad.

Tabla 4.76 Parámetros antropométricos en función del hábito tabáquico.

	IMC (kg/m ²)	Peso (kg)	%grasa	Grasa visceral	Cintura (cm)	Cadera (cm)
Fumador	26,3 (4,8)	72,8 (15,7)	27,9 (15,7)	6,6 (4,2)	87,6 (15,3)	103,7 (10,4)
No fumador	25,8 (3,9)	71,6 (12,3)	28,0 (8,1)	6,3 (3,5)	86,9 (11,3)	103,2 (7,4)
P	0,560	0,704	0,975	0,683	0,803	0,794

Los valores están expresados como media y (desviación estándar). P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos IMC: Índice de Masa Corporal

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.77 se presenta la influencia del hábito tabáquico en las variaciones de las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados. Para ello se utilizó la variable fumador/no fumador en la actualidad. En general se observa un efecto desfavorable de ser fumador aunque no se alcanzó la significación estadística en crudo ni tras ajustar por sexo y edad.

Tabla 4.77 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del hábito tabáquico.

	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	APOA (mg/dL)	APOB (mg/dL)	Lp(a) mg/dL)
Fumador	106,3 (81,5)	207,5 (44,7)	58,0 (11,1)	127,5 (37,4)	157,1 (18,9)	95,9 (27,4)	18,3 (23,5)
No fumador	101,3 (58,1)	213,5 (39,0)	64,1 (14,2)	129,1 (35,4)	166,9 (22,1)	96,6 (25,3)	16,6 (27,1)
P	0,836	0,516	0,051	0,845	0,073**	0,901	1,788

Los valores están expresados como media y (desviación estándar). P valor, significación estadística $P < 0,05$ para la comparación entre grupos. TG: triglicéridos, CT: colesterol total, APOA: apolipoproteína A, APOB: apolipoproteína B, Lp(a): lipoproteína(a). **valor de p tras ajustar por sexo y edad.

4.3.2.3 NIVEL DE ESTUDIOS

PREVALENCIA

Respecto al nivel de estudios el 32% realizó estudios primarios (27,7% hombres y 34,7% mujeres), un 25,4 % bachiller (38,3% hombres y 17,3 mujeres), un 16,4% había terminado alguna diplomatura o ingeniería técnica (12,8% hombres y 18,7% mujeres) así como un 26,2% de la muestra con una licenciatura (21,3% hombres y 29,3% mujeres). No se encontraron diferencias significativas entre sexo ($p=0,080$).

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.78 se presentan las variaciones en los parámetros antropométricos en función del nivel de estudios. Los valores de IMC, peso, % de grasa, grasa visceral y cintura son menores cuanto mayor es el nivel de estudios. Tras ajustar por edad y sexo, permanecieron significativos el IMC ($p=0,013$), % grasa ($p=0,007$), cintura ($p=0,010$) y cadera ($p=0,043$).

Tabla 4.78 Parámetros antropométricos en función del nivel de estudios de la muestra estudiada

	IMC (kg/m ²)	Peso (kg)	%grasa	Grasa visceral	Cintura (cm)	Cadera (cm)
Estudios primarios	27,4 (4,0)	72,8 (12,7)	30,9 (7,7)	8,2 (3,0)	91,6 (9,9)	104,4 (8,6)
Bachiller	26,7 (3,9)	76,7 (13,3)	27,4 (8,0)	7,3 (3,8)	90,4 (13,6)	104,2 (7,3)
Diplomatura o Ing. Técnica	24,6 (3,2)	68,4 (10,3)	28,0 (8,1)	4,4 (2,4)	82,0 (10,7)	102,0 (6,9)
Licenciatura	24,1 (3,9)	68,4 (10,3)	24,8 (8,4)	4,5 (3,2)	81,2 (10,9)	81,2 (10,9)
P*	<0,001	0,025	0,005	<0,001	<0,001	0,116

Los valores están expresados como media y (desviación estándar). P valor, significación estadística $P<0,05$ para la comparación entre grupos IMC: índice de masa corporal. *Valor de P de tendencia lineal.

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.79 se presentan las variaciones en la concentración de triglicéridos y parámetros relacionados en función del nivel de estudios. La concentración de triglicéridos, de colesterol total, de HDL-C y APOB es menor cuanto mayor es el nivel de estudios. Sin embargo, tras ajusta por sexo y edad solo se mantuvo la significación estadística en el caso de la concentración de triglicéridos ($p=0,021$).

Tabla 4.79 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del nivel de estudios de la muestra estudiada

	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	APOA (mg/dL)	APOB (mg/dL)	Lp(a) (mg/dL)
Estudios primarios	115,7 (73,1)	232,7 (42,6)	63,4 (13,4)	146,1 (37,3)	170,2 (23,4)	107,5 (26,5)	28,1 (29,7)
Bachiller	99,1 (53,5)	211,6 (33,7)	60,9 (12,6)	130,8 (33,4)	159,1 (17,7)	99,9 (24,2)	30,3 (28,4)
Diplomatura o Ing. Técnica	107,3 (77,1)	187,8 (23,6)	58,4 (12,6)	108,0 (25,3)	155,5 (16,9)	79,5 (16,9)	21,5 (18,7)
Licenciatura	85,4 (44,4)	203,2 (40,0)	67,2 (15,6)	119,0 (32,0)	170,4 (22,7)	89,6 (23,7)	25,7 (26,0)
P	0,018*	<0,001	0,120	<0,001	0,056	<0,001	0,694

Los valores están expresados como media y (desviación estándar). P valor, significación estadística $P<0,05$ para la comparación entre grupos TG: triglicéridos, CT: colesterol total, APOA: apolipoproteína A, APOB: apolipoproteína B, Lp(a): lipoproteína(a) *Valor de P de tendencia lineal.

4.3.2.4 SITUACIÓN LABORAL

PREVALENCIA

En cuanto al puesto de trabajo de los participantes del estudio está bastante distribuido en distintas ocupaciones destando el grupo de administrativos con el 18,9% de la población. En las mujeres destaca tanto el grupo de científicos e intelectuales como administrativos con el mismo porcentaje (20%). En hombres, destaca el grupo de técnicos de apoyo y administrativos (ambos con 17%). El 8,2% son amas de casa, el 4,1% estudiantes y un 2,5% de personas sin ocupación laboral en la actualidad. El porcentaje restante se distribuye en distintas ocupaciones (dirección de empresas (8,2%), servicios de restauración (12,3%), construcción (4,1%), montadores de máquinas (0,8%), trabajos no cualificados (9,8%). Se observaron diferencias significativas entre sexo para profesiones comúnmente sexualizadas como amas de casa o construcción. Además, en cuanto al trabajo no cualificado, el 2,1% de hombres frente a un 14,7%.

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

Tras analizar la situación laboral, destacar que se observaron diferencias significativas en peso y la grasa visceral. Los valores fueron mayores en aquellas personas que se encontraban en paro ($p=0,025$ y $p=0,013$ respectivamente).

PRINCIPALES ASOCIACIONES CON TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

Tras analizar la situación laboral, destacar que se observaron concentraciones de HDL-C y CT mas alto en aquellas personas que estaban en paro ($p=0,022$ y $p=0,005$ respectivamente).

4.3.3 CONSUMO DE ALIMENTOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO INDIMED

En la tabla 4.80 se muestran las características de la dieta de la población general, hombres y mujeres en cuanto al aporte de principios inmediatos y energía total. Existen diferencias en el consumo de energía entre hombres y mujeres ($p=0,031$) y también en el consumo hidratos de carbono ($p=0,026$).

Tabla 4.80 Caracterización general de la dieta en la población general de estudio

	TOTAL		HOMBRE		MUJER	
	Media (DT)		Media (DT)		Media (DT)	
Energía total (Kcal/d)	2294,7 (759,3)		2485,8 (799,9)		2176,9 (713,5)	
	g/día	%	g/día	%	g/día	%
Hidratos de carbono	273,7 (95,5)	47,7 (7,3)	297,2 (102,1)	48,1 (7,5)	257,2 (88,3)	47,5 (7,3)
Proteínas	95,3 (32,8)	16,8 (2,9)	102,1 (38,8)	16,5 (2,6)	91,1 (27,1)	17,1 (3,1)
Lípidos						
Total	92,9 (37,1)	36,4 (7,0)	96,1 (36,1)	35,1 (6,8)	90,8 (37,1)	37,2 (7,0)
AGMI	42,4 (15,0)	16,9 (3,7)	42,6 (14,6)	15,7 (3,5)	42,3 (15,0)	17,6 (3,1)
AGPI	18,3 (10,0)	7,1 (2,4)	19,5 (10,9)	7,0 (2,6)	17,7 (9,5)	7,1 (2,2)
AGS	30,8 (19,7)	11,6 (4,6)	32,5 (19,9)	11,5 (4,9)	29,7 (19,1)	11,7 (4,6)

DT: desviación estándar, AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; AGS: Ácidos grasos saturados

4.3.3.1 CONSUMO DE ALIMENTOS Y GRUPOS DE ALIMENTOS POR SEXO

En las tablas 4.81 y 4.82, 4.83, 4.84, 4.85, 4.86 y 4.87 se muestran las medias de frecuencia de consumo semanal de diversos alimentos por sexo agrupados por grupos de alimentos (lácteos, cereales, legumbres, carnes, pescados, verduras y hortalizas, aceites y grasas y dulces y bollería). Tras un análisis de comparación de medias se obtuvieron diferencias significativas por sexo. Los hombres presentaron un mayor consumo de pan blanco, cordero, salchichón,

pescado azul y almendras mientras que las mujeres presentaron un mayor consumo de fideos, lechuga, tomate, pera, kiwi, cacahuets, aceite de oliva refinado.

Por grupos de alimentos, los hombres presentaron un consumo superior de frutos secos, fiambres y embutidos, pescado (pescado azul), y las mujeres de grasas.

Tabla 4.81 Consumo expresado en veces por semana de lácteos en la población.

	Total (n=133)	Hombres (n= 53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
Leche entera	4,2 (5,1)	4,8 (6,2)	3,9 (4,3)	0,449
Leche desnatada o semidesnatada	9,6 (7,0)	9,2 (7,7)	9,9 (6,5)	0,596
Yogur entero	3,9 (4,4)	3,8 (5,1)	3,9 (3,8)	0,857
Yogur desnatado o semidesnatado	4,1 (4,2)	3,7 (4,2)	4,3 (4,2)	0,616
Queso curado	4,5 (4,0)	4,7 (4,3)	4,3 (3,9)	0,668
Requeson	3,0 (2,5)	3,3 (2,7)	2,8 (2,3)	0,433
Batido de soja	6,3 (7,2)	4,5 (6,8)	7,4 (7,4)	0,347
Horchata	0,8 (1,5)	1,1 (2,0)	0,5 (1,1)	0,139
Café con leche	7,3 (6,0)	7,5 (6,3)	7,2 (5,9)	0,857
Café cortado	5,9 (5,8)	7,1 (6,4)	5,1 (5,3)	0,121

*Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: Desviación estándar

Tabla 4.82 Consumo expresado en veces por semana de cereales y legumbres en la población.

	Total (n=133)	Hombres (n=53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
<i>Cereales</i>				
Pan blanco	7,1 (6,2)	8,7 (7,2)	5,9 (5,2)	0,017
Pan integral	3,5 (4,2)	5,0 (6,3)	2,8 (2,7)	0,064
Rosquilletas	1,9 (2,5)	1,3 (2,1)	2,1 (2,6)	0,213
Arroz	3,4 (2,5)	3,3 (2,4)	3,5 (2,6)	0,688
Paella	4,3 (2,4)	4,0 (2,4)	4,5 (2,4)	0,328
Macarrones	3,5 (2,3)	3,3 (2,3)	3,7 (2,3)	0,326
Fideos	3,4 (2,5)	2,8 (2,4)	3,8 (2,4)	0,023
<i>Legumbres</i>				
Lentejas	3,8 (2,5)	3,8 (2,4)	3,8 (2,5)	0,991
Alubias	3,2 (2,8)	3,0 (2,7)	3,3 (2,8)	0,597
Garbanzos	3,4 (2,6)	3,4 (2,6)	3,3 (2,6)	0,858
Guisantes	2,1 (2,7)	2,1 (2,8)	2,1 (2,6)	0,964

*Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias.

DT: desviación estándar.

Tabla 4.83 Consumo expresado en veces por semana de carnes y pescados en la población.

	Total (n=133)	Hombres (n=53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
<i>Carnes</i>				
Pollo, pavo	3,1 (2,2)	3,2 (2,2)	3,1 (2,2)	0,663
Ternera	3,8 (3,5)	4,5 (3,2)	3,4 (3,7)	0,222
Cerdo	3,1 (2,4)	3,1 (2,4)	3,2 (2,4)	0,755
Cordero	2,7 (2,7)	3,5 (2,7)	2,2 (2,6)	0,023
Conejo	2,0 (2,6)	1,3 (2,2)	2,6 (2,9)	0,064
Hígado	0,9 (1,9)	0,9 (2,0)	0,9 (1,9)	0,971
Jamón serrano	3,8 (3,4)	3,8 (3,2)	3,8 (3,5)	0,974
Salchichón, chorizo,morcilla	8,2 (5,1)	10,2 (4,7)	6,8 (5,0)	0,002
Tocino, bacon	1,9 (2,6)	2,3 (2,8)	1,6 (2,4)	0,248
Pate	1,6 (2,4)	2,0 (2,7)	1,3 (2,2)	0,150
<i>Pescados</i>				
Pescado blanco	5,0 (3,8)	5,7 (4,5)	5,7 (4,5)	0,163
Pescado azul	2,0 (2,6)	2,9 (2,9)	1,5 (2,2)	0,026
Pescado en salazón	1,4 (2,3)	1,7 (2,6)	1,2 (2,1)	0,365
Latas de atun	2,8 (2,3)	3,1 (2,4)	2,6 (2,2)	0,273

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias.

DT: desviación estándar

Tabla 4.84. Consumo expresado en veces por semana de verduras y frutas en la población.

	Total (n=133)	Hombres (n=53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media(DT)	Media(DT)	Media(DT)	
Verduras y hortalizas				
Lechuga, endivia, escarola	5,3 (4,2)	4,3 (3,3)	5,9 (4,5)	0,046
Tomate crudo	5,3 (4,0)	4,4 (3,4)	5,9 (4,2)	0,046
Pimiento	3,4 (2,6)	3,2 (2,5)	3,6 (2,6)	0,471
Judía verde	3,0 (4,5)	2,8 (2,6)	3,1 (2,4)	0,497
Berenjena, calabacín	2,5 (2,6)	1,8 (2,3)	2,8 (2,7)	0,075
Alcachofa, puerro, apio	2,7 (2,6)	2,7 (2,4)	2,8 (2,3)	0,842
Col, coliflor, brócoli	2,5 (2,7)	2,3 (2,7)	2,6 (2,7)	0,656
Espárrago	2,5 (2,6)	2,7 (2,8)	2,4 (2,5)	0,507
Cebolla	3,6 (4,0)	3,8 (3,7)	3,7 (3,9)	0,808
Frutas				
Naranja	6,4 (6,5)	5,5 (6,4)	7,0 (6,5)	0,204
Plátano	3,1 (2,3)	3,2 (2,3)	3,0 (2,4)	0,80
Manzana	4,0 (2,2)	4,0 (2,1)	3,9 (2,2)	0,926
Pera	3,3 (2,8)	2,6 (2,1)	3,8 (3,1)	0,027
Melocotón, albaricoque, nectarina	2,8 (2,4)	2,4 (2,4)	3,0 (2,4)	0,193
Kiwi	3,4 (4,0)	2,1 (2,4)	4,1 (4,6)	0,019
Sandía, melón	2,9 (3,0)	2,7 (2,4)	3,0 (3,3)	0,536
Almendras	3,2 (3,4)	4,1 (4,4)	2,7 (2,4)	0,034
Cacahuetes	3,3 (2,6)	2,0 (2,4)	2,5 (2,6)	0,007
Nueces	3,6 (4,6)	4,6 (6,1)	3,0 (3,3)	0,086

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar

Tabla 4.85 Consumo expresado en veces por semana de aceites y grasas en la población.

	Total (n=133)	Hombres (n=53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
<i>Aceites</i>				
Aceite de oliva refinado	7,8 (7,9)	4,4 (5,7)	9,8 (8,4)	0,005
Aceite de oliva virgen extra	15,3 (7,7)	14,1 (8,0)	16,1 (7,4)	0,169
Aceite de maíz	1,3 (2,4)	0,2 (0,0)	1,5 (2,7)	0,685
Aceite de girasol	3,5 (5,2)	2,9 (4,7)	3,8 (5,4)	0,519
<i>Grasas</i>				
Mantequilla	1,9 (3,6)	1,5 (2,1)	2,1 (4,2)	0,582
Margarina	3,2 (2,8)	2,2 (2,6)	3,6 (2,9)	0,142
Manteca	0,9 (2,1)	1,7 (2,9)	0,2 (0,0)	0,356

*Se empleó la prueba T de Student para comparar mediasDT: desviación estándar.

Tabla 4.86 Consumo expresado en veces por semana de dulces y bollería en la población.

	Total (n=133)	Hombres (n=53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
Galleta maria	7,9 (8,2)	8,2 (8,3)	7,7 (8,2)	0,791
Galleta chocolate	2,5 (2,5)	2,1 (2,5)	2,6 (2,6)	0,382
Ensaimada/croissant	2,4 (2,7)	2,4 (2,7)	2,4 (2,7)	0,992
Donuts	1,8 (2,6)	1,2 (2,1)	2,2 (2,8)	0,179
Magdalena	3,5 (3,8)	3,2 (4,1)	3,6 (3,7)	0,605
Tartas	2,0 (2,5)	2,2 (2,7)	1,9 (2,5)	0,555
Chocolate con leche	3,4 (3,8)	2,4 (2,8)	4,0 (4,2)	0,062
Chocolate puro	4,0 (4,1)	4,6 (4,6)	3,7 (3,8)	0,383

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar.

Tabla 4.87 Frecuencia de consumo de alimentos semanal por grupo de alimentos

	Total (n=133)	Hombres (n=53)	Mujeres (n=80)	p*
	Media (DT)	Media (DT)	Media (DT)	
Lácteos y derivados	19,1 (12,1)	18,8 (13,8)	19,2 (11,1)	0,870
Cereales	10,0 (10,9)	30,6 (11,8)	29,7 (10,4)	0,651
Verduras y hortalizas	40,7 (19,5)	36,7 (18,2)	43,2 (20,0)	0,073
Fruta	31,1 (14,2)	29,4 (13,3)	32,1 (14,7)	0,299
Legumbres	9,4 (5,8)	9,4 (5,8)	9,4 (5,8)	0,959
Frutos secos	8,1 (7,6)	11,0 (9,7)	6,3 (5,3)	0,001
Carne	11,9 (6,8)	12,8 (6,5)	11,3 (6,9)	0,224
Fiambre y embutidos	12,8 (8,9)	15,5 (8,9)	11,1 (8,5)	0,008
Pescado	9,0 (6,6)	10,7 (7,9)	7,9 (5,5)	0,026
Pescado azul	3,8 (3,6)	4,7 (3,8)	3,2 (3,3)	0,024
Marisco y crustáceos	6,2 (5,6)	6,8 (5,6)	5,8 (5,6)	0,321
Huevos	8,2 (4,6)	8,6 (4,3)	7,8 (4,8)	0,357
Grasas	25,1 (13,0)	21,6 (10,4)	27,3 (14,0)	0,019
Dulces y bollería	16,0 (13,2)	15,6 (11,4)	16,2 (14,3)	0,823

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias

DT: desviación estándar.

Tras corregir por la energía consumida, se perdió la significación estadística para los frutos secos y para el consumo de fiambre y embutidos. Hubo diferencias

significativas para el consumo de frutas y verduras entre hombres y mujeres, siendo las mujeres las que mayor consumo presentaron ($p=0,012$ y $p=0,029$ respectivamente).

4.3.3.2 CONSUMO DE ALIMENTOS POR EDAD

En la tabla 4.88 y 4.89 se presenta la frecuencia de consumo semanal de algunos alimentos en los que se observaron diferencias significativas entre los individuos de edades comprendidas entre 25-44 años y 45-55 años. Por grupos de alimentos, los mayores de 45 años consumen significativamente mas dulce y bollería así como mas huevos que los individuos con edades comprendidas entre 25-44 años.

En cuanto al consumo energético por grupo de edad se observaron diferencias significativas entre los individuos con una edad comprendida entre 25-44 años y 45-55 años de edad (25-44 años: 2308,9 (619,7) vs 45-55 años: 2055,0 (586,7); $p=0,046$). Se ajustaron todos los valores por consumo de energía. Se observaron cambios significativos tras ajustar por el consumo de energía en el consumo de carne ($p=0,006$), fiambre y embutidos ($p=0,038$) y se mantuvo la significación para el consumo de dulces ($p<0,001$). El consumo de estos grupos de alimentos fue significativamente superior en los individuos de 25-44 años.

Tabla 4.88 Frecuencia de consumo de alimentos semanal entre los individuos de edades comprendidas entre 25-44 años y 45-55 años.

	25-44 años	45-55 años	p*
	Media (DT)	Media (DT)	
Leche condensada	0,2 (0,0)	2,0 (2,9)	0,044
Flan	1,5 (2,3)	2,8 (2,7)	0,028
Donuts	1,4 (2,3)	3,1 (3,1)	0,038
Chocolate puro	4,8 (4,5)	2,6 (3,0)	0,032
Chocolate en polvo	6,0 (6,2)	2,7 (2,6)	0,023
Pan de molde	4,5 (5,3)	2,7 (2,7)	0,153
Huevo tortilla	3,4 (2,4)	4,3 (2,4)	0,037
Pollo a la plancha	3,0 (2,0)	3,6 (2,5)	0,135
Cordero	2,3 (2,3)	3,7 (2,8)	0,011
Vísceras	2,3 (2,9)	0,8 (1,7)	0,170
Chorizo	3,4 (2,5)	2,3 (2,4)	0,027
Pescado fresco	1,7 (2,2)	3,1 (2,7)	0,007
Marisco	1,8 (2,5)	3,0 (2,9)	0,036
Cebolla	4,2 (4,3)	2,4 (2,5)	0,038
Cacahute	2,9 (2,6)	1,6 (2,2)	0,022
Zumo envasado	3,9 (4,1)	1,7 (2,3)	0,017
Pizza	3,2 (3,3)	1,9 (2,5)	0,049

*Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar

Tabla 4.89 Frecuencia de consumo de alimentos semanal entre los individuos de edades comprendidas 25-44 y 45-55 años.

	25-44 años	45-55 años	p*
	Media (DT)	Media (DT)	
Lácteos y derivados	19,0 (12,5)	19,1 (12,1)	0,902
Cereales	30,0 (10,9)	30,1 (11,1)	0,955
Verduras y hortalizas	41,9 (20,2)	38,1 (17,9)	0,330
Fruta	31,1 (14,5)	31,0 (13,7)	0,979
Legumbres	8,9 (5,9)	10,6 (5,5)	0,144
Frutos secos	8,3 (7,6)	7,8 (7,8)	0,720
Carne	11,2 (6,1)	13,5 (8,0)	0,082
Fiambre y embutidos	13,4 (8,6)	11,9 (6,8)	0,253
Pescado	8,3 (6,2)	10,5 (7,3)	0,103
Pescado azul	3,8 (3,6)	3,8 (3,6)	0,929
Marisco y crustáceos	5,6 (5,3)	7,5 (6,3)	0,093
Huevos	7,4 (10,0)	10,0 (4,5)	0,003
Grasas	24,6 (11,7)	26,4 (15,8)	0,499
Dulces y bollería	14,2 (11,7)	20,0 (15,7)	0,025

*Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar

4.3.3.3 CONSUMO DE ALCOHOL

En las siguientes tablas (tabla 4.90 y 4.91) se muestra la frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas semanalmente y durante el fin de semana. Se presenta las diferencias del consumo medio entre sexos.

Tabla 4.90 Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas entre semana por sexo en la población INDIMED.

Frecuencia de consumo	Total (n=133) Media(DT)	Hombres (n=53) Media (DT)	Mujeres (n=80) Media (DT)	P
<i>Una caña de cerveza</i>	1,3 (2,5)	2,3 (3,5)	0,7 (1,1)	<0,001
<i>Un vaso de vino blanco</i>	0,6 (2,2)	0,9 (3,2)	0,3 (1,2)	0,126
<i>Un vaso de vino tinto</i>	2,3 (5,3)	3,3 (6,5)	1,6 (4,4)	0,093
<i>Un vaso de whisky</i>	0,2 (1,9)	0,5 (3,1)	0,0 (0,0)	0,192
<i>Un cubata</i>	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,495
<i>Un Martini</i>	0,0 (0,2)	0,1 (0,3)	0,0 (0,1)	0,141
<i>Una copa de vermut</i>	0,0 (0,1)	0,0 (0,2)	0,0 (0,0)	0,160

P: valor de probabilidad en la comparación entre los grupos; prueba de la t Student

Tabla 4.91 Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas entre semana por sexo en la población INDIMED.

Frecuencia de consumo	Total (n=133) Media(DT)	Hombres (n=53) Media (DT)	Mujeres (n=80) Media (DT)	P
<i>Una caña de cerveza</i>	1,6 (1,7)	2,3 (1,9)	1,1 (1,3)	<0,001
<i>Un vaso de vino blanco</i>	0,4 (0,9)	0,6 (1,1)	0,3 (0,6)	0,125
<i>Un vaso de vino tinto</i>	1,0 (1,5)	1,2 (1,7)	0,8 (1,3)	0,136
<i>Un vaso de whisky</i>	0,1 (0,5)	0,2 (0,7)	0,1 (0,3)	0,152
<i>Un cubata</i>	0,7 (1,5)	1,0 (1,4)	0,6 (0,9)	0,022
<i>Un Martini</i>	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,1 (0,3)	0,455
<i>Una copa de vermut</i>	0,1 (0,2)	0,1 (0,2)	0,0 (0,2)	0,569

P: valor de probabilidad en la comparación entre los grupos; prueba de la t Student

4.3.3.4 ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA

Al igual que en el PREDIMED la adherencia a la dieta mediterránea se estudió a partir del cuestionario recientemente validado de Schröder et al, (2011). La puntuación obtenida a la adherencia a la dieta mediterránea en la muestra estudiada fue elevada ($7,6 \pm 2,3$ puntos) sin diferencias entre hombres y mujeres ($p=0,975$). Por edad, los participantes de mayor edad tenían una adherencia mayor que los mas jóvenes (25-44 años) ($7,4 \pm 2,2$) vs $8,1 \pm 2,5$) puntos, $p=0,147$). Ninguno de los participantes tuvo una puntuación inferior a 2 puntos. En la figura 4.36 se muestra el porcentaje de individuos que han obtenido cada una de las puntuaciones posibles con el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos. Se dividió a la población en cuartiles según la puntuación obtenida. El Q1 comprendía aquellos individuos que tenían una adherencia a la dieta mediterránea entre 2-6 puntos (33,6%), Q2 con 7 puntos (19,3%), Q3 con 8-9 puntos (27,7%) y el Q4, con mayor adherencia a la dieta mediterránea, formada por aquellos individuos con una puntuación de 10-14 puntos (19,3%).

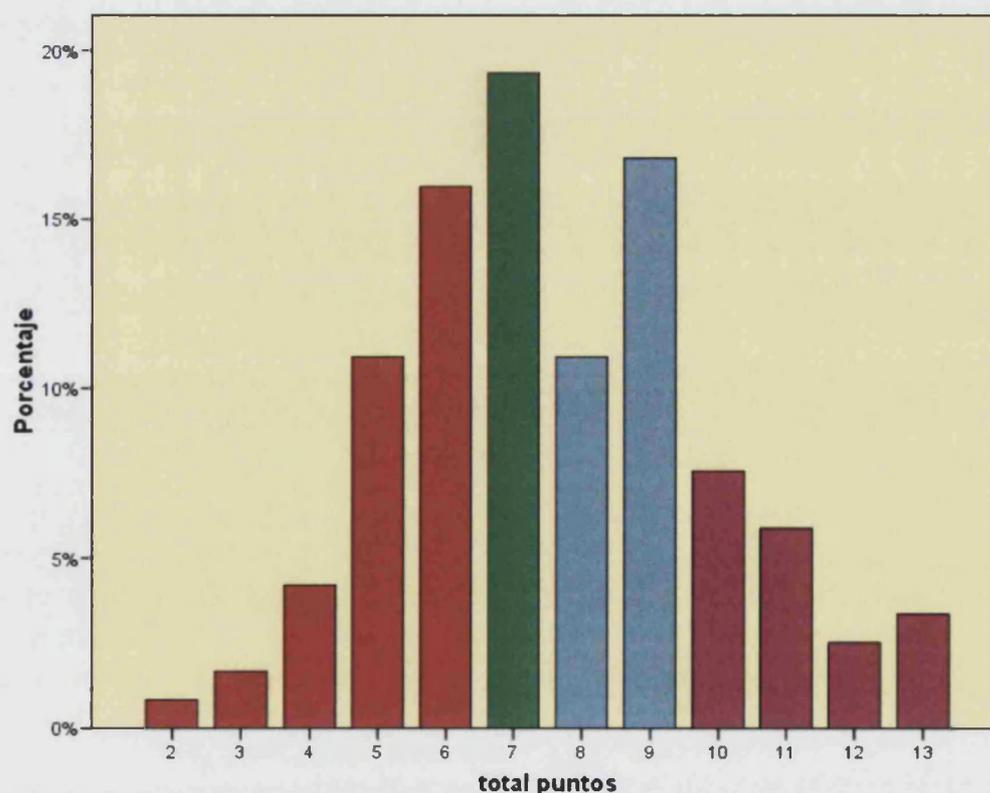


Figura 4.36 Porcentaje de individuos que han obtenido cada una las puntuaciones posibles con el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos. División por cuartiles.

Estudiamos la relación entre la adherencia a la dieta mediterránea y la obesidad. En la tabla 4.92 se muestra el porcentaje de individuos que se adhieren más o menos a la dieta mediterránea en función de si son o no son obesos a nivel basal. No se obtuvieron diferencias significativas.

Tabla 4.92 Porcentaje de individuos que se adhieren más o menos a la dieta mediterránea teniendo en cuenta la condición de obesidad.

		Q1	Q2	Q3	Q4	P*	P**
Obesidad (%)	si	17,5	17,4	18,2	4,3	<0,451	0,270
	no	82,5	82,6	81,8	95,7		

*Se empleó el test de Chi- Cuadrado para las comparaciones. ** P de tendencia lineal

4.3.3.5 CONSUMO DE ALIMENTOS Y PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

4.3.3.5.1 CONSUMO DE ALIMENTOS

Se estudió la asociación entre la frecuencia de consumo de grupos de alimentos y la obesidad y parámetros relacionados (IMC, peso, cintura, cadera).

En la tabla 4.93 se presenta la frecuencia de consumo de algunos grupos de alimentos en función de la obesidad. Sólo se obtuvieron diferencias significativas para el consumo de frutas, siendo los obesos los que menor consumo presentaron ($p=0,030$). Los obesos tuvieron un consumo inferior de lácteos frutos secos y mayor de pescado y embutidos y fiambre, aunque estas diferencias no fueron significativas. Tras ajustar por sexo hubo diferencias significativas en el grupo de frutos secos ($p=0,042$).

El consumo de energía entre los obeso y no obesos no fue significativamente diferente (obeso: $2214,2\pm 628,9$ vs no obeso: $2241,1\pm 619,9$ kcal; $p=0,863$) por lo que no presentamos los valores ajustados por energía.

Realizando un análisis por sexo se observó que los hombres obesos consumían mayor consumo de pescado y menor consumo de frutas (pescado: no obeso: $9,6\pm 7,4$ vs obesos $15,8\pm 8,4$, $p=0,040$) (frutas: no obeso: $31,4\pm 13,1$ vs obeso $19,7\pm 9,9$ veces/semana, $p=0,022$). En el grupo de las mujeres las personas obesas presentaban un menor consumo de frutos secos ($3,3\pm 4,5$ vs $6,8\pm 5,3$ veces/semana en no obesos).

Tabla 4.93 Comparación de la frecuencia de consumo de alimentos (veces/semana) obeso y no obesos.

Grupo de alimentos	No obeso	Obeso	p
	Media (DT)	Media (DT)	
Lacteos	20,1 (12,7)	14,3 (7,4)	0,057
Bollería y dulces	16,7 (13,4)	12,3 (12,2)	0,179
Pescado	8,6 (6,4)	11,4 (7,1)	0,086
Frutas	32,5 (14,4)	24,8 (11,3)	0,030
Frutos secos	8,7 (8,0)	5,2 (4,9)	0,069
Embutidos y fiambre	19,9 (10,6)	24,6 (11,0)	0,117
Chocolate	7,6 (7,9)	5,6 (9,8)	0,342

P: valor *P* en la comparación de las correspondientes variables entre hombres y mujeres. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. *DT*: desviación estándar.

Para analizar la correlación entre el consumo de alimentos y los parámetros antropométricos se empleó el análisis de correlaciones bivariadas con el test de Spearman.

En la tabla 4.94 se presentan las correlaciones para el consumo de alimentos (veces/semana) y parámetros antropométricos relacionados. Destacar que el consumo de frutas se correlaciona negativa y significativamente con todos los parámetros estudiados. En el análisis estratificado por sexo, en hombres hubo una correlación positiva entre el consumo de embutidos y el peso (ρ : 0,356, $p=0,014$). El consumo de frutas se correlacionó negativamente con todos los parámetros estudiados en hombres pero no en mujeres. En mujeres hubo una correlación negativa y significativa para el consumo de frutos secos y el IMC (ρ :-0,231, $p=0,015$), % grasa (ρ :-0,247, $p=0,034$), cadera (ρ :-0,248, $p=0,033$).

Tabla 4.94 Correlaciones entre el consumo de alimentos en veces por semana y parámetros antropométricos en la población general.

		IMC (kg/m ²)	Peso (kg)	% grasa	Grasa visceral	Cintura (cm)	Cadera (cm)
Lácteos	ρ	-0,160	-0,163	-0,027	-0,126	-0,160	-0,127
	P	0,08	0,074	0,769	0,169	0,080	0,164
Pescado	ρ	0,182	0,205	0,080	0,254	0,199	0,059
	P	0,046	0,024	0,382	0,005	0,029	0,522
Frutas	ρ	-0,296	-0,217	-0,192	-0,230	-0,284	-0,284
	P	0,001	0,017	0,036	0,011	0,022	0,002
Frutas secos	ρ	-0,164	0,061	-0,365	-0,050	-0,035	-0,181
	P	0,072	0,504	<0,001	0,583	0,702	0,046

ρ : coeficiente de correlación (rho de Spearman) P valor, significación estadística
 $P < 0,05$

4.3.3.5.2 CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

En la tabla 4.95 se presentan las correlaciones obtenidas para el consumo de algunas bebidas alcohólicas (veces/semana) y parámetros antropométricos.

Destaca las correlaciones significativas con el consumo de cerveza, vino tinto, y whisky.

Al hacer los análisis por sexo, destaca que el consumo de cerveza está significativa y negativamente correlacionado con IMC (ρ : -0,302, $p=0,009$), peso (ρ : -0,226, $p=0,052$), %grasa (ρ : -0,329, $p=0,004$), cintura (ρ : -0,237, $p=0,042$), cadera (ρ : -0,282, $p=0,015$), mientras que en hombres el consumo de cerveza se correlaciona positivamente con el peso ($\rho=0,307$, $p=0,036$), cintura ($\rho:0,385$, $p=0,008$). En mujeres, el consumo de vino tinto también se correlacionó negativamente con el IMC (ρ : -0,252, $p=0,030$), peso (ρ : -0,247, $p=0,034$), % grasa (ρ : -0,237, $p=0,042$), cadera (ρ : 0,278, $p=0,010$). En hombres, el consumo de whisky se correlacionó positivamente con el IMC (ρ : 0,405, $p=0,005$), % grasa (ρ : 0,433, $p=0,002$), grasa visceral (ρ : 0,336, $p=0,021$), cadera (ρ : 0,402, $p=0,005$).

Tabla 4.95 Correlaciones entre el consumo de bebidas alcohólicas en veces por semana y parámetros antropométricos en la población general.

		IMC (kg/m ²)	Peso (kg)	% grasa	Grasa visceral	Cintura (cm)	Cadera (cm)
Cerveza	ρ	-0,31	0,191	-0,329	0,144	0,122	-0,148
	<i>P</i>	0,734	0,036	<0,001	0,114	0,182	0,105
Vino blanco	ρ	0,026	0,133	-0,139	0,013	0,049	-0,026
	<i>P</i>	0,773	0,146	0,128	0,886	0,591	0,774
Vino tinto	ρ	-0,059	0,066	-0,192	0,120	0,036	-0,171
	<i>P</i>	0,521	0,469	0,035	0,190	0,696	0,061
Whisky	ρ	0,196	0,203	-0,020	0,291	0,211	0,059
	<i>P</i>	0,032	0,026	0,826	0,001	0,020	0,518

ρ : coeficiente de correlación (rho de Spearman) *P* valor, significación estadística $P < 0,05$

4.3.3.6 CONSUMO DE ALIMENTOS Y CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

4.3.3.6.1 CONSUMO DE ALIMENTOS

En la tabla 4.96 se presentan los grupos de alimentos para los que se obtuvieron diferencias significativas con las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados.

Tabla 4.96 Correlaciones entre el consumo de alimentos en veces por semana y concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la población general.

		TG (mg/dl)	CT (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dL)	APOA (mg/dL)	APOB (mg/dL)	Lp(a) mg/dL
Verduras y hortalizas	ρ	-0,145	-0,135	0,177	-0,181	0,133	-0,138	0,002
	<i>P</i>	0,112	0,141	0,052	0,048	0,216	0,147	0,985
Frutas	ρ	-0,202	0,005	0,246	-0,004	0,180	-0,009	0,082
	<i>P</i>	0,027	0,954	0,007	0,968	0,095	0,928	0,375
Legumbres	ρ	0,079	0,197	0,028	0,220	-0,062	0,143	0,069
	<i>P</i>	0,388	0,030	0,758	0,016	0,566	0,134	0,454

ρ : coeficiente de correlación (rho de Spearman) *P* valor, significación estadística $P < 0,05$. TG: triglicéridos, CT: colesterol total, APOA: apolipoproteína A, APOB: apolipoproteína B, Lp(a): lipoproteína(a)

4.3.3.6.2 CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

En la tabla 4.97 se presentan las correlaciones entre el consumo de bebidas alcohólicas (veces/semana) y las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados. Destaca la correlación positiva entre el consumo de cerveza y las

concentraciones de triglicéridos y APOB y correlación negativa entre el consumo de vino blanco y el HDL-C. Al analizar por sexo el consumo de cerveza solo se correlacionó positivamente con las concentraciones de triglicéridos en hombres ($p: 0,373$, $p=0,010$) pero no en mujeres, tal y como se observaba en el análisis de los parámetros antropométricos.

Tabla 4.97 Correlaciones entre el consumo de bebidas alcohólicas en veces por semana y las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la población general.

		TG (mg/dl)	CT (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dL)	APOA (mg/dL)	APOB (mg/dL)	Lp(a) mg/dL
Cerveza	ρ	0,191	0,073	-0,229	0,082	-0,182	0,221	0,072
	P	0,035	0,427	0,012	0,375	0,090	0,019	0,431
Vino blanco	ρ	0,077	-0,047	-0,051	-0,53	-0,35	0,082	-0,091
	P	0,404	0,606	0,581	0,563	0,744	0,391	0,321
Vino tinto	ρ	0,080	0,114	0,047	0,088	0,006	0,061	0,165
	P	0,385	0,212	0,608	0,337	0,956	0,523	0,071
Whisky	ρ	0,096	0,192	-0,050	0,131	0,001	0,123	0,040
	P	0,294	0,035	0,588	0,153	0,994	0,196	0,666

ρ : coeficiente de correlación (rho de Spearman) P valor, significación estadística $P < 0,05$. TG: triglicéridos, CT: colesterol total, APOA: apolipoproteína A, APOB: apolipoproteína B, Lp(a): lipoproteína(a)

4.3.4 ESTUDIO DE LAS PREFERENCIAS ALIMENTARIAS

4.3.4.1 PREFERENCIAS ALIMENTARIAS Y DEL SABOR POR SEXOS

En la tabla 4.98 y 4.99 se muestran las diferencias en las preferencias alimentarias y de sabores por sexo solo para los alimentos en los que se obtuvieron diferencias destacadas. Se observaron diferencias significativas para la preferencia de leche entera ($p=0,001$), yogur entero ($p=0,003$), quesos curados ($p=0,001$), carnes rojas ($p < 0,001$), ajo aceite ($p=0,027$), salazones ($p=0,003$) y picantes ($p=0,001$) siendo los hombres los que prefieren el consumo de estos alimentos en comparación con las mujeres.

Tabla 4.98 Prevalencia de las preferencias alimentarias en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.

<i>Preferencias alimentarias</i>		<i>Desagrado total</i>	<i>Neutro</i>	<i>Bueno</i>	<i>Sabor favorito</i>	<i>P*</i>
Leche entera	<i>Hombre</i>	12,8	19,1	38,3	29,8	0,001
	<i>Mujer</i>	35,1	23,0	28,4	13,5	
Yogur entero	<i>Hombre</i>	4,3	12,8	38,3	44,7	0,003
	<i>Mujer</i>	21,6	24,3	23,0	31,1	
Quesos curados	<i>Hombre</i>	5,9	6,4	25,5	66,0	0,001
	<i>Mujer</i>	21,6	9,5	28,4	40,5	
Carnes rojas	<i>Hombre</i>	0	8,5	38,3	53,2	<0,001
	<i>Mujer</i>	5,4	27,0	47,3	20,3	
Pan blanco o integral	<i>Hombre</i>	2,1	12,8	36,2	48,9	0,088
	<i>Mujer</i>	0	6,8	32,4	60,8	
Alcachofas espinacas, acelgas	<i>Hombre</i>	10,6	21,3	40,4	27,7	0,089
	<i>Mujer</i>	6,8	14,9	35,1	43,2	
Ajo aceite	<i>Hombre</i>	6,4	12,8	42,6	38,3	0,027
	<i>Mujer</i>	14,9	27,0	29,7	28,4	
Salazones	<i>Hombre</i>	4,3	27,7	53,2	14,9	0,003
	<i>Mujer</i>	23,0	37,8	27,0	12,2	
Picantes	<i>Hombre</i>	21,3	36,2	27,7	14,9	0,001
	<i>Mujer</i>	54,1	23,0	16,2	6,8	
Chocolates	<i>Hombre</i>	2,1	12,8	36,2	48,9	0,069
	<i>Mujer</i>	1,4	6,8	25,7	66,2	

*P de tendencia lineal. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para las comparaciones.

** P del test de chi-cuadrado.

Tabla 4.99 Prevalencia de las preferencias a los distintos sabores en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.

Preferencias a sabores		Desagrado total	Neutro	Bueno	Sabor favorito	p
Amargo	<i>Hombre</i>	53,2	31,9	14,9	0	0,147
	<i>Mujer</i>	70,3	18,9	9,5	1,4	
Dulce	<i>Hombre</i>	0	6,4	31,9	61,9	0,619
	<i>Mujer</i>	2,7	9,5	24,3	63,5	
Picante	<i>Hombre</i>	19,1	27,7	40,4	12,8	0,001
	<i>Mujer</i>	51,4	18,9	23,0	6,8	
Salado	<i>Hombre</i>	2,1	8,5	51,1	38,3	0,048
	<i>Mujer</i>	10,8	21,6	32,4	35,1	
Agrio	<i>Hombre</i>	40,4	36,2	19,1	4,3	0,074
	<i>Mujer</i>	58,1	25,7	14,9	1,4	

*P de tendencia lineal. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para las comparaciones.

** P del test de chi-cuadrado.

4.3.4.2 PREFERENCIAS ALIMENTARIAS Y OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.100 y 4.101 se muestran las diferencias en las preferencias alimentarias y de sabores en función de la obesidad. En un análisis discriminario se empleó la variable sobrepeso para ver si había diferencias. Se observaron diferencias significativas para la preferencia de queso curado ($p=0,040$), embutidos ($p=0,041$) pan blanco o integral ($p=0,003$), aceite de girasol ($p=0,027$).

Tabla 4.100 Prevalencia de las preferencias alimentarias en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.

<i>Preferencias alimentarias</i>		<i>Desagrado total</i>	<i>Neutro</i>	<i>Bueno</i>	<i>Sabor favorito</i>	<i>P*</i>
Leche entera	No obeso	21,1	8,3	36,8	36,8	0,055
	Obeso	27,5	24,5	31,4	16,7	
Carnes rojas	No obeso	3,9	20,6	42,2	33,3	0,592
	Obeso	0	15,8	52,6	31,6	
Aves	No obeso	0	4,9	52	43,1	0,325
	Obeso	0	5,3	36,5	57,9	
Pescado blanco	No obeso	0	8,8	45,1	46,1	0,008
	Obeso	0	0	21,1	78,9	
Quesos curados	No obeso	15,7	7,8	28,4	48	0,212
	Obeso	5,3	10,5	21,1	19,7	
Quesos frescos	No obeso	7,8	13,7	33,3	45,1	0,820
	Obeso	5,3	21,1	21,1	52,1	
Embutidos	No obeso	7,8	33,3	58,8	84,3	0,142
	Obeso	0	26,3	11,6	15,7	
Pan blanco o integral	No obeso	1,0	10,8	35,3	52,9	0,054
	Obeso	0	0	26,3	73,7	
Cereales de desayuno	No obeso	6,9	31,4	37,3	24,5	0,040**
	Obeso	26,3	31,6	15,8	26,3	
Brcol, coliflor, repollo	No obeso	21,6	32,4	29,4	16,7	0,971
	Obeso	26,3	21,1	36,8	15,8	
Alcachofas, espinacas, acelgas	No obeso	6,9	18,6	39,2	35,3	0,921
	Obeso	15,8	10,5	26,3	47,4	
Naranja, mandarina	No obeso	1,0	12,7	22,5	63,7	0,170
	Obeso	0	0	26,3	73,7	

Limón, palmelo	No obeso	11,8	46,1	32,4	9,8	0,734
	Obeso	15,8	36,8	31,6	15,8	
Fruta fresca	No obeso	1,0	2,9	42,2	53,9	0,159
	Obeso	5,3	5,3	47,4	42,1	
Aceite de girasol	No obeso	26,5	47,1	19,6	6,9	0,525
	Obeso	31,6	31,6	21,1	15,8	
Margarina	No obeso	25,5	41,2	24,5	8,8	0,012**
	Obeso	57,9	10,5	15,8	15,8	
Mayonesa	No obeso	5,9	33,3	45,1	15,7	0,038**
	Obeso	10,5	15,8	31,6	42,1	
Ajo aceite	No obeso	12,7	23,5	35,3	28,4	0,036
	Obeso	5,3	10,5	31,6	52,6	
Picantes	No obeso	43,1	30,4	19,6	6,9	0,024
	Obeso	31,6	15,8	26,3	26,3	
Frutos secos	No obeso	0	6,9	34,3	58,8	0,120
	Obeso	5,3	5,3	47,4	42,1	
Dulces, helados	No obeso	1,0	12,7	32,4	53,9	0,903
	Obeso	5,3	15,8	15,8	63,2	
Chocolate	No obeso	1,0	10,8	30,4	57,8	0,484
	Obeso	5,3	0	26,3	68,5	

*P de tendencia lineal. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para las comparaciones.

** P del test de chi-cuadrado.

Tabla 4.101 Prevalencia de las preferencias a los distintos sabores en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.

Preferencias a sabores		Desagrado total	Neutro	Bueno	Sabor favorito	p
Amargo	<i>No obeso</i>	63,7	25,5	9,8	1,0	0,590
	<i>Obeso</i>	15,6	15,8	21,1	0	
Dulce	<i>No obeso</i>	2,0	6,9	29,4	61,8	0,927
	<i>Obeso</i>	0	15,8	15,8	68,4	
Picante	<i>No obeso</i>	41,2	22,5	29,4	6,9	0,076
	<i>Obeso</i>	26,3	21,1	31,6	21,1	
Salado	<i>No obeso</i>	7,8	13,7	41,2	37,3	0,420
	<i>Obeso</i>	5,3	31,6	31,6	31,6	
Agrio	<i>No obeso</i>	51	27,5	18,6	2,9	0,315
	<i>Obeso</i>	52,6	42,1	5,3	0	

*P de tendencia lineal. Se empleó el test de Chi- Cuadrado para las comparaciones. ** P del test de chi-cuadrado.

Posteriormente analizamos la asociación entre la preferencia a determinados alimentos y parámetros antropométricos. En las tablas 4.102, 4.103 y 4.104 se presentan algunos datos significativos para la preferencia a lácteos enteros, frutos secos y carne roja.

Analizamos si había correlación entre el consumo de leche entera y la preferencia alimentaria por este alimento que mostraba la población de estudio. Observamos que había una correlación positiva entre ambas variables, es decir, a mayor preferencia por la leche entera, mayor consumo de lácteos enteros ($\rho=0,372$, $p<0,001$). Además, la preferencia por los lácteos enteros estuvo relacionada significativamente con mayor peso, grasa visceral, cintura e IMC (en este último caso no llegó a ser significativo). El consumo de leche entera también se correlacionó significativamente con mayor peso ($\rho=0,240$, $p=0,008$).

La preferencia por los frutos secos también se correlacionó con el consumo de nueces ($\rho=0,270$, $p=0,003$), pero no con otros frutos secos.

Tabla 4.102 Preferencia del consumo de leche entera y su asociación con variables antropométricas en la población.

	Desagrado total	Neutro	Bueno	Sabor favorito	P*
IMC (kg/m²)	25,6 (4,4)	24,5 (3,4)	26,4 (3,8)	27,0 (4,3)	0,072
Peso (kg)	68,1 (12,5)	69,2 (12,3)	73,7 (13,1)	76,8 (12,7)	0,005
% grasa	28,9 (8,8)	26,2 (9,0)	27,9 (7,5)	28,5 (8,0)	0,942
Grasa visceral	5,5 (2,9)	5,0 (2,7)	6,8 (3,8)	8,2 (4,2)	0,001
Cintura (cm)	84,8 (11,7)	81,9 (11,1)	89,1 (12,3)	92,1 (11,4)	0,004
Cadera (cm)	103,3 (9,4)	101,5 (7,2)	103,6 (7,5)	104,7 (7,8)	0,358

*p valor de tendencia lineal. Anova para la comparación de medias

Tabla 4.103 Preferencia del consumo de frutos secos y su asociación con variables antropométricas en la población.

	Desagrado total	Neutro	Bueno	Sabor favorito	P*
IMC (kg/m²)	34,8 (2,2)	24,7 (3,4)	26,3 (4,5)	25,7 (3,7)	0,036
Peso (kg)	95,8 (14,1)	68,4 (13,8)	73,4 (13,0)	70,9 (12,7)	0,079
% grasa	42,2 (8,3)	23,4 (9,0)	29,1 (8,2)	27,6 (8,0)	0,126
Grasa visceral	8 (4,7)	5,5 (4,6)	6,7 (3,9)	6,1 (3,3)	0,695
Cintura (cm)	111,0 (14,2)	81,1 (13,6)	88,7 (12,7)	86,3 (11,2)	0,070
Cadera (cm)	121 (7,1)	100,1 (5,6)	104,3 (9,2)	102,7 (7,1)	0,037

*p valor de tendencia lineal. Anova para la comparación de medias

Tabla 4.104 Preferencia del consumo de carne roja y su asociación con variables antropométricas en la población.

	Desagrado total	Neutro	Bueno	Sabor favorito	P*
IMC (kg/m²)	21,5 (3,2)	25,2 (4,4)	26,6 (3,9)	26,0 (3,9)	0,024
Peso (kg)	60,5 (7,4)	67,1 (12,0)	72,3 (12,4)	75,4 (13,6)	0,014
% grasa	26,3 (10,6)	30,4 (7,7)	28,8 (9,0)	25,6 (6,9)	0,761
Grasa visceral	3,5 (2,4)	5,8 (3,5)	6,6 (3,4)	6,7 (4,0)	0,077
Cintura (cm)	74,8 (9,2)	84,7 (12,5)	88,5 (11,3)	87,6 (12,8)	0,028
Cadera (cm)	98,2 (6,6)	102,1 (8,2)	104,1 (8,6)	103,4 (8,0)	0,175

*p valor de tendencia lineal. Anova para la comparación de medias

4.3.4.3 PREFERENCIAS ALIMENTARIAS Y SABOR Y CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

Se analizó la asociación de las preferencias alimentarias y sabor con la concentración de triglicéridos y parámetros relacionados. En la tabla 4.105 se presenta uno de los resultados más significativos.

Tabla 4.105 Preferencia del consumo de leche entera y su asociación con variables antropométricas en la población.

	Desagrado total	Neutro	Bueno	Sabor favorito	P*
TG (mg/dL)	80,3 (21,8)	94,2 (66,9)	108,2 (50,6)	130,8 (96,9)	0,002
CT (mg/dL)	211,6 (41,6)	195,2 (27,6)	219,6 (41,6)	220,0 (43,1)	0,140
HDL-C (mg/dL)	66,9 (12,2)	64,9 (16,7)	60,6 (13,8)	59,1 (11,4)	0,019
LDL-C (mg/dL)	128,6 (34,9)	111,5 (22,7)	137,4 (37,7)	134,1 (39,8)	0,158
APOA (mg/dL)	168,0 (18,5)	167,8 (26,0)	164,6 (21,9)	158,8 (21,2)	0,160
APOB (mg/dL)	92,2 (24,3)	88,5 (17,3)	101,8 (28,9)	102,5 (27,5)	0,054
Lp(a)	26,0 (26,4)	32,5 (33,2)	25,6 (26,3)	24,4 (19,8)	0,609

*p valor de tendencia lineal. Anova para la comparación de medias

4.3.5 ESTUDIO DEL TEST DE SABORES. PERCEPCIÓN DE LOS SABORES

Para el estudio de la percepción de los sabores en función de los test realizados con distintos compuestos, se presentarán en primer lugar una descriptiva del porcentaje de individuos que percibe las distintas concentraciones de sabor (nada, un poco, moderada, fuerte, muy fuerte y extremadamente fuerte). A partir de esta descriptiva se han recodificado las variables para realizar los distintos análisis según el interés.

Se presentará un análisis detallado con el consumo de alimentos, la obesidad y parámetros relacionados y por último, el estudio genético.

4.3.5.1 AMARGO

En la tabla 4.106 se presenta una descriptiva del porcentaje de individuos que percibe las distintas concentraciones de sabor amargo según el PTC y el PROP. Para posteriores análisis, según la descriptiva y la bibliografía se recodificaron las variables y se consideraron tres grupos: catadores (nada y un poco), catadores medios (moderado y fuerte), super catadores (muy fuerte y extremadamente fuerte). Otras opciones también fueron exploradas y consideradas pero esta fue la mejor opción. No se observaron diferencias significativas entre ser catador, catador medio o supercatador y el sexo o la edad.

Tras realizar las categorías el 43,9% era no catador, el 37,4 % catador medio y el 18,7% supercatador para el PTC, mientras que para el PROP la prevalencia fue de 41,3%, 35,8%, 22,8% respectivamente.

Tabla 4.106 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor amargo por el compuesto PTC y PROP según las distintas concentraciones testadas.

	Nada	Un poco	Moderado	Fuerte	Muy fuerte	Extremadamente fuerte
<i>PTC (concentraciones expresadas en Molaridad)</i>						
0,0056	75,6	14,6	6,5	2,4	0,8	0
0,18	65,9	23,6	7,3	2,4	0,8	0
0,56	52,8	31,7	12,2	2,4	0,8	0
1,8	50,4	18,7	8,1	18,7	3,3	0,8
5,6	30,9	13,0	17,9	19,5	12,2	6,5
<i>PROP (concentraciones expresadas en Molaridad)</i>						
0,0055	72,4	14,6	7,3	4,9	0,8	0
0,174	33,3	39,8	15,4	7,3	4,1	0
0,55	60,2	26,8	8,1	4,1	0,8	0
1,74	72,4	22,8	2,4	2,4	0	0
5,5	21,1	20,3	13,8	22,0	13,8	8,9

4.3.5.1.1 PERCEPCIÓN DEL SABOR AMARGO Y CONSUMO DE ALIMENTOS

En la tabla 4.107 se presenta el consumo de algunos alimentos en función de ser no catador, catador medio, super catador para la concentración más extrema en ambos casos (PTC y PROP). Se presentan sobre todo alimentos amargos. Se observan diferencias de consumo para las bebidas amargas en ambos compuestos, siendo los catadores los que menor consumo presentaron. Además se observa que los supercatadores se adhieren menos a la dieta mediterránea que los no catadores. Al estratificar por sexo no se observaron diferencias significativas.

Tabla 4.107 Consumo de alimentos (veces/semana) en función de no catadores, catadores medios y super catadores para el sabor amargo (PTC y el PROP en concentraciones extremas) en la población general.

	PTC 5,6 mM				PROP 5,5 mM			
	No catador	Catador medio	Super catador	P*	No catador	Catador medio	Super catador	P*
<i>Chocolate puro</i>	2 (2,8)	2,3 (4,8)	2,8 (3,1)	0,697	2,5 (4,1)	1,8 (2,7)	3,1 (6,3)	0,942
<i>Grupo verduras^a</i>	42,1 (18,5)	37,5 (18,7)	42,2 (23,9)	0,485	42,2 (20,1)	40,0 (17,9)	38,1 (21,9)	0,681
<i>Verduras amargas^b</i>	17,5 /10,5-9	14,5 (88,1)	21,9 (12,0)	0,706	17,0 (9,8)	15,9 (8,7)	16,3 (8,6)	
<i>Verduras no amargas^c</i>	17,1 (7,5)	14,8 (7,8)	17,9 (10,4)	0,238	10,9 (7,0)	10,4 (6,3)	9,5 (9,6)	0,711
<i>Grupo café^d</i>	14,4 (10,7)	13,0 (11,0)	18,4 (14,1)	0,199	14,3 (11,1)	16,1 (11,1)	13,0 (12,4)	0,539
<i>Café con leche con azúcar</i>	3,6 (5,3)	4,0 (6,6)	5,4 (9,6)	0,303	5,1 (6,7)	4,5 (6,3)	3,5 (6,7)	0,314
<i>Alcachofas, espinacas, acelgas</i>	2,5 (2,3)	2,6 (2,5)	2,2 (2,4)	0,761	2,5 (2,5)	2,5 (2,5)	2,9 (2,6)	0,857
<i>Lechuga, escarola</i>	5,0 (3,8)	5,0 (4,2)	6,1 (5,2)	0,092	5,6 (4,9)	4,1 (2,2)	6,7 (5,0)	0,094
<i>Bebidas amargas^e</i>	5,1 (5,9)	8,9 (8,7)	3,0 (4,1)	0,027	7,7 (7,7)	6,3 (6,8)	4,6 (6,6)	0,212
<i>Adherencia a DM</i>	7,5 (1,8)	8,0 (2,8)	7,1 (2,3)	0,296	7,9 (2,0)	7,4 (2,5)	6,5 (2,7)	0,089

*P valor para las comparaciones de medias (ANOVA). ^aGrupo de verduras: todas las verduras ^bVerduras amargas: coliflor+escarola+acelga+berenjena+espárrago ^cVerduras no amargas: pimienta+zanahoria+cebolla ^dGrupo café: café con leche+cortado+solo. ^eBebidas amargas: tónica+cerveza+vino tinto

En la figura 4.37 se presenta el consumo desglosado de tónica, vino tinto y cerveza en función de las tres categorías de catadores. Las diferencias para el consumo de tónica en función de las tres categorías fueron (p de tendencia lineal),

PTC: $p=0,419$ y PROP $p=0,191$, vino tinto: PTC, $p=0,836$, PROP: $p=0,426$ y cerveza: PTC, $p=0,184$, PROP: $p=0,561$.

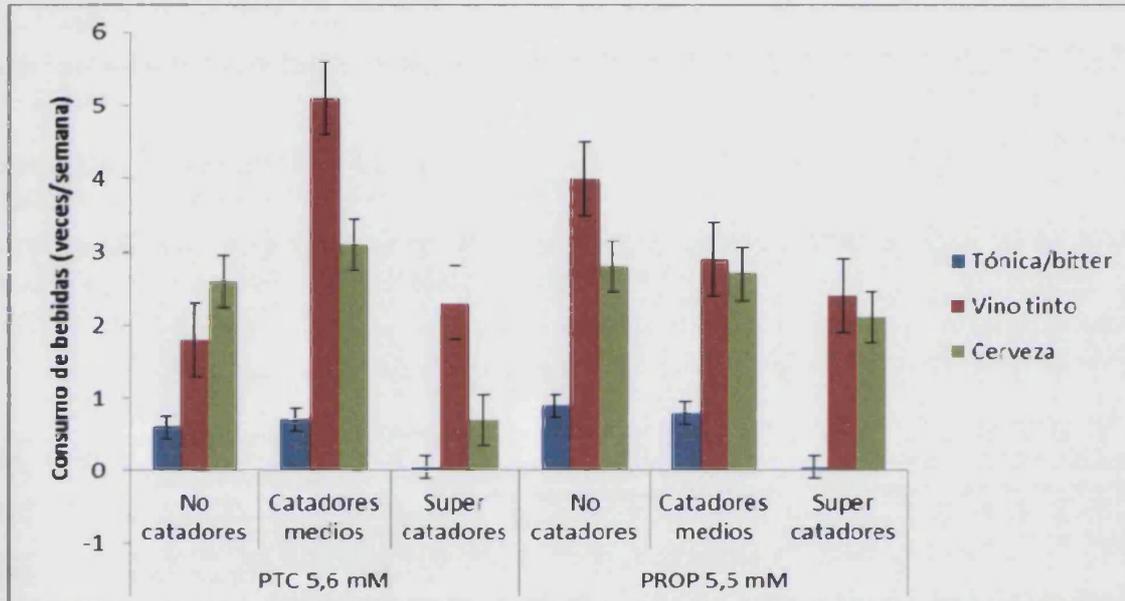


Figura 4.37 Consumo de bebidas amargas (tónica/bitter, vino tinto, cerveza) en veces por semana en la población general.

Además, analizamos si existía correlación entre el consumo de algunos alimentos y la percepción del PTC y PROP para las concentraciones mas extremas.

Encontramos una correlación negativa y estadísticamente significativa entre la intensidad de la percepción del PROP y el consumo de café con leche, vino tinto tónica ($p=0,017$, $p=0,038$, $p=0,018$) coincidiendo con lo expuesto anteriormente. Por último, analizamos si había relación entre las preferencias a los distintos sabores manifestadas por los participantes (1=desagrado total, 2=neutro, 3=bueno, 4=sabor favorito) (Tabla 4.108).

Tabla 4.108 Preferencia por el sabor dulce y amargo en función de no catadores, catadores medios y super catadores para el sabor amargo (PTC y el PROP en concentraciones extremas) en la población general.

	PTC 5,6 mM				PROP 5,5 mM			
	No catador	Catador medio	Super catador	P^*	No catador	Catador medio	Super catador	P^*
Dulce	2,2 (0,8)	2,7 (0,6)	2,6 (0,7)	0,026	2,4 (0,8)	2,5 (0,7)	2,8 (0,4)	0,315
Amargo	0,6 (0,8)	0,3 (0,6)	0,8 (1,2)	0,125	0,7 (0,8)	0,2 (0,5)	0,5 (0,9)	0,017

* *P* valor para las comparaciones de medias (ANOVA). Los valores se presentan como media (DT). Las variables preferencia del sabor dulce y amargo son consideradas como continuas.

4.3.5.1.2 PERCEPCIÓN DEL SABOR AMARGO Y LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

En la tabla 4.109 y tabla 4.110 se presentan las diferencias de parámetros antropométricos y obesidad en función de la percepción del sabor amargo PROP y PTC. En el análisis por sexo no encontramos diferencias significativas. Al explorar los resultados por categorías catadores versus no catadores, observamos que los no catadores tenían menor porcentaje de grasa que los catadores para el PROP (26,7 (7,9) vs 30,1 (9,6) %, $p=0,062$).

Tabla 4.109 Parámetros antropométricos en función de la percepción del sabor amargo PROP y PTC en la población general.

	PTC 5,6 mM				PROP 5,5 mM			
	No catador	Catador medio	Super catador	<i>P</i> *	No catador	Catador medio	Super catador	<i>P</i> *
<i>Peso</i> (kg)	71,0 (13,1)	72,7 (13,1)	71,6 (11,0)	0,873	70,6 (12,2)	72,3 (12,9)	73,0 (13,4)	0,425
<i>IMC</i> (kg/m ²)	25,4 (3,8)	26,2 (4,2)	25,6 (3,1)	0,826	25,6 (3,5)	25,6 (3,8)	26,3 (4,9)	0,436
% <i>grasa</i>	26,9 (8,6)	28,1 (8,5)	27,8 (7,6)	0,686	27,0 (8,3)	26,5 (7,3)	30,1 (9,6)	0,116
<i>Grasa visceral</i>	5,7 (3,2)	7,2 (4,0)	6 (2,7)	0,721	6,2 (3,1)	6,5 (4,1)	6,1 (3,5)	0,968
<i>Cintura</i> (cm)	85,5 (12,1)	88,4 (12,1)	85,9 (12,3)	0,891	85,7 (11,2)	87,7 (12,2)	86,9 (12,6)	0,676
<i>Cadera</i> (cm)	102,1 (7,5)	104,0 (9,1)	103,8 (6,6)	0,411	102,1 (7,3)	102,5 (6,5)	106,0 (10,6)	0,038

**P* valor de tendencia lineal.

Tabla 4.110 Puntuación en la percepción del sabor amargo mediante el test de sabores PTC y PROP.

	Normopeso Media (DT)	Sobrepeso Media (DT)	Obesidad Media (DT)	P*
<i>PTC (concentraciones expresadas en Molaridad)</i>				
0,0056	0,4 (0,9)	0,3 (0,5)	0,6 (1,3)	0,313
0,18	0,6 (0,8)	0,3 (0,6)	0,8 (1,2)	0,036
0,56	0,7 (0,9)	0,6 (0,7)	0,8 (1,1)	0,554
1,8	1,2 (1,0)	1 (1,1)	0,9 (1,0)	0,993
5,6	2,1 (1,6)	2,1 (1,7)	2,4 (1,7)	0,934
<i>PROP (concentraciones expresadas en Molaridad)</i>				
0,0055	0,5 (0,9)	0,4 (0,8)	0,4 (1,0)	0,713
0,174	0,4 (0,7)	0,2 (0,4)	0,5 (0,9)	0,157
0,55	0,7 (0,9)	0,4 (0,6)	0,8 (1,2)	0,098
1,74	1,2 (1,0)	1,0 (1,1)	0,9 (1,0)	0,392
5,5	2,1 (1,6)	2,1 (1,7)	2,4 (1,7)	0,741

P valor para la comparación de medias (ANOVA).

4.3.5.2 DULCE

En la tabla 4.111 se presenta la descriptiva para la percepción del sabor dulce mediante el test de sabores con sacarosa.

Tabla 4.111 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor dulce por el compuesto sacarosa según las distintas concentraciones testadas.

Sacarosa (mM)	Nada	Un poco	Moderado	Fuerte	Muy fuerte	Extremadamente fuerte
100	32,3	48,8	14,2	3,1	0,8	0,8
150	22,0	40,9	29,1	5,5	1,6	0,8
200	14,2	40,9	29,1	11	3,1	1,6
300	8,7	32,3	37,8	14,2	4,7	2,4
400	8,7	30,7	28,3	20,5	7,9	3,9

4.3.5.2.1 PERCEPCIÓN DEL SABOR DULCE Y CONSUMO DE ALIMENTOS

Se recodificaron las variables para los posteriores análisis en no catadores (nada), catadores medios (un poco y moderado) y super catadores (fuerte, muy fuerte y extremadamente fuerte).

En el análisis para evaluar las diferencias de consumo de alimentos en función de la percepción del sabor dulce observamos que los super catadores tendían a comer menos alimentos dulces que los no catadores (datos no mostrados). Así por ejemplo, el consumo de chocolate con leche fue significativamente inferior en los super catadores ($1,8 \pm 2,7$ veces/semana) que en los no catadores ($4,4 \pm 6,2$ veces/semana; $p=0,036$). Algo similar sucedió para el grupo de bollería (super catadores: $14,2 \pm 11,5$ veces/semana vs no catadores $21,3 \pm 17,9$ veces/semana; $p=0,115$).

4.3.5.2.2 PERCEPCIÓN DEL SABOR DULCE Y LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

No se obtuvieron diferencias significativas en ningún parámetro. Tampoco al estratificar por sexo.

4.3.5.3 UMAMI

En la tabla 4.112 se presenta la descriptiva para la percepción del sabor umami mediante el test de sabores con umami.

Tabla 4.112 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor umami por el compuesto glutamato monosódico según las distintas concentraciones testadas.

Glutamato monosódico (mM)	Nada	Un poco	Moderado	Fuerte	Muy fuerte	Extremadamente fuerte
25	48,0	36,2	11,8	3,1	0,8	0
50	32,3	34,6	15,0	15,0	1,6	1,6
75	16,5	42,5	22,0	10,2	6,3	2,4
100	20,5	38,6	15,0	12,6	9,4	3,9
200	10,2	23,6	30,7	11,0	15,0	9,4

Se recodificaron las variables para los posteriores análisis en no catadores (nada), catadores medios (un poco y moderado) y super catadores (fuerte, muy fuerte y extremadamente fuerte).

4.3.5.3.2 PERCEPCIÓN DEL SABOR UMAMI Y EL CONSUMO DE ALIMENTOS

En cuanto al consumo de alimentos, observamos que los no catadores consumían menos ternera, carne de cerdo y carnes en general que los supercatadores (ternera: $0,2 \pm 0,4$ vs $1,5 \pm 2,4$, $p=0,059$; carne de cerdo: $1,5 \pm 1,9$ vs $3 \pm 3,6$, $p=0,063$; grupo de carnes: $10,4 \pm 5$ vs $12,7 \pm 7,5$ veces/semana, $p=0,278$, respectivamente).

4.3.5.3.2 PERCEPCIÓN DEL SABOR UMAMI Y LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

No se observaron diferencias significativas entre la percepción del sabor umami y variables antropométricas. Tampoco considerando normopesos, sobrepeso u obesidad. Solo en mujeres para la concentración de 100 mM, aunque en el borde de la significación, se encontraron diferencias significativas ($p=0,048$) (normopeso: $1,7 \pm 1,3$ vs sobrepeso: $1 \pm 1,1$ vs obeso: 2 ± 2).

4.3.5.4 SALADO

En la tabla 4.113 se presenta la descriptiva para la percepción del sabor salado mediante el test de sabores con sal común.

Tabla 4.113 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor salado por el compuesto cloruro sódico según las distintas concentraciones testadas.

Cloruro sódico (mM)	Nada	Un poco	Moderado	Fuerte	Muy fuerte	Extremadamente fuerte
25	63,0	31,5	3,9	1,6	0	0
50	31,5	32,3	22,0	10,2	2,4	1,6
75	16,5	32,3	23,6	22,0	3,9	1,6
100	15,0	26,0	28,3	19,7	11,0	0
200	4,7	11,8	26,0	18,1	27,6	11,8

Se recodificaron las variables para los posteriores análisis en no catadores (nada), catadores medios (un poco y moderado) y super catadores (fuerte, muy fuerte y extremadamente fuerte).

4.3.5.4.1 PERCEPCIÓN DEL SABOR SALADO Y EL CONSUMO DE ALIMENTOS

En la figura 4.38 se destaca la diferencia de consumo en algunos alimentos en función de la percepción del sabor salado.

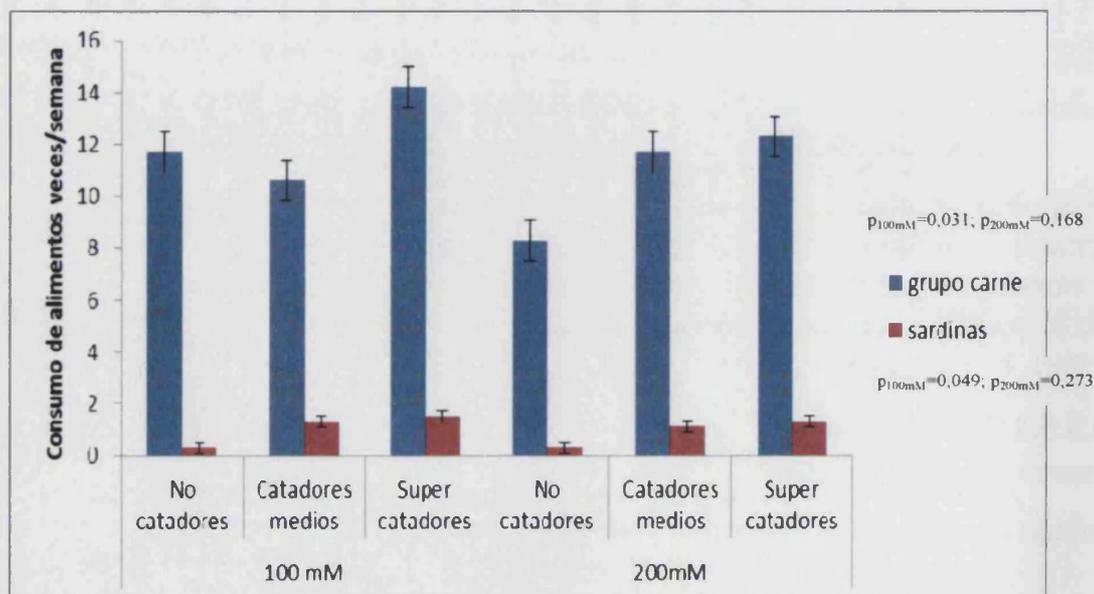


Figura 4.38 Consumo de grupo de carnes y sardinas en veces por semana en la población general en función de la percepción del sabor salado a distintas concentraciones (100mM y 200mM).

4.3.5.4.2 PERCEPCIÓN DEL SABOR SALADO Y LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

No se observaron diferencias significativas entre la percepción del sabor salado y variables antropométricas. Al considerar la variable normopeso, sobrepeso y obesidad se observaron diferencias significativas para las concentraciones más extremas (100mM: normopeso: $1,6 \pm 1,4$ vs sobrepeso: $2,2 \pm 1,2$ vs obesidad: $1,8 \pm 1,4$, $p=0,034$; 200mM: normopeso: $2,6 \pm 1,4$; sobrepeso: $3,2 \pm 1,3$; obesidad: $2,8 \pm 1,5$, $p=0,051$).

4.3.5.5 ÁCIDO

En la tabla 4.114 se presenta la descriptiva para la percepción del sabor salado mediante el test de sabores con sal común.

Tabla 4.114 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor ácido por el compuesto ácido cítrico según las distintas concentraciones testadas.

Ácido cítrico (mM)	Nada	Un poco	Moderado	Fuerte	Muy fuerte	Extremadamente fuerte
1	74	96,1	97,6	0	0	0
5	51,2	86,6	94,5	98,4	0	0
10	22,8	36,2	21,3	12,4	3,9	2,4
17	5,5	30,7	29,1	21,3	7,9	5,5
34	0,8	11,8	24,4	27,6	20,5	15,0

Se recodificaron las variables para los posteriores análisis en no catadores (nada), catadores medios (un poco y moderado) y super catadores (fuerte, muy fuerte y extremadamente fuerte).

4.3.5.5.1 PERCEPCIÓN DEL SABOR ÁCIDO Y EL CONSUMO DE ALIMENTOS

En cuanto al consumo de alimentos no se obtuvieron diferencias significativas de consumo en función de la percepción del sabor ácido. Observamos mayor puntuación en cuanto a la preferencia al sabor amargo y preferencia por el limón/pomelo en los supercatadores que en los no catadores (preferencia sabor amargo: supercatadores $0,6 \pm 0,8$ vs 0 ± 0 , $p=0,052$; preferencia por el limón/pomelo: supercatadores: $0,9 \pm 0,8$ vs $1,5 \pm 0,9$, $p=0,09$).

4.3.5.5.2 PERCEPCIÓN DEL SABOR ÁCIDO Y LA OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

No se observaron diferencias significativas en cuanto a las variables antropométricas ni tampoco de obesidad en función de la percepción del sabor ácido.

4.3.6 ESTUDIO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA. VALORACIÓN DE LOS CAMBIOS

Para el estudio de los cambios obtenidos tras el periodo de intervención dietética se presentan los resultados por grupos de intervención, siguiendo el diseño del estudio. No se presentan los resultados segmentados por obesos/no obesos sino por grupos de manera general. Se analizarán y se comentarán cuando resulten relevantes.

4.3.6.1 CAMBIOS BIOQUÍMICOS TRAS LA INTERVENCIÓN

En la tabla 4.115 se presentan las características basales por grupos de aleatorización. Se puede observar que no existen diferencias significativas para ningún parámetro al inicio del estudio.

En la tabla 4.116, 4.117, 4.118 observamos los cambios en las variables antropométricas y bioquímicas en función del grupo de intervención. En el grupo control no se obtuvieron cambios significativos para ninguna variable. Se registraron cambios positivos y significativos para casi todas las variables antropométricas y bioquímicas estudiadas de los grupos de intervención, en especial del grupo de intervención con dieta mediterránea.

Tabla 4.115 Características basales de la población INDIMED.

Características	Control n=34	AOV n=33	FS n=33	DM (AOV+FS) n=33	P*
Edad (años)	37,8 (9,8)	41,5 ± 8,5	38,9 ± 9,9	37,4 ± 9,1	0,283
Hombres, n (%)	12 (35)	13 (40)	13 (40)	15 (45)	0,897
Mujeres, n (%)	22 (65)	20 (60)	20 (60)	18 (55)	
IMC (Kg/m)	25,3 (4)	26,6 ± 4,4	26,2 ± 4,5	26 ± 3,8	0,641
Sobrepeso, n (%)	13 (38)	13 (39)	14 (42)	15 (45)	0,952
Obesidad, n (%)	5 (15)	6 (18)	5 (15)	5 (15)	0,925
%grasa, n (%)	27,7 (8,1)	27,9 (9,0)	28,1 (8,3)	28 (8,2)	0,966
Grasa visceral	6,0 (3,5)	6,7 (3,9)	6,5 (3,4)	6,3 (3,6)	0,859
Cintura (cm)	85,6 (12,6)	89,2 (13,0)	86,9 (12,4)	87,5 (11,9)	0,690
Cadera (cm)	103,2 (9,0)	103,9 (9,3)	103,7 (8,3)	103,9 (7)	0,986
TAS (mmHg)	120,3 (14,2)	120,7 (12,7)	121,6 (15,5)	120,2 (12,8)	0,972
TAD (mmHg)	75,4 (8,3)	75,4 (9,1)	77,1 (9,0)	76,0 (9,0)	0,860
Glucosa (mg/dL)	88,4 (6,4)	88,8 (11,6)	90,1 (10,6)	88,2 (8,9)	0,866
Colesterol total (mg/dL)	198,2 (41,1)	213,4 (34,8)	217,6 (46,3)	213,9 (36,2)	0,198
TG (mg/dL)	97,7 (79,7)	107,4(60,0)	109,9 (61,5)	93,2 (38,9)	0,313
HDL-C	63,2 (14,9)	64,3 (14,2)	61,6 (13,3)	60,2 (11,6)	0,627
LDL-C	118,0 (32,9)	127,6 (31,8)	133,6 (42,6)	135,0 (32,0)	0,185
Insulina (uU/mL)	8,4 (7,2)	8 (4,8)	9 (57)	7,7 (4,2)	0,773

*p valor para la comparación de medias (variables continuas) o chi cuadrado (variables categóricas). Los valores par alas variables continuas se presentan como medias (DT). Las variables categóricas se presentan tal y como se indican n (número de individuos) % (porcentaje). IMC: índice de masa corporal, TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica, TG: triglicéridos. Las variables TG, glucosa, insulina fueron transformadas logarítmicamente

Tabla 4.116 Media de cambios en variables antropométricas desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED

Media de cambios desde el estado basal a 10 semanas de intervención (95% IC)								
	Control (n=31)	P*	AOV (n=33)	p	FS (n=32)	p	MD (AOV+FS) (n=32)	p
Peso (kg)	-0,18 (- 0,58 , 0,22)	0,367 0,373*	-0,67 (-1,21 , -0,13)	0,017 0,50	-0,88 (-1,46 , -0,31)	0,004 0,074	-1,78 (-2,29 , -1,27)	<0,001 0,567
IMC (kg/m²)	-0,11 (-0,27 , 0,05)	0,169	-0,25 (-0,45 , -0,04)	0,016	-0,31 (-0,52 , -0,10)	0,005	-0,66 (-0,85 , -0,47)	<0,001
Cintura (cm)	-0,92 (-2,2 , 0,36)	0,153 0,305*	-1,83 (-2,65 , -1,02)	<0,001 0,002	-2,22 (-3,74 , -0,70)	0,006 0,045	-3,64 (-2,74 , -0,44)	<0,001 <0,001
Cadera (cm)	0,34 (-0,66 , 1,34)	0,494 0,134*	-2,36 (-3,70 , -1,03)	<0,001 0,039	-1,72 (-2,46 , - 0,98)	<0,001 0,018	-1,91 (-2,6 , -1,21)	<0,001 0,309
% grasa	-0,57 (-1,29 , 0,15)	0,118 0,183	-1,02 (-1,68 , -0,26)	0,004 0,044	-0,93 (-1,48 , -0,38)	0,0016 0,050	-1,30 (-1,94 , -0,67)	<0,001 0,701
Grasa visceral	-0,10 (-0,32, 0,12)	0,374 0,957	-0,18 (-0,44 , 0,08)	0,160 0,863	-0,34 (-0,56 , -0,13)	0,003 0,178	-0,44 (-0,71 , -0,16)	0,003 0,246

Los valores para las variables continuas se presentan como medias (intervalo de confianza al 95%). AOV: aceite de oliva virgen, FS: frutos secos, DM: dieta mediterránea. IMC: índice de masa corporal. El segundo valor de p que aparece es el valor de p ajustado por el porcentaje de cambio de IMC tras la intervención

Tabla 4.117 Media de cambios en la presión arterial y otras variables bioquímicas desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED

Media de cambios desde el estado basal a 10 semanas de intervención (95% IC)								
	Control (n=31)	P*	AOV (n=33)	p	FS (n=32)	p	MD (AOV+FS) (n=32)	p
TAS (mmHg)	-0,83 (-3,11, 1,46)	0,465	-2,09 (-4,49, 0,31)	0,086	-5,57 (-9,17, -1,97)	0,004	-8,86 (-11,91, -5,82)	<0,001
		0,081		0,002		0,018		0,309
TAD (mmHG)	0,0 (-2,09, 2,09)	1,0	0,33 (-2,25, 1,59)	0,726	-3,24 (-5,12, -1,36)	0,001	-4,48 (-6,70, -2,25)	<0,001
		0,007		0,867		0,280		0,631
Glucosa (mg/dL)	-2,74 (-4,87, -0,62)	0,013	-1,64 (-4,05, 0,78)	0,163	-1,72 (-4,98, 1,54)	0,358	-1,06 (-3,45, 1,06)	0,425
		0,009		0,327		0,182		0,602
Insulina (uU/mL)	-1,33 (-2,61, -0,05)	0,024	0,59 (-0,41, 1,58)	0,088	0,56 (-0,67, 1,79)	0,350	-0,44 (-1,68, 0,80)	0,665
		0,038		0,079		0,212		0,814
HOMA index	0,23 (-0,07, 0,53)	0,083	0,11 (-0,12-0,33)	0,182	0,07 (-0,24, 0,38)	0,523	-0,15 (-0,46, 0,15)	0,549
		0,861		0,160		0,718		0,947
Urea (mg/dL)	-0,9 (-3,17, 1,36)	0,422	-2,22 (-4,60, 0,17)	0,067	-5 (-7,40, -2,60)	<0,001	-5,19 (-9,1, -1,28)	0,011
		0,762		0,638		0,001		0,331
Creatinina (mg/dL)	0,0 (-0,04, 0,03)	0,825	-0,01 (-0,05, 0,02)	0,494	-0,02 (-0,04, 0,01)	0,263	-0,15 (-0,44, 0,15)	0,313
		0,760		0,596		0,127		0,279

Tabla 4.117. Media de cambios en la presión arterial y otras variables bioquímicas desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED (continuación).

Media de cambios desde el estado basal a 10 semanas de intervención (95% IC)								
	Control	P*	AOV	p	FS	p	MD (AOV+FS)	p
	(n=31)		(n=33)		(n=32)		(n=32)	
Ácido úrico (mg/dL)	0,08 (-0,10 , 0,026)	0,374	0,17 (-0,08 , 0,42)	0,172	-0,16 (-0,37 , 0,06)	0,154	-0,08 (-0,44 , 0,27)	0,628
		0,409		0,187		0,970		0,495
GOT (mg/dL)	-0,68 (-2,10 , 0,75)	0,339	-0,30 (-2,2 , 1,59)	0,747	-0,94 (-3,55 , 1,68)	0,471	-1,69 (-3,38 , 0)	0,051
		0,502		0,646		0,143		0,420
GPT (mg/dL)	-2,68 (-5,27 , -0,08)	0,044	-1,79 (-5,28 , 1,71)	0,305	-0,34 (-3,83 , 3,15)	0,842	-4,56 (-7,1 , -2,02)	<0,001
		0,047		0,336		0,138		0,078
Gamma GPT (mg/dL)	0,13 (-3 , 3,26)	0,934	0,88 (-0,84 , 2,60)	0,307	-1,66 (-4,94 , 1,62)	0,311	-4,47 (-7,87 , -1,07)	0,012
		0,890		0,851		0,945		0,173

Los valores para las variables continuas se presentan como medias (intervalo de confianza al 95%).

AOV: aceite de oliva virgen, FS: frutos secos, DM: dieta mediterránea. TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica.. *La primera p valor para las diferencias tras la intervención. El segundo valor de p que aparece es el valor de p ajustado por el porcentaje de cambio de IMC tras la intervención. Las variables glucosa, insulina fueron transformadas logarítmicamente

Tabla 4.118 Media de cambios en el metabolismo de lípidos desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED.

Media de cambios desde el estado basal a 10 semanas de intervención (95% IC)								
	Control (n=31)	P*	AOV (n=33)	p	FS (n=32)	p	MD (AOV+FS) (n=32)	p
CT (mg/dL)	1,39 (-8,09 , 10,87)	0,767	-8,94 (-16,35 , -1,52)	0,020	-23,84 (-35,15,-12-53)	<0,001	-25,13 (-31,93, -18,32)	<0,001
		0,793		0,229		0,001		<0,001
LDL-C (mg/dL)	5,52 (-6,84 , 17,88)	0,369	3,24 (-3,34 , 9,82)	0,323	-11,9 (-22,5, -1,3)	0,029	-12,03 (-17,91 , -6,16)	<0,001
		0,326		0,034		0,023		0,051
HDL-C (mg/dL)	3,42 (-6,26 , 13,09)	0,476	-1,48 (-3,81 , 0,084)	0,202	-2,9 (-5,62 , -0,19)	0,037	-3,41 (-5,85 , 0,96)	0,008
		0,565		0,398		0,519		0,003
LDL/HDL	0,08 (-0,17, 0,35)	0,501	0,11 (-0,01, 0,2)	0,076	-0,10 (-0,3, 0,1)	0,249	-0,06 (-0,18, 0,06)	0,316
		0,569		0,580		0,148		0,186
TG (mg/dL)	-3,42 (-21,56, 14,72)	0,849	-13,15 (-35,69 , -9,39)	0,170	3,66 (-12,87 , 20,18)	0,858	-8,16 (-19,8 , 3,49)	0,109
		0,154		0,966		0,427		0,677
APOA (mg/dL)	-11,24 (-16,48 , - 6)	<0,001	-12,73 (-18,63 , 6,83)	<0,001	-15,7 (-24,4 , -8,06)	<0,001	-14,77 (-20,7 , -8,84)	<0,001
		0,001		0,002		0,002		<0,001
APO B (mg/dL)	-0,48 (-9,67 , 8,71)	0,915	-3 (-10,13 , 4,13)	0,396	-13,3 (-21,20 , -5,46)	0,002	4,13 (-7,83 , -0,44)	0,030
		0,883		0,909		0,002		0,111

Tabla 4.118. Media de cambios en el metabolismo de lípidos desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED (continuación)

Media de cambios desde el estado basal a 10 semanas de intervención (95% IC)								
	Control (n=31)	P*	AOV (n=33)	p	FS (n=32)	p	MD (AOV+FS) (n=32)	p
APOB/APOA1	0,1 (0,05, 0,14)	<0,001	0,08 (0,06, 0,1)	<0,001	0,01 (-0,05,0,06)	0,728	0,04 (0,02, 0,06)	<0,001
		0,008		0,580		0,006		<0,001
Lpa (mg/dl)	-1,38 (-3,42 , 0,66)	0,792	-1,70 (-3,72 , 0,32)	0,039	-1,7 (-4,51 , 1,05)	0,395	-0,96 (-9,91 , 7,99)	0,670
				0,093		0,219		0,252
PCRus (mg/dL)	0,37 (-0,76, 1,5)	0,549	-0,37 (-0,82 , 0,06)	0,571	0,2 (-0,02 , 0,42)	0,156	-0,1(-0,7 , 0,6)	0,952
		0,929		0,172		0,235		0,200

Los valores para las variables continuas se presentan como medias (intervalo de confianza al 95%).

AOV: aceite de oliva virgen, FS: frutos secos, DM: dieta mediterránea. TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica, TG: triglicéridos, Lp(a)= lipoproteína a, PCRus=Proteína C reactiva ultrasensible.

Las variables TG, Lp(a) y PCRus fueron transformadas logarítmicamente

*La primera p valor para las diferencias tras la intervención. El segundo valor de p que aparece es el valor de p ajustado por el porcentaje de cambio de IMC tras la intervención

Se creó un modelo multivariante para comprobar si los cambios obtenidos tras la intervención eran debidos por el cambio de peso, ya que tras el periodo de intervención observamos una pérdida de peso significativa en el grupo de AOV, FS y DM. Los valores de p ajustada se presentan en la tabla 4.119, 4.120, 4.121.

Al analizar los cambios por grupo y sexo se obtuvieron diferencias significativas para los parámetros inicialmente significativos en la población general. En la figura 4.39, 4.40 y 4.41 se presentan los cambios para algunas variables estudiadas por sexo (colesterol, IMC, tensión arterial sistólica).

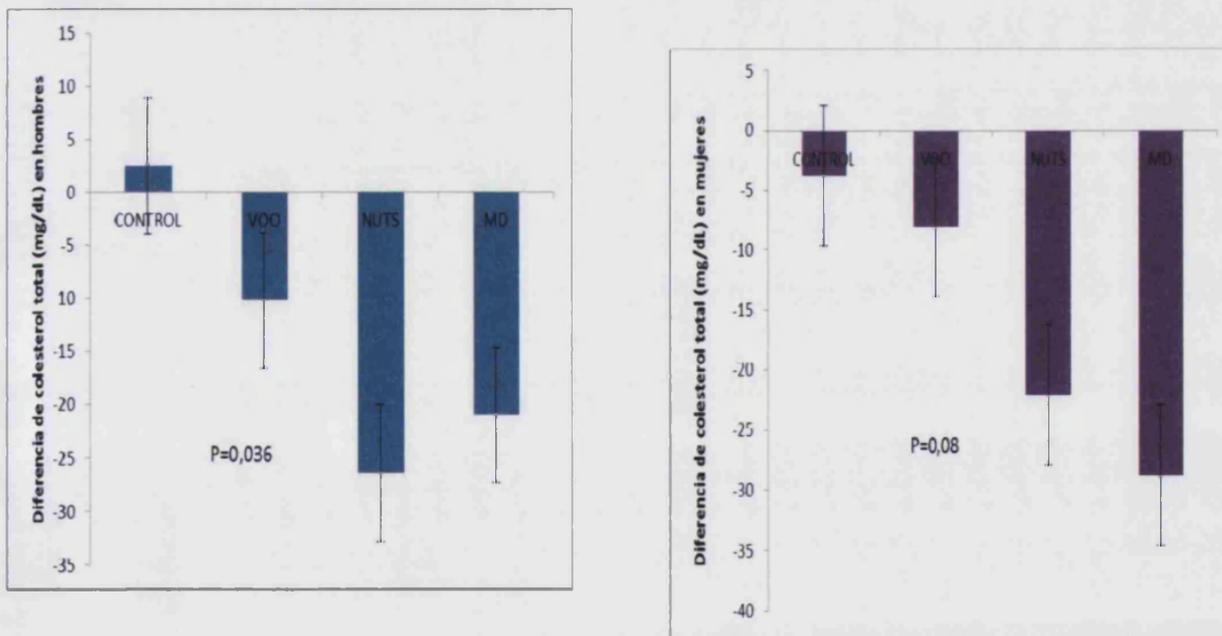


Figura 4. 39 Diferencias de colesterol (mg/dL) en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en función del grupo de intervención en el estudio INDIMED.

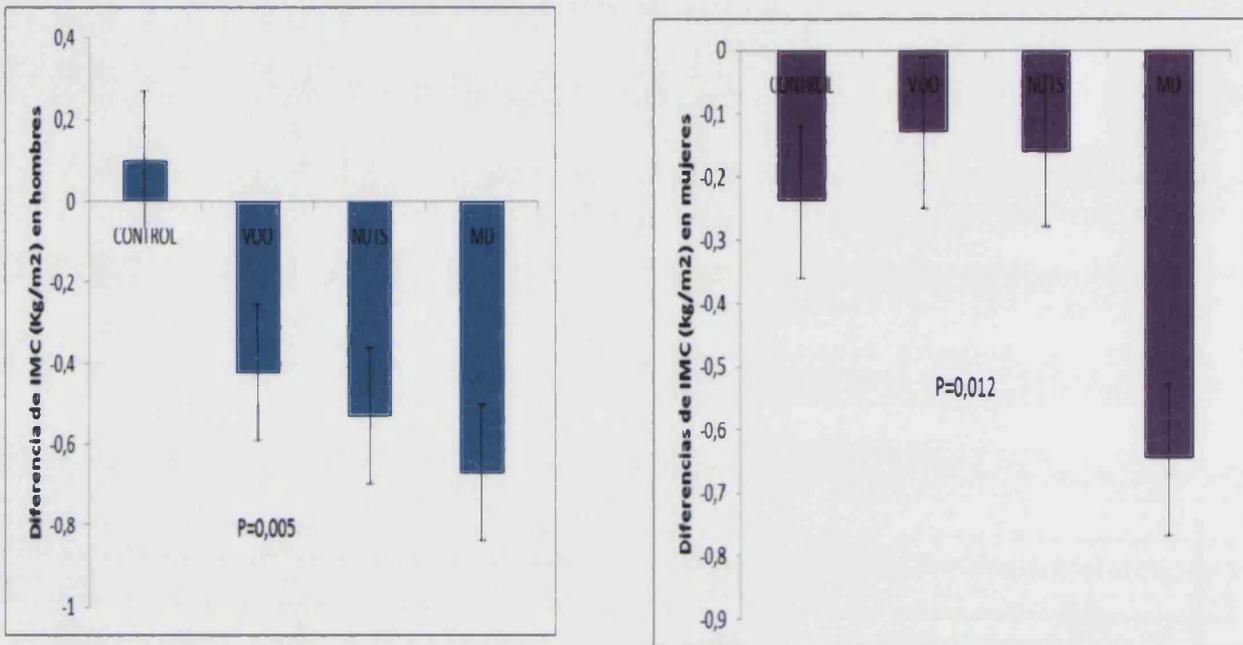


Figura 4. 40 Diferencias de IMC (mg/dL) en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en función del grupo de intervención en el estudio INDIMED.

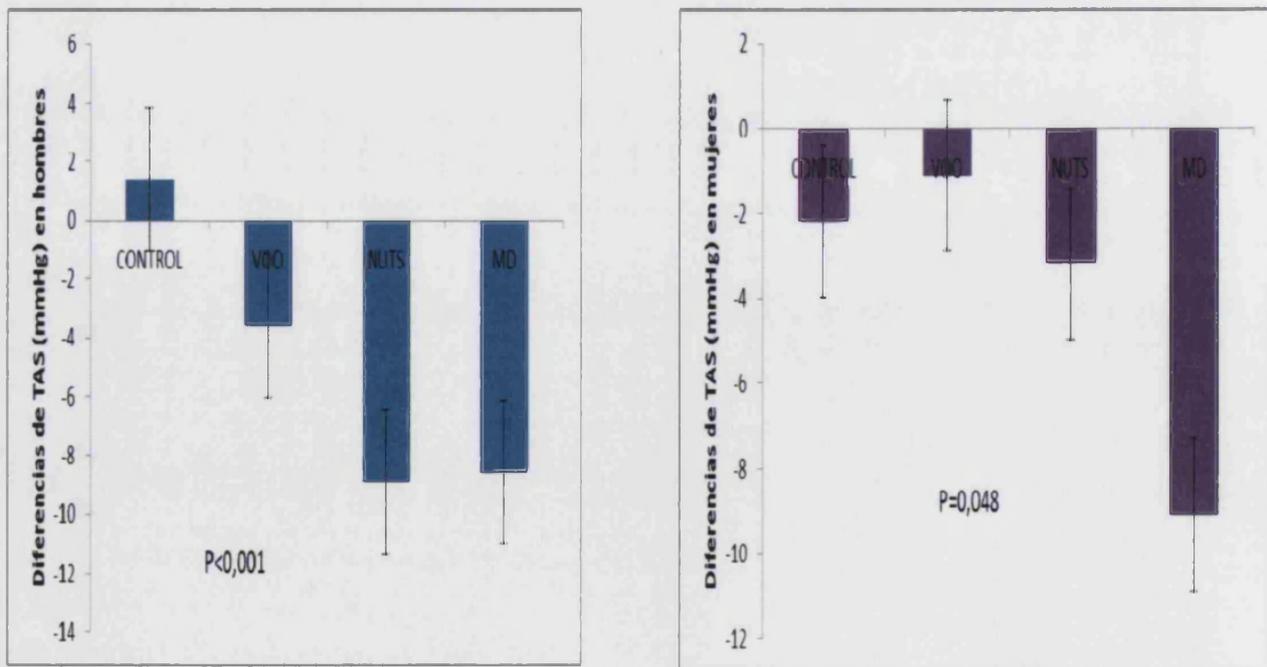


Figura 4.41 Diferencias de TAS (tensión arterial sistólica) (mmHg) en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en función del grupo de intervención en el estudio INDIMED.

4.3.6.2 CAMBIOS DE CONSUMO DE ALIMENTOS, ENERGÍA Y NUTRIENTES TRAS LA INTERVENCIÓN

En la tabla 4.119 se presentan los cambios en la ingesta de energía y nutrientes tras la intervención por grupos. Los cuatro grupos disminuyen el consumo de ácidos grasos saturados. Asimismo, los tres grupos de intervención aumentan el consumo de ácidos grasos monoinsaturados. El grupo de frutos secos y de dieta mediterránea disminuyeron el consumo energético total. El cambio del consumo de energía procedente del aceite de oliva virgen fue significativamente superior en el grupo de intervención con aceite de oliva virgen y con dieta mediterránea. Esto también fue así cuando consideramos la energía procedente de los frutos secos tanto en el grupo de intervención con frutos secos como el en el de dieta mediterránea tras compararlo con el grupo control.

Tabla 4.119 Cambios de la ingesta de energía y nutrientes tras el periodo de intervención en el estudio INDIMED.

Nutrientes	Media de cambios (95% IC)				P(C vs AOV) *	P (C vs FS)*	P (C vs DM)*
	Control (n=31)	AOV (n=32)	FS (n=32)	DM (n=32)			
Energía, Kcal	-279,8 (-548,1;-11,5)	-198,1 (-463,3;67)	-462,3 (-754,7;-169,9)	-687,3 (-949,9;-424,7)	0,669	0,364	0,034
Energía HC, %	9,4 (5,8; 12,9)	4,0 (0,4;7,5)	6,0 (2,1;9,9)	10,7 (7,2; 14,2)	0,038	0,218	0,597
Energía proteína, %	-0,441 (-1,8;0,97)	-1,2(-2,6;0,19)	-1,7 (-3,2;-0,2)	-2,8(-4,1;-1,4)	0,448	0,221	0,021
Energía grasa, %	-3,9 (-8,0;0,3)	2,1(-2,0;6,2)	-2,0(-6,5;2,5)	-4,9(-8,9;-0,9)	0,045	0,540	0,717
AGS, %	-3,9 (-6,3;-1,6)	-2,1(-7,3;2,7)	-2,5(-5,1;0,1)	-5,0(-7,3;-2,7)	0,276	0,413	0,536
AGMI, %	2,8(0,9;4,7)	5,2(3,3;7,1)	2,6(0,5;4,7)	3,3(1,4; 5,32)	0,081	0,904	0,719
AGPI, %	-1,7 (-3,2;-0,2)	-0,4(-1,9;1,1)	-0,3(-2,0;1,3)	-0,7(-2,2;0,7)	0,243	0,224	0,361
Energía AOV, %	-1,4(-9,8;7)	-16,3 (-20,8;-11,8)	-1,3(-8,1;3,5)	-13,8 (-18,2;-9,4)	0,003	0,935	0,012
Energía FS, %	0,2 (-1,0, 1,5)	1,1(-0,1,2,4)	-3,5(-4,8;-2,1)	-4,9 (-6,1; -3,7)	0,313	<0,001	<0,001

AOV: aceite de oliva virgen, FS: Frutos secos, DM: dieta mediterránea; AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; HC: hidratos de carbono. * P valor para las diferencias entre grupos ajustados por sexo, edad e IMC basal.

4.3.6.3 CAMBIOS EN LA ADHERENCIA A LA DIETA MEDITERRÁNEA TRAS LA INTERVENCIÓN

Basándonos en el cuestionario de 14 puntos de adherencia a la dieta mediterránea, analizamos los cambios obtenidos tras el periodo de intervención dietética según los grupos. Valorando la adherencia total a la dieta mediterránea se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en todos los grupos excepto en el grupo control. Destacar la diferencia en el grupo de dieta mediterránea donde hubo un cambio de 5,6 puntos. Esto es indicativo de la buena realización del estudio de intervención cumpliéndose los objetivos propuestos (Tabla 4.120 y figura 4.42). En el grupo de intervención con aceite de oliva virgen (AOV), no solo aumentaron el consumo de AOV sino que también hubo un mayor número de personas que consumieron más de dos raciones de verdura al día ($p=0,006$), y menos de dos raciones al día de repostería comercial ($p=0,001$). En el grupo de frutos secos (FS) además de que el 100 % de las personas de este grupo consumieron más de 3 veces a la semana FS (todos los días según la intervención propuesta) también mejoraron la adherencia al consumo de aceite de oliva ($p=0,001$), el consumo de pescado (0,016) y de sofritos ($p=0,031$).

Tabla 4.120 Cambios en la adherencia a la DM según los 14 puntos estudiados tras el periodo de intervención en cada uno de los grupos en el estudio INDIMED

Cambios basales hasta las 10 semanas de intervención								
	Grupo control		Grupo AOV		Grupo FS		Grupo DM (AOV+FS)	
	(n=31)	p	(n=33)	p	(n=32)	p	(n=32)	p
1. ¿Usa ud el AO como principal grasa para cocinar? (Si)								
Basal (%)	93,3	0,040	96,9	0,991	100	1	93,5	0,161
Final (%)	96,4		100		100		100	
2. Consumo al día de AO (4 o mas cucharadas)								
Basal (%)	40,7	0,022	65,5	0,009	55,2	0,001	45,2	<0,001
Final (%)	60,7		93,3		88,5		100	
3. Raciones de verdura/día (2 o más)								
Basal (%)	25,9	0,664	46,9	0,006	24,1	0,256	45,2	<0,001
Final (%)	39,3		70		38,5		92,6	
4. Piezas de fruta/día (3 o mas)								
Basal (%)	25,9	0,185	46,9	0,057	24,1	0,103	45,2	<0,001
Final (%)	39,3		70		38,5		92,7	
5. Cuantas raciones de carne roja/embutido/día (menos de 1 día)								
Basal (%)	77,8	1	78,1	1	65,5	0,49	71	0,003
Final (%)	78,6		80		73,1		96,3	
6. Raciones mantequilla, margarina, nata/día (menos de 1/día)								
Basal (%)	92,6	0,185	81,3	0,083	69	0,265	93,5	0,161
Final (%)	82,1		93,3		84,6		100	
7. Bebidas carbonatadas/azucaradas al día (menos de 1 al día)								
Basal (%)	70,4	0,664	68,8	0,083	65,5	0,77	80,6	0,022
Final (%)	71,4		76,7		65,4		100	

P valor para la comparación entre la adherencia basal y final (test comparación de muestras relacionadas).

Tabla 4.120. Cambios en la adherencia a la DM según los 14 puntos estudiados tras el periodo de intervención en cada uno de los grupos (continuación)

Cambios basales hasta las 10 semanas de intervención								
	Grupo control p (n=31)		Grupo AOV p (n=33)		Grupo FS p (n=32)		Grupo DM (AOV+FS) P* (n=32)	
8. Consumo de vino a la semana (7 o mas vasos/semana)								
Basal (%)	7,4	0,327	12,5	0,326	20,7	1	12,9	0,043
Final (%)	14,3		16,7		19,2		25,9	
9. Raciones de legumbres a la semana (3 o mas/semana)								
Basal (%)	25,9	0,574	28,1	0,017	17,2	0,265	19,4	<0,001
Final (%)	28,6		50		23,1		88,9	
10. Raciones de pescado/marisco/semana (3 o mas/semana)								
Basal (%)	48,1	0,161	43,8	0,161	34,5	0,016	35,5	<0,001
Final (%)	53,6		56,7		53,8		96,3	
11. Reposteria comercia a la semana (menos de 2/semana)								
Basal (%)	44,4	0,77	43,8	0,001	44,8	0,185	41,9	<0,001
Final (%)	46,4		76,7		57,7		96,3	
12. Consumo de frutos secos a la semana (3 o mas/semana)								
Basal (%)	37	0,327	25	0,161	34,5	<0,001	32,3	<0,001
Final (%)	39,3		40		100		100	
13. Consumo preferente carne blanca frente carne roja								
Basal (%)	81,5	0,574	84,4	0,573	79,3	0,713	74,2	0,003
Final (%)	85,7		86,7		80,8		100	
14. Aderezo con sofritos (2 o mas/semana)								
Basal (%)	74,1	1	71,9	0,745	62,1	0,031	67,7	0,022
Final (%)	71,4		76,7		80,8		92,6	
Total de puntos**								
Basal	7,8 (2,9)	0,173	8,1 (2,2)	0,005	6,8 (2,1)	<0,001	7,4 (2)	<0,001
Final	8,3 (3)		9,9 (1,9)		9,2 (2,4)		13 (0,7)	

*P valor para la comparación entre la adherencia basal y final. (Test comparación de muestras relacionadas). **media (DT)

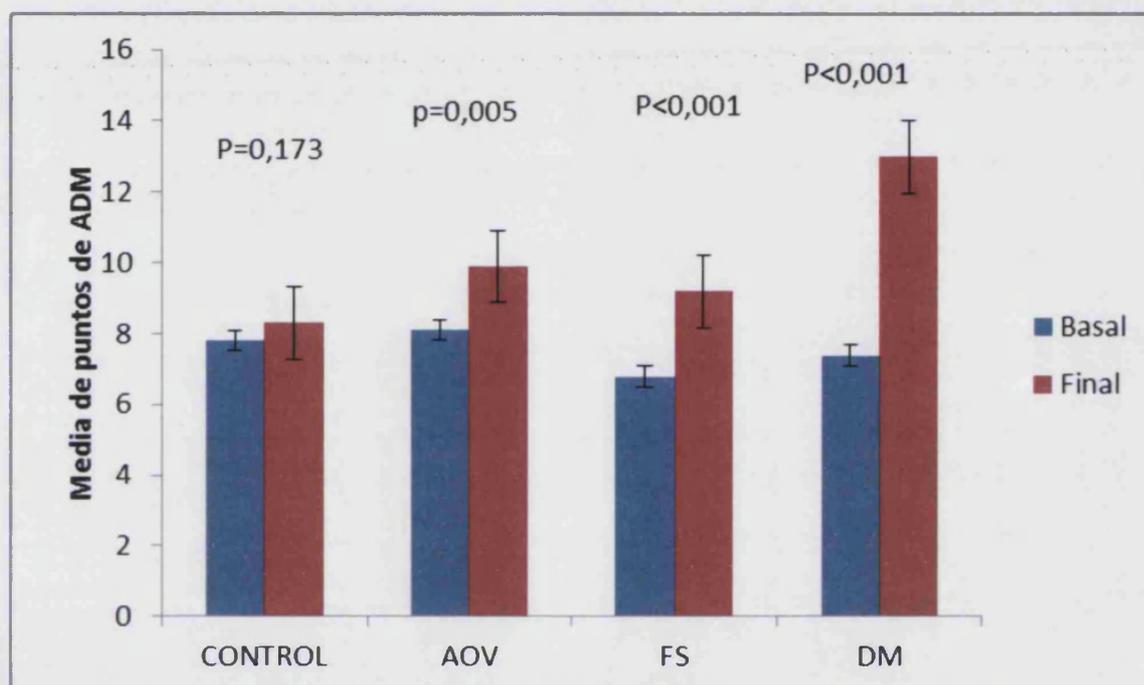


Figura 4.42 Cambios en la adherencia a la dieta mediterránea tras el periodo de intervención en el estudio INDIMED. ADM: Adherencia a la dieta mediterránea.

En la tabla 4.121 se muestran los cambios en la adherencia a la dieta mediterránea en función tras la intervención del sobrepeso y en la tabla 4.122 las diferencias sociodemográficas según aquellos individuos que obtienen cambios en más de cuatro puntos o menos en la adherencia a la dieta mediterránea tras la intervención.

Tabla 4.121 Cambios en la adherencia a la dieta mediterránea según sobrepeso en el estudio INDIMED.

	No sobrepeso Media (DT)	Sobrepeso Media (DT)	p
CONTROL	1 (2,1)	0,(1,5)	0,281
AOV	1,2 (1,7)	2,4 (2,2)	0,118
FS	1,7 (2,5)	2,8 (2,1)	0,276
DM	4,9 (1,5)	6,3 (2,2)	0,063

* P valor ajustado por edad y sexo.

Tabla 4.122 Porcentaje de participantes según variables sociodemográficas y fisiológicas que tienen que obtuvieron cambios en la adherencia a la dieta mediterránea de mas de 4 puntos o menos en el estudio INDIMED.

Variables		<4 puntos	>4 puntos	p
BMI (kg/m ²)	<25	64,1	53,6	0,224
	≥25	35,9	46,4	
Sexo	Hombre	35,9	39,3	0,460
	Mujer	23,1	3,6	
Estudios	Estudios primarios	29,5	35,7	0,782
	Bachiller	29,5	21,4	
	Diplomatura	16,7	21,4	
	Licenciatura	24,4	21,4	
Camina mas de 30 min	Si	55,8	60,7	0,414
	No	44,2	39,3	
Fumador actual	No	76,9	96,4	0,015
	Si	23,1	3,6	

4.3.7 ESTUDIO GENÉTICO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS ASOCIACIONES

4.3.7.1 PREVALENCIA DE GENOTIPOS Y FRECUENCIA ALÉLICA

A partir de los resultados obtenidos mediante las técnicas de análisis de polimorfismos descritas en el apartado 3 de material y métodos, se realizó un estudio de prevalencia para cada una de las variantes de los polimorfismos estudiadas en esta población

En la tabla 4.123 se muestran las prevalencias de los polimorfismos en los genes estudiados tanto de manera global como por sexo. Los polimorfismos relacionados con el sabor amargo se presentaron en la sección correspondiente.

Tabla 4.123 Frecuencia genotípica de los polimorfismos estudiados en el estudio INDIMED.

Polimorfismo	Genotipo	Total n, (%)	Hombres n, (%)	Mujeres n, (%)	p*	P **
<i>NEGR1</i> <i>rs25689558</i>	AA	59 (47,6)	26 (51)	33 (45,2)	0,052	0,984
	AG	53 (42,7)	24 (47,1)	29 (39,7)		
	GG	12 (9,7)	1 (2,0)	11 (15,1)		
<i>APOA2</i> <i>rs5082</i>	TT	58 (46,4)	24 (47,1)	34 (45,9)	0,654	0,095
	TC	48 (38,4)	21 (41,2)	27 (36,5)		
	CC	19 (15,2)	6 (11,8)	13 (12,5)		
<i>APOA5</i> <i>S19W</i>	SS	114 (90,5)	45 (80,2)	69 (92,0)	0,779	0,001
	SW	10 (7,9)	5 (9,8)	5 (6,7)		
	WW	2 (1,6)	1 (2,0)	1 (1,3)		
<i>GCKR</i> <i>P446L</i>	PP	40 (32,5)	18 (36,7)	22 (29,7)	0,607	0,141
	PL	67 (54,5)	24 (49,0)	43 (58,1)		
	LL	16 (13,0)	7 (14,3)	9 (12,2)		

* P valor para las diferencias entre hombres y mujeres. ** P valor del equilibrio Hardy-Weinberg

4.3.7.2 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON OBESIDAD Y MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

4.3.7.2.1 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO *rs2568958* DEL GEN *NEGR1* Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

En la tabla 4.124 se muestra la asociación del polimorfismo *rs2568958* del gen *NEGR1* con variables antropométricas la muestra de población general.

Tras el estudio de los descriptivos obtenidos para dicho polimorfismo se decidió establecer un modelo dominante. Así, se establecieron dos grupos, por un lado los homocigotos AA y por otro los heterocigotos y homocigotos mutados (GA+GG).

Tabla 4.124 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs2568958 del gen *NEGR1* en el estudio INDIMED.

Variable	rs2568958		P*	
	AA Media (DT)	GG+GA Media (DT)		
Peso (kg)	Hombres	83,2 (10,5)	77,2 (9,4)	0,037
	Mujeres	64,2 (10,2)	67,7 (11,6)	0,192
	Total	72,6 (14,0)	71,3 (11,7)	0,584
IMC (Kg/m ²)	Hombres	26,7 (3,8)	26,5 (3,5)	0,812
	Mujeres	24,6 (3,9)	25,8 (4,3)	0,230
	Total	25,6 (4,0)	26,1 (3,9)	0,463
Cintura (cm)	Hombres	93,3 (12,5)	91,9 (12,5)	0,665
	Mujeres	82,3 (10,2)	83,3 (12,1)	0,686
	Total	87,1 (12,5)	86,7 (11,7)	0,831
Cadera (cm)	Hombres	103,9 (6,1)	101,9 (4,5)	0,193
	Mujeres	101,3 (8,3)	105,1 (9,5)	0,081
	Total	102,5 (7,5)	103,9 (8,1)	0,324
% grasa	Hombres	21,5 (5,7)	22,8 (6,5)	0,453
	Mujeres	31,1 (7,5)	31,8 (7,1)	0,684
	Total	26,9 (8,2)	28,3 (8,1)	0,322
Grasa visceral	Hombres	7,7 (4,2)	9,0 (3,8)	0,282
	Mujeres	4,8 (2,2)	5,2 (2,9)	0,533
	Total	6,1 (3,6)	6,6 (3,7)	0,408

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba T de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal

Al estudiar las asociaciones por sexo se observaron diferencias significativas para el peso, en el caso de los hombres ($p=0,037$) siendo los homocigotos AA los que mayores valores presentaron. Tras ajustar por sexo y edad no se obtuvieron cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados.

En la tabla 4.125 se muestran las diferentes prevalencias de sobrepeso y obesidad en función del genotipo.

Tabla 4.125 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo en el estudio INDIMED.

Variable	rs2568958 (NEGRI)		P*
	AA (%)	AG+GG (%)	
Sobrepeso	Sí	52,5	0,256
	No	47,5	
Obesidad	Sí	15,3	0,512
	No	84,7	

* Se empleó un test χ^2 para comparar porcentajes entre los distintos genotipos. P: significación exacta bilateral. **P de tendencia lineal.

Finalmente, estimamos el riesgo de obesidad sin observar diferencias significativas.

4.3.7.2.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs5082 DEL GEN APOA2 Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

Se realizó un análisis de este polimorfismo con variables antropométricas. Los homocigotos CC (portadores de la variante mutada en homocigosis) presentaron mayor índice de masa corporal que los TT+TC (CC: $27,1 \pm 7,3$ vs TT+TC: $25,7 \pm 3,8$ kg/m²; p=0,139) y también mayor circunferencia de la cadera (CC: $102,6 \pm 7,2$ vs TT+TC: $25,7 \pm 3,8$ Kg/m²; p=0,039). Al estratificar por sexo, las mujeres CC presentaron mayores niveles de índice de masa corporal, circunferencia de la cintura y de cadera que los TT+TC (figura 4.43).

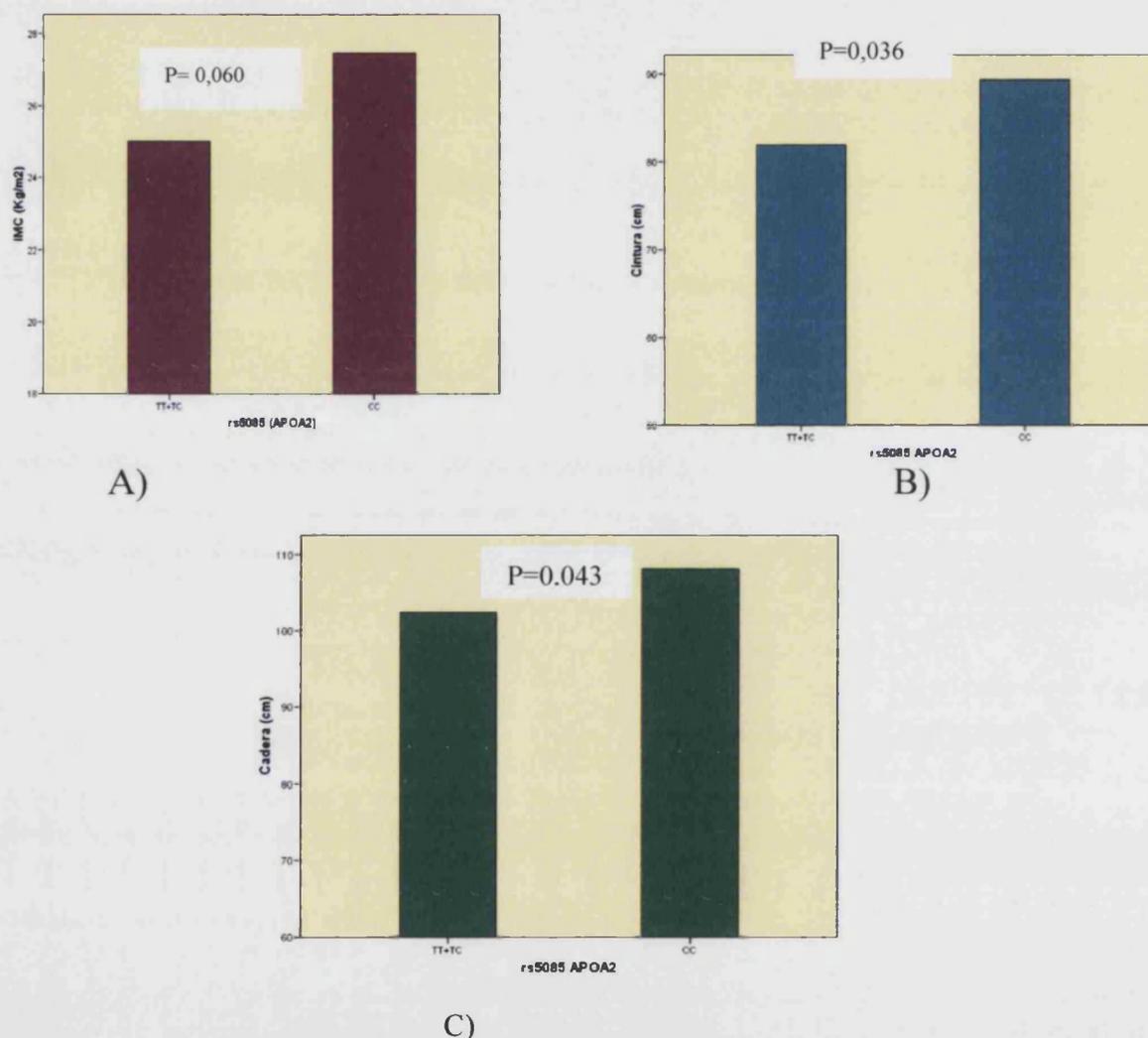


Figura 4.43 Asociación del polimorfismo rs5082 en el gen de la *APOA2* y variables antropométricas en mujeres en el estudio INDIMED. A) Asociación con el IMC. B) Asociación con la circunferencia de la cintura. C) Asociación con la circunferencia de la cadera.

Posteriormente, y por la relación de la apolipoproteína A en el metabolismo de TG se realizó un análisis de este polimorfismo con concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados. En la tabla 4.126 se presentan las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del polimorfismo del promotor del gen de la *APOA2*. Tras el análisis exploratorio y en base a la bibliografía se creó un modelo recesivo. Se observan diferencias significativas para las concentraciones de triglicéridos, APOA y APOB. Tras ajustar por edad no se observaron cambios.

Tabla 4.126 Valores de las variables lipídicas de la población según el SNP rs5082 en el gen *APOA2* en el estudio INDIMED.

Variable		rs5082		P*
		TT+CT Media(DT)	CC Media(DT)	
Triglicéridos (mg/dL)	Hombres	121,1 (69,1)	178,8 (144,7)	0,162
	Mujeres	78,9 (29,4)	102,3 (42,7)	0,023
	Total	96,7 (54,1)	126,5 (91,5)	0,048
CT (mg/dL)	Hombres	218,6 (43,1)	231,9 (35,7)	0,475
	Mujeres	204,7 (38,2)	215,0 (39,7)	0,386
	Total	210,6 (40,7)	220,3 (38,4)	0,337
HDL-C (mg/dL)	Hombres	57,5 (12,7)	54,5 (8,8)	0,582
	Mujeres	67,4 (13,1)	63,2 (12,7)	0,292
	Total	63,2 (13,8)	60,4 (12,1)	0,416
LDL-C (mg/dL)	Hombres	136,6 (40,1)	141,3 (28,0)	0,781
	Mujeres	121,6 (32,3)	131,4 (33,3)	0,328
	Total	127,9 (33,3)	134,5 (31,3)	0,457
APOA (mg/dL)	Hombres	157,1 (17,9)	151,7 (20,5)	0,586
	Mujeres	170,4 (22,7)	162,6 (30,9)	0,479
	Total	165,6 (21,9)	157,8 (25,8)	0,323
APOB (mg/dL)	Hombres	103,8 (29,0)	120,5 (35,2)	0,209
	Mujeres	98,9 (22,0)	106,0 (15,2)	0,021
	Total	94,7 (25,9)	111,4 (24,6)	0,018
Lpa (mg/dL)	Hombres	25,7 (26,8)	20,0 (20,5)	0,614
	Mujeres	25,6 (26,1)	39,4 (29,1)	0,093
	Total	25,6 (26,2)	33,3 (23,7)	0,250

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; CT: colesterol total.

4.3.7.3 ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES CON CONCENTRACIONES DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

4.3.7.3.1 ESTUDIO DEL POLIMORFISMOS S19W DEL GEN DE LA APOA5 Y SUS ASOCIACIONES CON CONCENTRACION DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS.

El número de personas homocigotas para la variante W fue bajo, sin embargo, los datos se presentan en tres categorías para poder apreciar los cambios en las variables bioquímicas. Tal y como se aprecia en la tabla 4.127, las principales asociaciones de este polimorfismo son con colesterol total y LDL-c siendo los homocigotos WW los que presentaron niveles superiores. Al estratificar por edad es cuando se observan diferencias significativas para dichos parámetros en la categoría (25-45 años) (debido al escaso tamaño de muestra y la baja frecuencia genotípica de este polimorfismo los valores para los individuos con una edad superior a 45 años no se pudo calcular porque no se observaron mas de dos categorías, todos eran SS).

Tabla 4.127 Valores de las variables lipídicas de la población según los diferentes genotipos (S19W en el gen *APOA5*) en el estudio INDIMED.

Variables	S19W			P*	
	SS Media(DT)	SW Media(DT)	WW Media (DT)		
Triglicéridos (mg/dL)	Total	101,0 (63,0)	103,6 (52,0)	97,5 (7,8)	0,938
	25-55 años	92,8 (7,8)	103,6 (52,0)	97,5 (7,8)	0,856
Colesterol (mg/dl)	Total	212,4 (49,7)	199,7 (40,8)	265,0 (46,7)	0,110
	25-55 años	199,2 (32,6)	199,7 (40,8)	265,0 (46,7)	0,029
HDL-c (mg/dL)	Total	62,6 (12,9)	65,2 (19,1)	64,0 (22,6)	0,831
	25-55 años	62,4 (13,3)	65,2 (19,1)	64,0 (22,6)	0,835
LDL-c (mg/dL)	Total	129,4 (35,1)	113,6 (32,7)	181,5 (21,9)	0,042
	25-55 años	118,1 (30,3)	113,6 (32,7)	181,5 (21,9)	0,015

*Indica resultados estadísticamente significativos, $p < 0,05$. Se empleó la prueba *T* de Student para comparar medias. DT: desviación estándar; CT: colesterol total.

4.3.7.3.2 ESTUDIO DEL POLIMORFISMO rs1260326 (P446L) DEL GEN GCKR Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES.

La tabla 4.128 muestra la asociación del polimorfismo rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* con variables lipídicas en la muestra de población general.

Se observa un incremento en la concentración de triglicéridos de manera que los heterocigotos y los homocigotos mutados presentan los mayores niveles en concentración ascendente, aunque sin alcanzar la significación estadística.

Tabla 4.128 Valores de las variables lipídicas de la población general según los diferentes genotipos del rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* en el estudio INDIMED.

Variable	rs1260326 (P446L)			P*
	PP	PL	LL	
	Media (EE)	Media (EE)	Media(EE)	
Triglicéridos (mg/dL)	96,0 (9,2)	101,7 (7,0)	112,1(14,5)	0,563
CT-total (mg/dL)	213,7 (5,9)	209,3 (4,5)	211,6 (9,3)	0,841
HDL-C (mg/dL)	64,0 (2,0)	63,0 (1,5)	57,1 (3,1)	0,167
LDL-C (mg/dL)	129,8 (5,2)	125,8 (4,0)	131,8 (8,1)	0,735
APOA (mg/dL)	164,6 (4,0)	165,6 (3,1)	156,3 (6,8)	0,460
APOB (mg/dL)	98,6 (4,1)	93,2 (3,1)	109,1 (6,3)	0,077

Los valores de los parámetros analizados son presentados como media y error estándar ajustados por sexo, edad, IMC. *P valor del ajuste multivariante por sexo, edad, IMC basal. EE: error estándar; IMC: índice de masa corporal, CT: Colesterol total.

En la figura 4.44 se presentan la asociación del polimorfismo por grupos de edad y algunos parámetros en los que se obtuvieron diferencias más importantes. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas.

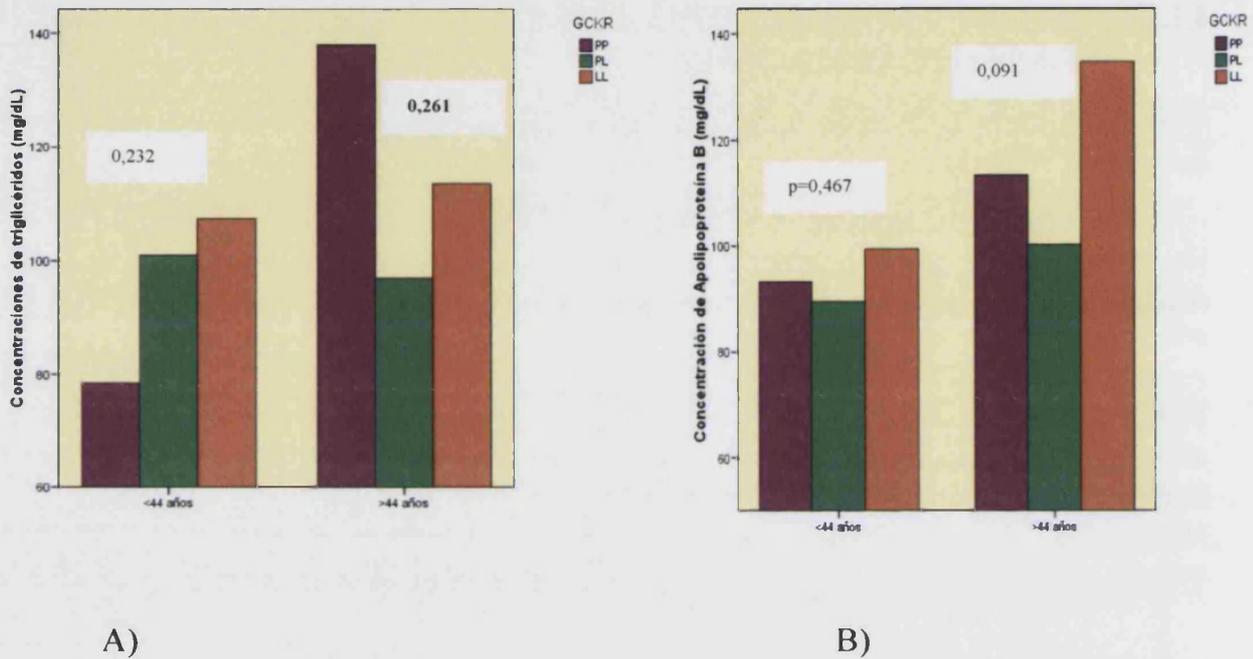


Figura 4.44 A. Concentraciones medias de triglicéridos (mg/dL) por grupos de edad según el genotipo (rs1260326 P446L) del gen *GCKR*. B. Concentraciones medias de apolipoproteína B (mg/dL) por grupos de edad según el genotipo (rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* en el estudio INDIMED.

4.3.7.4 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES GEN-AMBIENTE EN LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LAS OBESIDAD Y PARÁMETROS RELACIONADOS

4.3.7.4.1 POLIMORFISMO rs2568958 DEL GEN *NEGR1*

No se encontraron interacciones gen-dieta para este gen.

4.3.7.4.2 POLIMORFISMO rs5085 DEL GEN *APOA2*

Se observó una interacción gen*adherencia mediterránea al considerar la adherencia alta y baja en función de la puntuación media de adherencia a la dieta mediterránea y el índice de masa corporal y la circunferencia de la cintura (Figura 4.45). Los individuos CC presentaron mayores valores y significativos tanto de IMC como de circunferencia de la cintura en comparación con los TT+TC cuando tenían una baja adherencia a la dieta mediterránea. En cambio, cuando la adherencia era alta esta diferencia desapareció en ambos casos.

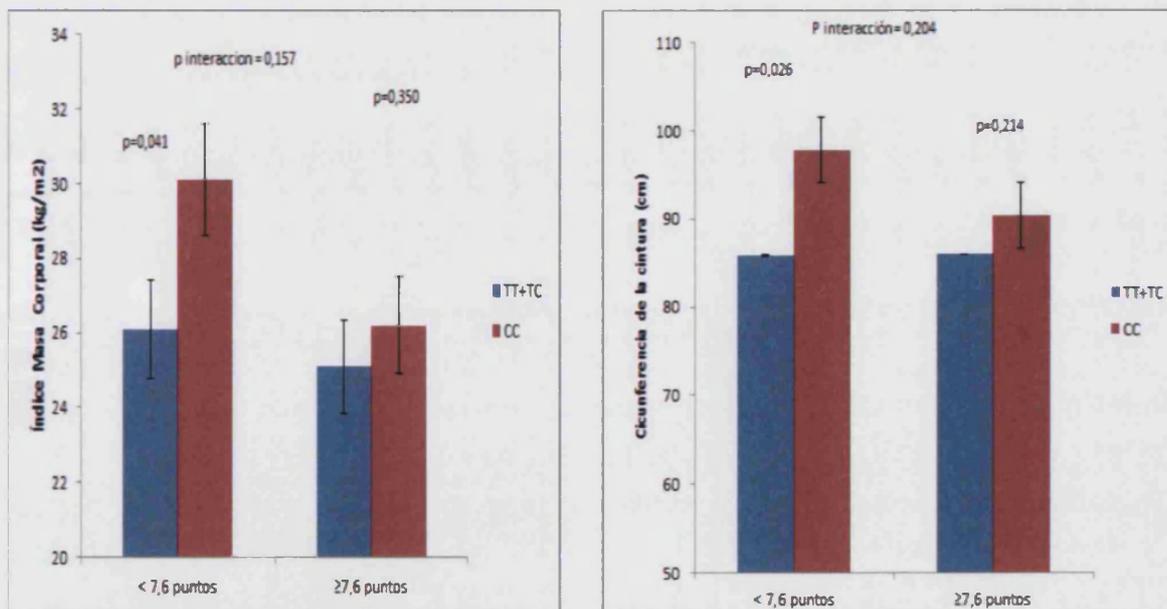


Figura 4.45 Índice de masa Corporal (A) y circunferencia de la cintura (B) según la adherencia a la dieta mediterránea (más de la puntuación media de la muestra estudiada o menos de la media al inicio del estudio) y el polimorfismo rs5082 del gen *APOA2* en el estudio INDIMED. P valor ajustado por edad y sexo. Los valores son representados como media y barras de error para el error estándar.

4.3.7.5 ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES GEN-AMBIENTE EN LOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA CONETRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

4.3.7.5.1 POLIMORFISMO S19W DEL GEN DE LA APOA5

En primer lugar exploramos las posibles modulaciones gen*dieta de este polimorfismo con la intervención para los valores de triglicéridos, dada la extensa bibliografía de este polimorfismo con las concentraciones de triglicéridos. En la tabla 4.129 se muestran los principales cambios en las concentraciones de triglicéridos en función del periodo, grupo de intervención y genotipo. No se observan diferencias significativas

Tabla 4.129 Cambios en la concentración de triglicéridos (mg/dL) tras el periodo de intervención según el polimorfismo S19W en el gen *APOA5* en el estudio INDIMED.

S19W	Control [†]	AOV [†]	FS [†]	DM [†]
SS	-8,3 (-24,6;8,0)	0,9 (-16,4; 18,2)	-6,8 (-23,2;9,5)	2,3 (-10,8;15,4)
SW	14,6 (-109,4; 80,1)	5,8 (-48,7; 60,3)	12,6 (-38,8;64,1)	29,4 (-24,0;82,7)
WW	0,8 (-88,8; 90,4)	33,9 (-62,1;129,9)		
p*	0,948	0,943	0,477	0,267

*p valor de la prueba estadística multivariante para las diferencias de los cambios de concentración de TG (p para los valores transformados logarítmicamente). †Los valores de los cambios en la concentración de TG son expresados como media de la concentración de TG (Intervalo de confianza al 95%).

4.3.7.5.2 POLIMORFISMO rs1260326 (P446L) DEL GEN GCKR

En la tabla 4.130 se muestran los principales cambios en las concentraciones de triglicéridos en función del periodo, grupo de intervención y genotipo. Se observan cambios significativos para el grupo de intervención de dieta mediterránea.

Tabla 4.130 Cambios en la concentración de triglicéridos (mg/dL) tras el periodo de intervención según el polimorfismo rs1260326 (P446L) en el gen *GCKR* en el estudio INDIMED.

rs1260326	Control [†]	AOV [†]	FS [†]	DM [†]
PP	-10,7 (-34,7;13,2)	-2,3 (-30,3;26,4)	-6,9 (-35,5; 21,7)	8,3 (-22,1;38,6)
PL+LL	-2,4 (-22,7;17,9)	4,4 (-16,4; 25,1)	-4,5 (-23,9; 14,9)	4,8 (-10,4; 19,9)
p*	0,188	0,088	0,320	0,022

*p valor de la prueba estadística multivariante para las diferencias de los cambios de concentración de TG (p para los valores transformados logarítmicamente) en función del genotipo y

el grupo de intervención. P valor ajustado por sexo, edad, cambio de IMC.† Los valores de los cambios en la concentración de TG son expresados como media de la concentración de TG (Intervalo de confianza al 95%).

Al considerar la situación basal de adherencia a la dieta mediterránea, se observó como los individuos con el genotipo de riesgo para las concentraciones de triglicéridos (LL) que tenían mayor adherencia a la dieta mediterránea presentaban menores concentraciones de triglicéridos que los individuos LL con menor adherencia (puntos de adherencia a la dieta mediterránea menor a 7,6) (figura 4.46)

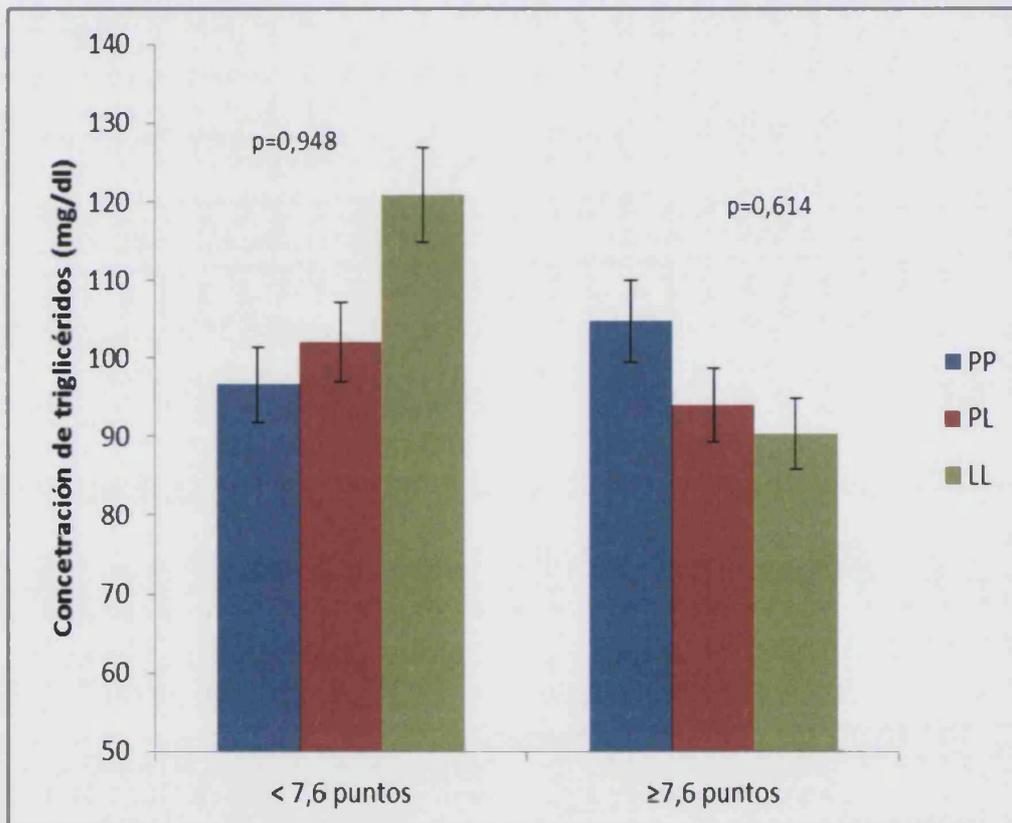


Figura 4.46 Concentración media de triglicéridos según la adherencia a la dieta mediterránea (mas de la puntuación media de la muestra estudiada o menos de la media al inicio del estudio) en el estudio INDIMED. Los valores de p son los obtenidos las diferencias de medias del logaritmo de la concentración de TG ajustados por edad, sexo y IMC basal. Los valores son representados como media y barras de error para el error estandar.

4.3.8 ESTUDIO GENÉTICO DEL SABOR

4.3.8.1 FRECUENCIA GENOTÍPICA

Se estudiaron 3 polimorfismos en el gen del receptor del sabor amargo (*TAS2R38*).

En primer lugar, en la tabla 4.131 se presenta la distribución genotípica de los polimorfismos estudiados en el gen del receptor del sabor amargo *TAS2R38*.

Tabla 4.131 Distribución genotípica de los polimorfismos estudiados en el gen *TAS2R38* en el estudio INDIMED.

Polimorfismo	Genotipo	Total n, (%)	Hombres n, (%)	Mujeres n, (%)	P*	P**
<i>P49A</i>	AA (GG)	52 (43)	21 (42,9)	31 (43,1)	0,595	0,01
	AP (GC)	49 (40,5)	18 (36,7)	31 (43,1)		
	PP (CC)	20 (16,5)	10 (20,4)	10 (13,9)		
<i>A262V</i>	VV (TT)	44 (35,2)	20 (37,7)	24 (33,3)	0,483	0,474
	VA (TC)	57 (45,6)	21 (39,6)	36 (50,0)		
	AA (CC)	24 (19,2)	12 (22,6)	12 (16,7)		
<i>V296I</i>	VV (CC)	23 (19,8)	9 (18,4)	14 (20,9)	0,677	0,298
	VI (CT)	51 (44,0)	20 (40,8)	31 (46,3)		
	II (TT)	42 (36,2)	20 (40,8)	22 (32,8)		

*P valor para las diferencias entre hombres y mujeres. ** P valor del equilibrio Hardy-Weinberg

4.3.8.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POLIMORFISMOS DEL SABOR AMARGO Y PERCEPCIÓN DEL SABOR.

En las tablas 4.132 y 4.133 se presenta la diferencia percepción del sabor amargo mediante el test de sabor a través de los compuestos PTC y PROP en función de la variación genética en tres polimorfismos del gen del receptor del sabor amargo *TAS2R38*.

Hay una asociación clara entre la puntuación a la percepción del sabor amargo tanto para el PTC como para el PROP y el componente genético. Tal y como se describe en la bibliografía, se observan diferencias significativas en el haplotipo PAV (perciben con mayor sensibilidad y de manera significativa el sabor amargo) en comparación con AVI para ambos compuestos. Tras estratificar por sexo y edad se mantuvo la clara significación estadística tanto en hombres y mujeres como individuos de 25-44 años y 45-55 años para el PTC y PROP a las concentraciones de 1,8 mM y 5,6mM ($p < 0,005$).

Tabla 4.132 Puntuación obtenida en el test de sabor amargo con PTC a diferentes concentraciones en función de los tres polimorfismos estudiados en el gen *TAS2R28* en el estudio INDIMED.

PTC ¹	0,056mM	0,18 mM	0,56 mM	1,8 mM	5,6 mM
A49P					
AA	0,5 (0,9)	0,5 (0,7)	0,5 (0,8)	0,2 (0,5)	0,6 (0,9)
AP	0,3 (0,8)	0,5 (0,9)	0,8 (0,8)	1,9 (1,4)	3,1 (1,3)
PP	0,2 (0,5)	0,5 (0,7)	0,9 (1,0)	1,8 (1,3)	2,5 (1,5)
P*	0,155	0,905	0,035	<0,001	<0,001
A262V					
AA	0,2 (0,5)	0,4 (0,7)	0,9 (1,0)	1,7 (1,5)	2,7 (1,5)
AV	0,3 (0,8)	0,5 (0,9)	0,7 (0,8)	1,5 (1,4)	2,6 (1,4)
VV	0,6 (1,0)	0,5 (0,8)	0,4 (0,7)	0,1 (0,4)	0,4 (0,7)
P*	0,048	0,671	0,049	<0,001	<0,001
V296I					
VV	0,4 (0,7)	0,6 (0,7)	0,9 (1,0)	1,6 (1,4)	2,4 (1,6)
VI	0,2 (0,8)	0,5 (0,9)	0,8 (0,9)	1,6 (1,3)	2,8 (1,3)
II	0,7 (1,0)	0,5 (0,8)	0,5 (0,7)	0,1 (0,4)	0,4 (0,7)
P*	0,195	0,762	0,091	<0,001	<0,001

*P valor de tendencia lineal.¹Valores expresados como media (DT)

Tabla 4.133 Puntuación obtenida en el test de sabor amargo con PROP a diferentes concentraciones en función de los tres polimorfismos estudiados en el gen *TAS2R28* en el estudio INDIMED.

PROP ¹	0,056mM	0,18 mM	0,56 mM	1,8 mM	5,6 mM
A49P					
AA	0,6 (0,8)	0,5 (0,7)	0,6 (0,8)	0,5 (0,7)	1,1 (1,4)
AP	0,2 (0,7)	0,3 (0,6)	0,5 (0,7)	1,4 (1,0)	2,8 (1,5)
PP	0,4 (1,1)	0,2 (0,4)	0,8 (1,2)	1,8 (1,3)	3,0 (1,4)
p	0,048	0,671	0,049	<0,001	<0,001
A262V					
AA	0,3 (1,0)	0,2 (0,4)	0,7 (1,1)	1,8 (1,1)	2,8 (1,4)
AV	0,3 (0,8)	0,3 (0,6)	0,5 (0,7)	1,2 (1,1)	2,6 (1,6)
VV	0,8 (0,9)	0,5 (0,8)	0,7 (0,9)	0,5 (0,7)	1,2 (1,3)
p	0,073	0,040	0,935	<0,001	<0,001
V296I					
VV	0,6 (1,2)	0,3 (0,5)	0,8 (1,1)	1,7 (1,2)	2,5 (1,5)
VI	0,2 (0,6)	0,3 (0,6)	0,5 (0,7)	1,2 (1,0)	2,7 (1,6)
II	0,8 (1,0)	0,6 (0,8)	0,7 (0,9)	0,6 (0,8)	1,2 (1,4)
p	0,321	0,119	0,757	<0,001	<0,001

*P valor de tendencia lineal.¹Valores expresados como media (DT)

También estudiamos si había una asociación entre estos polimorfismos genéticos y la percepción del resto de sabores, a pesar de que estos polimorfismos se encuentran en el gen del receptor amargo.

En cuanto al sabor dulce, encontramos diferencias significativas en la puntuación a la sacarosa con una concentración de 100 mM y el polimorfismo A262V (AA: 0,7 ±0,7; AV: 0,8±0,8 vs VV 1,2±0,9, p=0,001).

No se observaron diferencias entre la percepción del sabor umami y el salado y las variaciones genéticas.

Por último, en cuanto al sabor ácido, observamos una asociación significativa entre el polimorfismo P49A y la percepción del sabor ácido con una concentración de 34 mM (PP: 2,8±1,2 vs PA: 2,8±1,2 vs AA 3,5±1,3; p=0,042).

4.3.8.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS POLIMORFISMOS DEL SABOR AMARGO Y EL CONSUMO DE ALIMENTOS.

Tras hacer un análisis exploratorio y posteriormente seguir la metodología seguida por la bibliografía estudiamos si había diferencia entre los individuos con el haplotipo AVI (no perciben el sabor amargo o no catadores) frente al haplotipo PAV (perciben con mayor sensibilidad el sabor amargo o catadores). En cuanto a la prevalencia de estos haplotipos fue de 39,8% para los no catadores (AVI/AVI), 44,9% catadores medios (AVI/PAV) y 15,3% supercatadores (PAV/PAV).

En la figura 4.47 se puede observar que los individuos con el haplotipo AVI tenían un consumo de energía estadísticamente superior que los AVI/PAV o PAV (AVI/AVI: 2407,8±664,0; AVI/PAV: 2193,1±565,5 vs PAV/PAV: 1949,4±556,9 Kcal; p=0,026). El consumo de lípidos también fue significativamente superior en los AVI (p=0,017). Al analizar el tipo de grasas que consumían, se observó que los AVI tenían un consumo superior de los ácidos grasos monoinsaturados (AVI: 42,4±14,5; AVI/PAV: 41,2± 11,8 vs PAV: 32,1± 10,1 g/día; p=0,017)

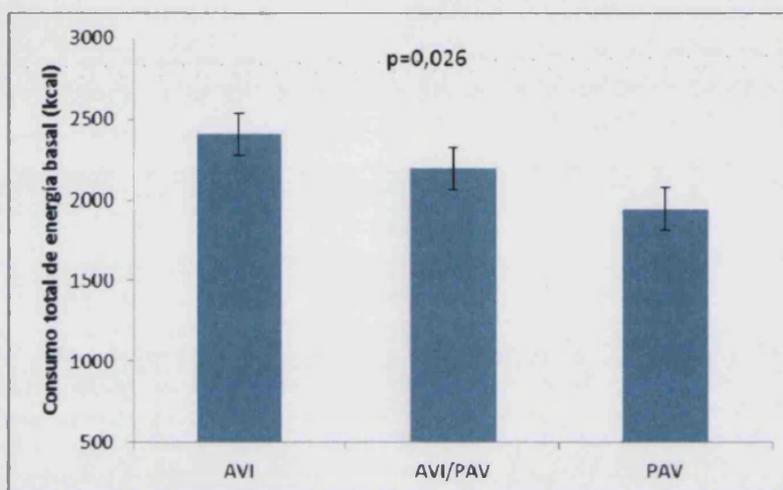


Figura 4.47 Diferencias en el consumo de energía total basal (kcal) en función del haplotipo AVI/PAV en el estudio INDIMED.

En cuanto al consumo de los principales grupos de alimentos en estado basal se observa que sólo hay diferencias significativas para el consumo de cereales ($p=0,042$) (Tabla 4.134)

Tabla 4.134 Consumo de los principales grupos de alimentos (veces/semana) en función del haplotipo AVI/PAV en el estudio INDIMED.

	AVI ¹	AVI/PAV ¹	PAV ¹	P*	P**	p†
Cereales	15,8 (8,0)	12,0(5,0)	13,3 (6,9)	0,042	0,244	0,113
Carne	3,8 (2,2)	3,6 (2,4)	4,4 (2,5)	0,602	0,467	0,585
Embutidos	3,5 (3,1)	3,3 (2,3)	2,8 (1,5)	0,717	0,416	0,864
Pescado	3,5 (1,8)	3,5 (2,3)	3,1 (2,4)	0,835	0,551	0,551
Verduras	22,0 (12,9)	21,7 (14,4)	19,7 (18,8)	0,882	0,622	0,736
Verduras amargas	16,6 (8,0)	16,2 (8,6)	14,5 (9,6)	0,743	0,445	0,769
Frutas	17,8 (10,4)	20,6 (11,3)	21,2 (14,1)	0,492	0,363	0,373
Frutos secos	4,5 (6,4)	3,7 (3,9)	3,1 (7,7)	0,697	0,443	0,451
Grasas	16,6 (7,5)	16,6 (9,6)	14,4 (7,1)	0,699	0,436	0,835
Dulces	7,4 (8,4)	8,8 (7,8)	6,5 (5,3)	0,557	0,697	0,481
Grupo cafes	12,4 (9,7)	14,1 (10,9)	20,5 (14,5)	0,082	0,026	0,023
Total puntos ADM	7,5 (1,8)	7,8 (2,7)	7,0 (2,6)	0,614	0,532	0,662

*P valor de la prueba T-student. **P valor de tendencia lineal. †P valor ajustado por energía total, edad y sexo. ¹Los valores son expresados como medias (desviación estándar). ADM: adherencia a la dieta mediterránea.

4.3.8.4 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN GENÉTICA ENTRE LOS POLIMORFISMOS DEL SABOR AMARGO Y LOS PRINCIPALES CAMBIOS TRAS LA INTERVENCIÓN DIETÉTICA.

En la tabla 4.135 se muestran los cambios en medidas antropométricas tras la intervención en función del haplotipo AVI/PAV. Se observa que los principales cambios de pesos se dan en los individuos con el haplotipo AVI.

Tabla 4.135 Porcentaje de cambio de medidas antropométricas tras la intervención en función del haplotipo AVI/PAV en el estudio INDIMED.

% cambio	AVI ¹	AVI/PAV ¹	PAV ¹	P*	P**	p†
IMC (kg/m²)	1,3 (0,7;1,8)	1,6 (1,0;2,2)	0,3(-0,9;1,4)	0,092	0,075	0,137
Peso (kg)	1,2(0,7;1,8)	1,5(0,9;2,1)	0,06(-0,9;1,0)	0,037	0,033	0,083
% grasa	2,4 (0,1;4,7)	3,7 (2,1;5,5)	2,0 (-1,1;5,0)	0,464	0,672	0,482
Grasa visceral	1,9 (-0,9;4,7)	6,3(3,2;9,5)	4,2(-3,8;12,3)	0,139	0,167	0,092
Cintura (cm)	3,5 (2,4;4,5)	2,4 (0,7; 4)	1,5 (-0,1;3,1)	0,139	0,263	0,558
Cadera (cm)	1,3 (0,7;1,8)	1,7 (0,8; 2,5)	0,6 (-2,1; 3,4)	0,470	0,502	0,568
Puntos ADM	3,4 (2,5; 4,4)	2,2 (1,4;3,1)	2,1 (-0,2;4,5)	0,199	0,152	0,649

*P valor de tendencia lineal ** P valor ajustado por edad, sexo ** P valor ajustado por edad, sexo y grupo de intervención. IMC: Índice de Masa Corporal ADM: adherencia a la dieta mediterránea. ¹Valores expresados como media (Intervalo de confianza al 95%)

4.3.9 ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA Y SUS ASOCIACIONES

En cuanto al estudio de expresión como primera aproximación operativa, en esta tesis se presentan resultados de la expresión de dos genes, concretamente del ADN polimerasa k (*POLK*) y la sirtuina 1 (*SIRT1*) previamente asociados a cambios de expresión en función de la ingesta de algunos componentes, nutrientes o estudios de intervención para evaluar la pérdida de peso o cambios en otras variables bioquímicas relacionadas con fenotipos de interés.

Previamente al estudio de expresión se puso a punto la técnica en el laboratorio ya que era la primera vez que se llevaba a cabo este tipo de estudio en el laboratorio.

En primer lugar, se realizó una prueba para evaluar qué control endógeno era el más idóneo para el estudio de los diferentes genes en función de las características del estudio de intervención llevado a cabo.

A pesar de que dos controles endógenos resultaron satisfactorios para el análisis (*GAPDH* y *18S*), el *GAPDH* fue el que mejor resultó teniendo en cuenta el Ct del mismo y el Ct de los genes de estudio.

4.3.9.1 ADN POLIMERASA K (*POLK*)

En la figura 4.48 se pueden observar los cambios de expresión en términos de cambio expresión en número de veces (fold change) (Control: $-0,33 \pm 0,41$; AOV: $-0,89 \pm 0,21$; FS: $-1,14 \pm 0,34$; DM: $-0,55 \pm 0,22$). Se encontraron diferencias significativas para la comparación entre el control y los FS ($p=0,04$) y una tendencia a la significación en el caso del AOV ($p=0,07$).

Sin embargo, al analizar los cambios entre grupos (basal vs post-intervención), observamos cambios significativos en la expresión del *POLK* para todos los grupos excepto para el control (p AOV= 0,00052, p FS= 0,00237, p DM = 0,01926) (Figura 4.49).

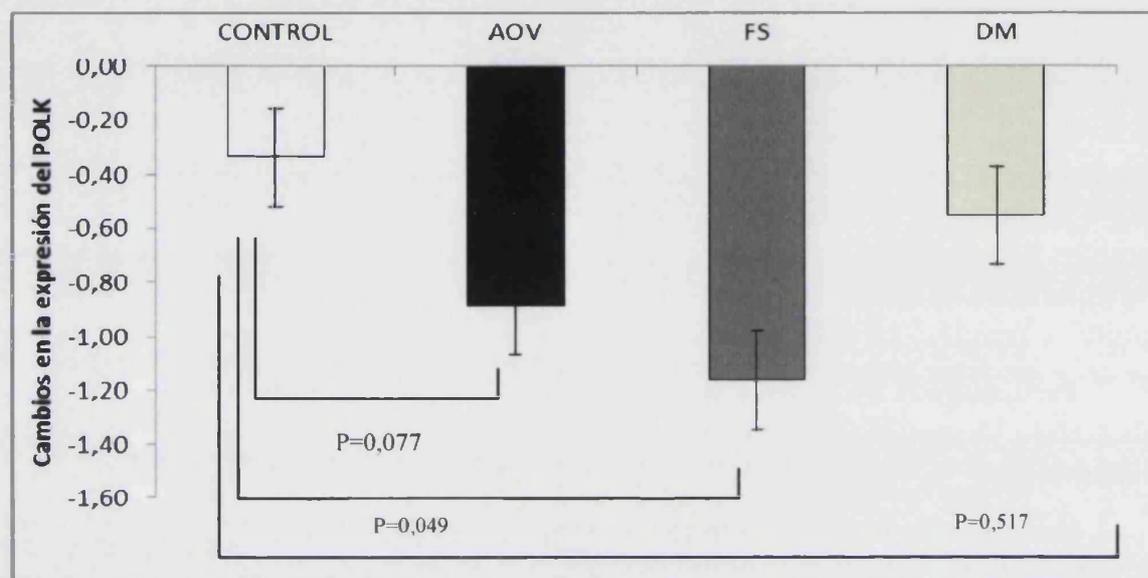


Figura 4.48 Cambio en el número de veces de la expresión de *POLK* según los grupos de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=18), aceite de oliva virgen (AOV, n=18), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=18).

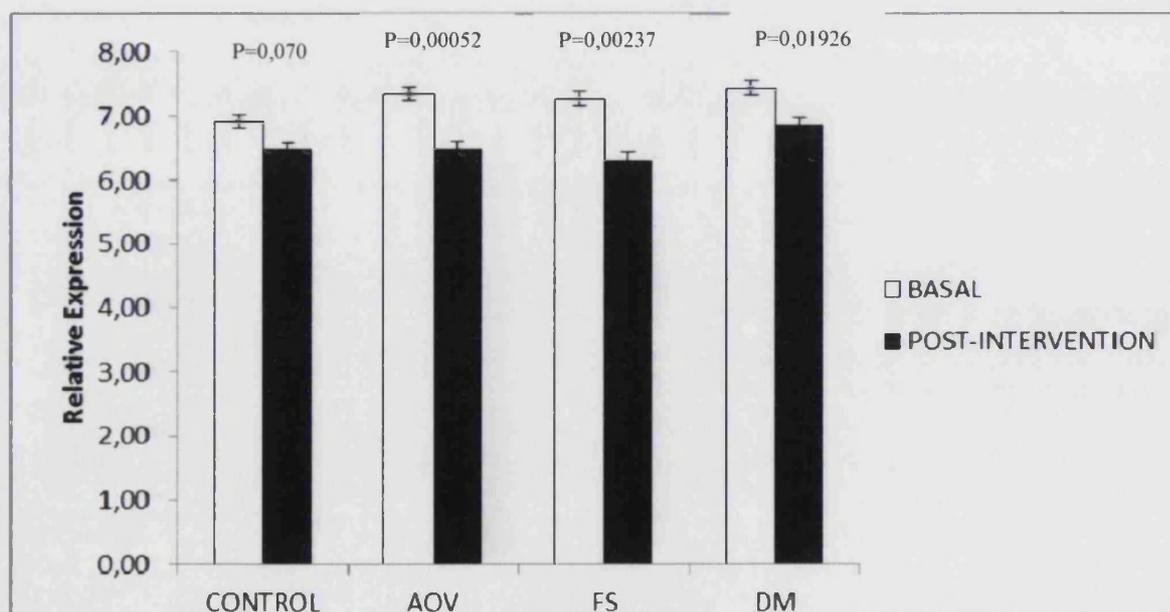


Figura 4.49 Cambios en la expresión relativa de *POLK* desde el estado basal hasta después de los tres meses de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=18), aceite de oliva virgen (AOV, n=18), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=18).

4.3.9.2 SIRTUINA1 (*SIRT1*)

En la figura 4.50 se pueden observar los cambios de expresión en términos de cambio expresión en número de veces (fold change) (Control: $0,11 \pm 0,20$; AOV: $0,35 \pm 0,0$, $p_{c \text{ vs AOV}} = 0,303$; FS: $0,41 \pm 0,21$, $p_{c \text{ vs FS}} = 0,281$; DM: $0,33 \pm 0,08$, $p_{c \text{ vs DM}} = 0,589$).

Posteriormente, al analizar los cambios entre grupos (basal vs post-intervención), observamos cambios significativos en la expresión del *SIRT1* para todos los grupos excepto para el control ($p_{\text{control}} = 0,2706$; $p_{\text{AOV}} = 0,00028$; $p_{\text{FS}} = 0,0228$, $p_{\text{DM}} = 0,02068$) (Figura 4.51).

A pesar de observar un aumento del cambio de expresión en número de veces al comparar el grupo control con los grupos AOV+FS+DM, no observamos diferencias significativas ($p = 0,5942$) (figura 4.52)

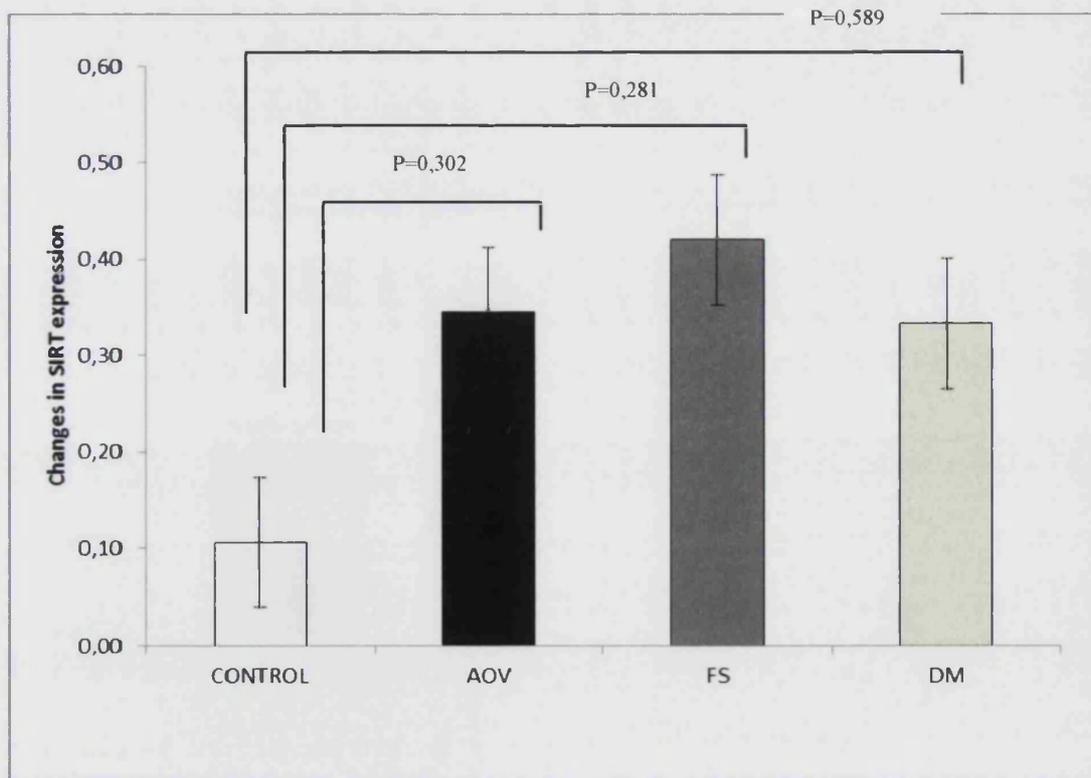


Figura 4.50 Cambio en el número de veces de la expresión de *SIRT1* según los grupos de intervención. . Grupo control (n=16), aceite de oliva virgen (AOV, n=27), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=20).

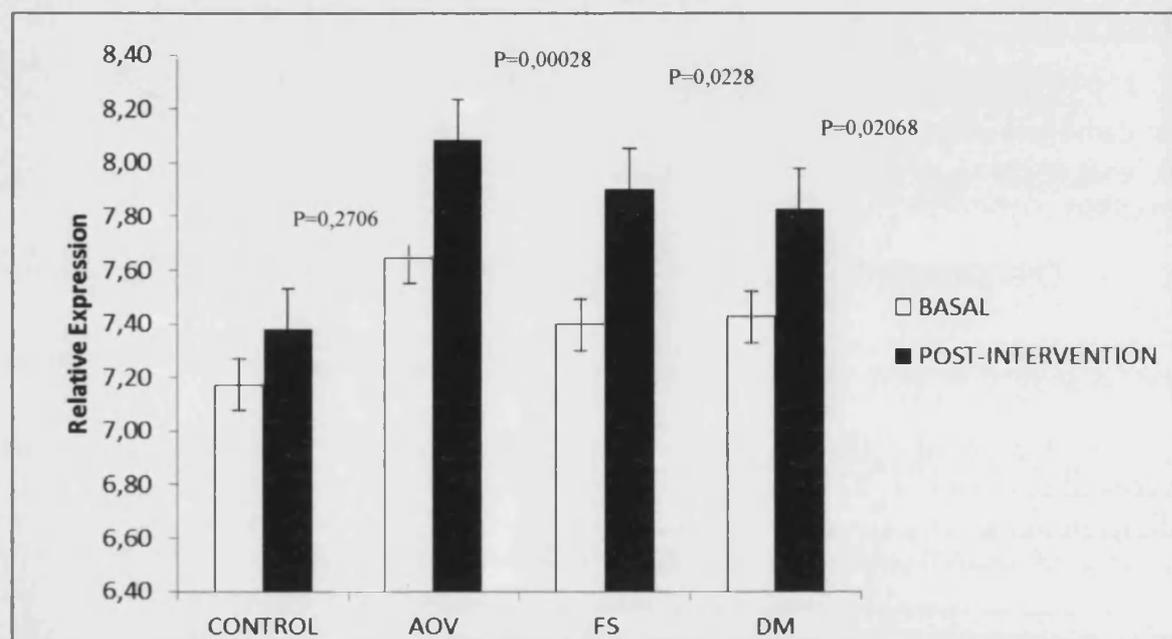


Figura 4.51 Cambios en la expresión relativa de *SIRT1* desde el estado basal hasta después de los tres meses de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=16), aceite de oliva virgen (AOV, n=27), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=20).

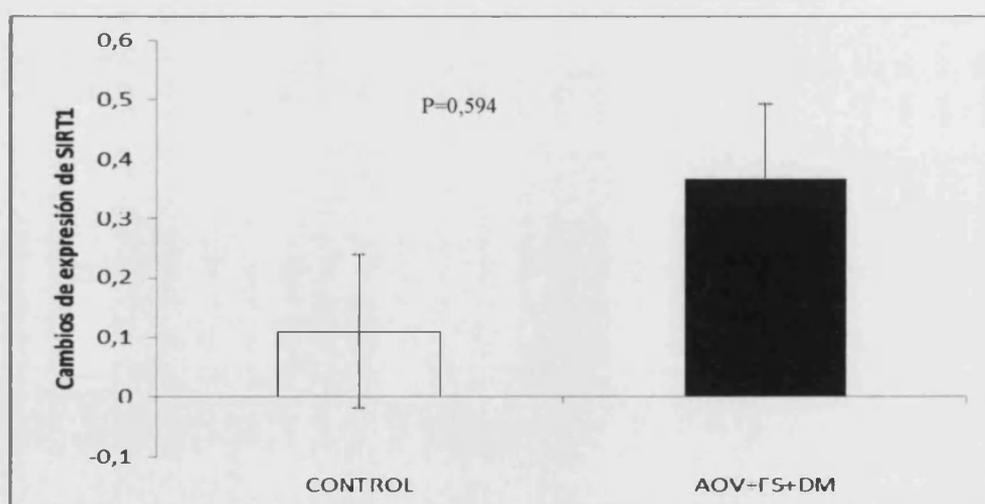


Figura 4.52 Cambio en el número de veces de la expresión de *SIRT1* según los grupos de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=16), aceite de oliva virgen (AOV, n=27)+ Frutos secos (FS, n=14)+Dieta Mediterránea (DM, n=20).

4.4 RESULTADOS DE LAS ESTANCIAS FUERA DE ESPAÑA

A continuación se muestra un resumen de los principales resultados obtenidos en las estancias en el extranjero realizadas durante el periodo de tesis doctoral. Por motivos de confidencialidad no se puede presentar un detalle de los resultados.

4.4.1 ESTANCIA EN UNIVERSITY COLLEGE OF LONDON (UCL), LONDON

Todos los SNPs se hallaron en equilibrio Hardy-Weingberg.

En el análisis de asociación los principales resultados observados tras ajustar por sexo y edad se resumen a continuación:

- rs17275036: Los portadores del alelo menos común presentaron menores concentraciones de HDL, proteína C reactiva (PCR) y mayor IMC ($p=0.044$, $p=0.042$, $p=0.045$ respectivamente) en la población NSPHII.
- rs12724: Los portadores del alelo menos común presentaron mayores niveles del factor de coagulación VIIa en la población NSPHII ($p=0,027$).
- rs836237: Los portadores del alelo menos común presentaron mayores valores de presión arterial sistólica y diastólica en la población NSPHII (0.004, $p=0.013$ respectivamente).
- rs6759377: Los portadores del alelo menos común presentaron menores concentraciones de HDL en la población NSPHII ($p=0,009$) y menores concentraciones de adiponectina en la población UDAC ($p=0,057$). Asimismo estos portadores presentaron mayor riesgo de diabetes tipo 2 en ambas poblaciones.
- rs13411346: se encontró una asociación significativa con el factor de coagulación VIIa en la población NSPHII y con la proteína C reactiva en la población UDAC ($p=0,048$).

En el análisis de haplotipos encontramos una interesante asociación con la tensión sistólica y diastólica tanto en la población Northwick como en caucásicos en UDACs.

4.4.2 ESTANCIA EN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUTE OF METABOLIC SCIENCE, CAMBRIDGE

Los resultados principales de esta estancia se resumen de la siguiente manera: los individuos con una alta adherencia a la DM (11-18 puntos) de acuerdo con la escala de adherencia creada (rMED) mostraron resultados significativos ($p<0,005$) para las menores concentraciones de TG, mayores concentraciones de HDL-C y APOA1 en comparación con los individuos con baja adherencia a la DM. Además, cuando estudiamos el polimorfismo rs780094 en el gen *GCKR* observamos que los individuos portadores de la mutación (alelo A) presentaban

mayores concentraciones de TG, de colesterol total y apoB ($p < 0,05$). Además, al estudiar la modulación genética por la adherencia a la DM se encontraron resultados significativos para distintas variables asociadas con riesgo metabólico.

En la actualidad se está realizando un manuscrito de los resultados de esta estancia y se espera que sean publicados.

4.4.3 ESTANCIA EN HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH, BOSTON.

Los resultados principales de uno de los primeros objetivos centrados en el estudio de la asociación del polimorfismo rs1260326 (Pro446Leu) en el gen *GCKR* y el polimorfismo rs1799884 (-30A>G), situado en la zona promotora del gen *GCK* con las concentraciones de triglicéridos. Interacción gen-adherencia a la dieta mediterránea en el Estudio de las Enfermeras (Nurses' Health Study, Harvard, Boston) se muestran en la tabla 4.136. En general el polimorfismo en el gen *GCKR* se asoció significativamente con las concentraciones de TG al igual que en el estudio PREDIMED.

Tabla 4.136 Asociación entre las concentraciones de triglicéridos y los genotipos para los SNPS rs1260326 (P446L) *GCKR* gen y rs1799884 (-30G>A) en el gen *GCK* en la población del estudio de las Enfermeras (Nurses' Health Study).

P446L (rs1260326) en gen <i>GCKR</i>				
	PP	PL	LL	P*
Crudo	173,8 (162,2;186,2)	186,2 (173,8; 198,1)	213,8 (151,4; 239,9)	0,007
Modelo1	172,2 (158,1;187,5)	187,5 (175; 201,4)	209,4 (184,1; 238,2)	0,040
Modelo 2	173,8 (159,2; 189,7)	187,5 (174,6; 202,4)	209,9 (283,7;239,3)	0,069
rs1799884 (-30G>A) en gen <i>GCK</i>				
	GG+GA	AA		P*
Crudo	186,2 (177,8, 199,5)	177,8 (147,9;199,5)		0,758
Modelo1	185,4 (176,2; 195,4)	173,4 (134,3; 223,9)		0,605
Modelo 2	186,2 (176,6; 196,3)	173,4 (134; 224,4)		0,593

*P valor para las comparaciones entre genotipo y concentraciones de TG. Los valores son presentados como inversos del Log.

Modelo 1: Ajustado por sexo, edad e IMC

Modelo 2: Modelo 1+tabaco e ingesta energética.

En cuanto a los resultados de interacción gen*adherencia no obtuvimos resultados significativos (p interacción= 0,933). La adherencia a la dieta mediterránea fue categorizada en adherencia alta (grupo 4) y adherencia media,

baja (grupo 1, 2, 3). Al estratificar, encontramos resultados similares a los hallados en la población PREDIMED. Las diferencias entre el grupo de baja adherencia para las concentraciones de triglicéridos en estuvieron al borde de la significación ($p=0.056$), mientras que esto no sucedió para el grupo de mayor adherencia.

Por otro lado, al analizar los resultados procedentes del estudio de diversos polimorfismos en el cromosoma 9p21 y su asociación con enfermedad coronaria. Interacción gen-dieta mediterránea en una sub-muestra de diabéticas dentro de la cohorte del "Nurses' Health Study" presentamos en la tabla 4.137 los principales resultados para la interacción gen*dieta mediterránea. De los 11 polimorfismos estudiados solo se presentan los resultados más significativos.

Tabla 4.137 Interacción gen*adherencia a la dieta mediterránea para la enfermedad coronaria. Dos grupos de adherencia a la dieta mediterránea fueron creados.

<i>rs4977574</i>	Q1			Q2+Q3+Q4			P de interacción
	OR	95%CI	p	OR	95%CI	p	
Crudo	1,61	1,17-2,23	0.004	0.8	0.66-1.1	0.2	0.003
<i>Modelo 1</i>	1,51	1,08-2,1	0.016	0.8	0.61-1.1	0.1	0.005
<i>Modelo 2.</i>	1,64	1,15-2,3	0.006	0.8	0.61-1.1	0.1	0.003

Modelo 1: Ajustado por edad, tabaco, historia familiar de infarto de miocárdio

Modelo 2: Modelo 1 +AF (actividad física) y alcohol

DISCUSIÓN

*"La ignorancia afirma o niega rotundamente; la Ciencia duda."
Francois Marie Arouet Voltaire*

En esta tesis se ha llevado a cabo un estudio integrando los factores ambientales clásicos junto con los genéticos para conocer su contribución a la obesidad, concentraciones plasmáticas de triglicéridos y otros parámetros relacionados en población española de edad avanzada de alto riesgo cardiovascular (PREDIMED) y en población general sana (INDIMED). La importancia de las interacciones gen-ambiente en la etiología de la mayoría de las enfermedades han puesto de manifiesto la necesidad de incluir la información genética en los estudios epidemiológicos clásicos para identificar cómo algunos polimorfismos están relacionados con características fenotípicas, teniendo en cuenta los distintos factores ambientales que puedan influir. Además, en la actualidad la relevancia de los factores genéticos y el papel de la nutrición en la modulación en cuanto a la expresión de los genes es un campo con mucho futuro. Por ello, en esta tesis también se ha llevado a cabo un estudio de intervención nutricional en gente sana para aportar mayor evidencia de los beneficios del seguimiento de una DM y el consumo de AOV, y FS pero además, para realizar un primer acercamiento de los cambios en la expresión genética tras una intervención de estas características.

En este capítulo se realiza, en primer lugar la discusión acerca de las variables relacionadas con las características generales y factores ambientales, estilo de vida de la población PREDIMED e INDIMED, posteriormente se trata el consumo de alimentos y su asociación con la obesidad, TG y parámetros relacionados. Seguidamente, se discuten los principales cambios bioquímicos, antropométricos y de dieta del estudio de intervención en el INDIMED. Posteriormente, se realiza la discusión del estudio genético para cada uno de los polimorfismos analizados y las interacciones gen-ambiente obtenidas tanto para el PREDIMED, como para el INDIMED para los polimorfismos de los que se

disponen de datos. Para finalizar, se discutirá el análisis genético y de asociación del sabor y el estudio de expresión en la población INDIMED.

5.1 DISCUSIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES Y LAS VARIABLES RELACIONADAS CON EL ESTILO DE VIDA Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES

5.1.2 ESTUDIO PREDIMED

La población del estudio PREDIMED se caracteriza por presentar un elevado riesgo cardiovascular, puesto que por diseño, se trata de individuos de edad avanzada, bien diabéticos o con tres o más de los siguientes criterios: dislipemia, HTA, sobrepeso, antecedentes familiares de cardiopatía precoz o tabaquismo. Es por todo ello, por lo que en esta población, la prevalencia de diabéticos, obesos, hipercolesterolémicos e hipertensos es elevada con respecto a la población general (Gabriel R et al, 2008; Bertomeu V et al, 2008; Lahoz C et al, 2007). El riesgo de arterosclerosis es mayor en hombres que en mujeres hasta los 60 años, por eso, en los factores de inclusión se consideraron hombres mayores a 55 años y mujeres mayores de 60 años. Sin embargo, con el desarrollo de la menopausia el riesgo en mujeres aumenta también rápidamente (Leuzzi C et al, 2010).

En nuestra población se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres. Cerca de la mitad de la población analizada presentaba obesidad. Las mujeres presentaron mayor IMC y mayor prevalencia de obesidad que los hombres. Según la bibliografía y los datos disponibles, en España, en la población mayor de 65 años y hasta el umbral de los 75 años, la prevalencia de obesidad experimenta un significativo incremento en relación con edades más jóvenes que se estima en un 35% (30,9% en varones y 39,8% en mujeres) siendo mayor en la población no institucionalizada (36%), en la que alcanza al 31,5% de los varones y al 40,8% de las mujeres (Pavón de Paz, I, et al 2006; Barrio E et al, 2006). La prevalencia de la obesidad en las diferentes fases de la edad adulta difiere entre hombres y mujeres y estas diferencias se agudizan con la edad. Mientras que en la adultez temprana los porcentajes de obesidad son semejantes entre ambos sexos, a partir de los 45 años un 16,9% de los hombres españoles presenta obesidad, mientras que en mujeres este porcentaje es superior (26,4%), esta situación se agudiza a partir de los 55 años (Salas-Salvadó J et al, 2007). La repercusión de la obesidad sobre la salud también difiere entre ambos sexos. El hombre tiende a presentar acumulación de grasa abdominal, en especial visceral, lo que incrementa el riesgo de síndrome metabólico. Por el contrario, la mujer presenta una distribución tipo ginoide con predominio de grasa en el tejido subcutáneo, lo que conlleva un menor riesgo para la salud. En nuestra población,

los hombres presentaron mayor circunferencia de la cintura que las mujeres, poniendo de manifiesto tal afirmación.

Las mujeres también presentaron mayores niveles de CT y prevalencia de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, pero también mayor concentración de HDL-C en comparación con los hombres. Como se ha dicho anteriormente, por motivos que todavía no están claros, las mujeres alcanzan rápidamente el mismo nivel de los hombres con respecto a la enfermedad cardíaca durante la menopausia. Como resultado se produce una alteración en el metabolismo lipídico de manera que aproximadamente el 75% de las mujeres mayores de 55 años de edad tienen niveles poco saludables de colesterol en comparación con sólo el 25% de las mujeres más jóvenes. Además, en población española se ha observado que conforme la población envejece, la concentración de CT aumenta sobretodo en las mujeres. La edad, parece invertir las diferencias entre sexos, tanto en los valores medios de CT como en la prevalencia de hipercolesterolemia (Gabriel R et al, 2008). En hombres el CT aumenta hasta los 65 años y luego se estabiliza o incluso disminuye. Los niveles de HDL-C permanecen relativamente estables en los varones y descienden con la edad en las mujeres. No obstante, los niveles son 10 mg/dl superiores en las últimas, incluso después de la menopausia. Por tanto, aunque el HDL-C no aumenta con la edad, fisiológicamente, son las mujeres las que poseen mayores niveles (Gabriel R et al, 2008).

También fueron las mujeres las que mostraron una mayor prevalencia de hipertensión que los hombres, sin embargo no se encontraron diferencias significativas para los valores de PAS y PAD entre sexos. Varios estudios en población española han observado que la prevalencia de HTA y la tensión arterial aumentan con la edad sobretodo en mujeres (Suarez C et al, 1998, Belza MJ et al, 1997) entre otros factores, debido a la rigidez y endurecimiento de las arterias. En el estudio llevado a cabo por Gabriel R et al, (2008), mostraron que mientras en edades mas jóvenes (45-64 años) la prevalencia de hipertensos en hombres y en mujeres es similar, en individuos de más de 65 años, la prevalencia es mayor en mujeres.

La prevalencia de DMT2 fue mayor en hombres que en mujeres. También fue mayor la concentración plasmática de glucosa. Con la edad, la prevalencia de DMT2 aumenta y además también el estudio comentado anteriormente llevado a cabo en población española (Gabriel R et al, 2008) han observado una mayor prevalencia de DMT2 en hombres que en mujeres.

Por otro lado, respecto a los factores ambientales, está ampliamente documentada la influencia que ejerce la actividad física, el tabaco, el nivel de estudios y otros factores sociodemográficos, así como la dieta y el consumo de alcohol en algunos fenotipos intermedios como la obesidad o el perfil lipídico.

En cuanto a la actividad física, la prevalencia de sedentarismo en nuestra población fue de 23% considerando como sedentario el hecho de no cumplir con las recomendaciones de la *American College of Sport Medicine* y la *American Heart Association* para individuos de avanzada edad (Nelson ME et al, 2007). Son varios los estudios que han demostrado los efectos beneficiosos de la actividad física en la edad avanzada. La actividad física mejora la sensación de bienestar general, la salud física y psicológica, ayuda a mantener un estilo de vida independiente y además reduce el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades (alteraciones cardíacas, hipertensión, etc.) y ayuda a controlar enfermedades como obesidad, diabetes, hipercolesterolemia. Ayuda a disminuir las consecuencias de ciertas discapacidades y puede favorecer el tratamiento de algunas patologías que cursan con dolor (Sattelmair JR et al, 2009). El efecto beneficioso de la actividad física también se ha constado en nuestra población ya que los individuos no sedentarios presentaron menor prevalencia de obesidad. La actividad física habitual es un componente importante del gasto energético que ayuda a alcanzar la estabilidad del peso y el porcentaje de grasa en el tiempo. Como se ha comentado la actividad física tiende a disminuir con la edad, pero no se acompaña con una disminución de las calorías por parte de la dieta, lo que hace que se obtenga un balance calórico positivo. Son varios los estudios que han observado estos efectos positivos en la obesidad y en el IMC por la práctica de actividad física en personas de edad avanzada (Bullo M et al, 2011, Molenaar et al, 2009, Sattelmair JR et al, 2009). Por otro lado, múltiples estudios han identificado una relación inversa entre las concentraciones de HDL-C y el riesgo coronario con la práctica de actividad física (Rhoads et al, 1976; Gordon et al, 1977; NECP). Concentraciones superiores a 60 mg/dL ejercen un efecto protector frente a la arteriosclerosis. La actividad física mejora la salud cardiorespiratoria, influencia positivamente los niveles de HDL-C y es asociado con una disminución de la mortalidad y morbimortalidad (Spate-Douglas et al, 1999; Boraita; 2004). En nuestro estudio, a pesar de no observar asociaciones significativas entre sedentarios y no sedentarios con perfil lipídico si que se observó una mejora en las concentraciones HDL-C y en el perfil lipídico en general para aquellos individuos que no eran sedentarios. Se ha observado que es la actividad física moderada, aeróbica y prolongada la que mejora el perfil lipídico (Boraita; 2004). Por tanto, las recomendaciones de actividad física han pasado a ser un elemento muy importante en las políticas de prevención en los adultos, ancianos y niños.

En cuanto al consumo de tabaco, la prevalencia de fumadores en nuestra población fue del 11,9 %, siendo mayor la prevalencia en los hombres que en las mujeres. La bibliografía destaca que el hábito tabáquico es claramente mas frecuente en varones que en mujeres (Gabriel R et al, 2008; fernandez A et al, 2003). Según la Escuela Nacional de salud 2006, la prevalencia de hombres y mujeres fumadoras con edades comprendidas entre 65-74 años es de 20,6% y 4,5% respectivamente (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2006). Estos datos son

similares a los encontrados en nuestra población (26,7% hombres vs 3,6% mujeres). El consumo de tabaco tiene claramente efectos perjudiciales sobre la salud cardiovascular (Basterra-Gortari FJ et al., 2010, Gabriel R et al, 2008). En nuestra población aunque no observamos diferencias significativas entre fumadores y no fumadores y la obesidad y el IMC si que se observó una tendencia a que los fumadores tenían menor IMC. Aunque esta asociación no esta clara se ha propuesto que la nicotina ayuda al gasto energético por su efecto anorexígeno (Basterra-Gortari FJ et al., 2010). El consumo de tabaco también se ha asociado a importantes cambios en los niveles de lipoproteínas y lípidos en plasma y también a alteraciones estructurales de las lipoproteínas que podrían contribuir a la asociación entre el consumo de tabaco y el desarrollo de arterosclerosis y sus complicaciones. Una revisión acerca del efecto sobre las concentraciones séricas de lípidos y lipoproteínas, señalaba que los fumadores presentaban concentraciones séricas de colesterol, triglicéridos, VLDL y HDL-C significativamente más elevadas y concentraciones séricas de HDL-C y apolipoproteínas A-I y AII más bajas que los no fumadores (Thomas 1993). En nuestro estudio, se observaron, también, diferencias significativas entre los fumadores y las mayores concentraciones de TG tras ajustar por factores de confusión. Asimismo, se observó una tendencia a la significación para las menores concentraciones de HDL-C en el caso de los fumadores.

En cuanto al nivel de estudios, en nuestra población observamos que existía una asociación inversa entre el nivel de estudios y el IMC y las concentraciones de TG. También aquellos que cuya situación actual era estar trabajando (en activo) presentaban menores concentraciones de CT. Existe bibliografía que apoya que determinados factores sociales afectan a la obesidad y otros parámetros (Ortiz-Moncada R et al, 2011, Vernay M et al, 2009, León-Muñoz LM et al, 2005). En España, según datos de la Encuesta Nacional de Salud, 2006, gente sin educación o con bajos ingresos tenían un riesgo más elevado de desarrollar obesidad (OR=2,77 (2,34-3,28) y OR=1,50 (1,18-1,91) respectivamente) (Ortiz-Moncada R et al, 2011).

5.1.3 ESTUDIO INDIMED

La población del estudio INDIMED se caracteriza por ser una población adulta sana (25-55 años de edad) a diferencia de la población del estudio PREDIMED. Según las características del diseño del estudio el 15,8% presentó obesidad y el 41,8% sobrepeso. La tendencia actual pone de manifiesto un incremento en las cifras de obesidad en la población adulta. La prevalencia de obesidad en la población española adulta se estima en un promedio de 15,5%. Sin embargo, este porcentaje varía ampliamente en las distintas etapas de la edad adulta, siendo de un 5,9% entre los 25-34 años y va incrementando con la edad

hasta alcanzar un 28,5% entre los 55-64 años, de acuerdo a los resultados del estudio DORICA (Aranceta J et al, 2007).

En cuanto a las características generales, no observamos diferencias entre hombres y mujeres para el IMC (por el diseño del estudio), sin embargo si que observamos diferencias para el porcentaje de grasa. Las mujeres mostraron mayor porcentaje de grasa que los hombres. Sin embargo, los hombres tenían mayor grasa visceral que las mujeres. Es sabido que la masa libre de grasa es mayor en hombres y aumenta progresivamente con la edad hasta los 20 años, disminuyendo posteriormente en el adulto. El contenido de grasa, por el contrario, aumenta con la edad y es mayor en las mujeres. Una vez alcanzada la adolescencia las mujeres adquieren mayor cantidad de grasa corporal que los hombres y esta diferencia se mantiene en el adulto, de forma que la mujer tiene aproximadamente un 20-25% de grasa mientras que en el hombre este componente sólo supone un 15% o incluso menos. Hay también una clara diferencia en la distribución de la grasa. Los hombres tienden a depositarla en las zonas centrales del organismo, en el abdomen y en la espalda, mientras que en las mujeres se encuentra preferentemente en zonas periféricas (en caderas y muslos). Esta diferente distribución permite distinguir dos somatotipos: el androide o en forma de manzana en el caso de los hombres y el ginoide o en forma de pera en las mujeres. Nuestro estudio confirma estos datos fisiológicos.

Las concentraciones de CT, LDL-C, TG, APOB y las enzimas hepáticas (GOT, GPT, GTP) fueron superiores en hombres en comparación con las mujeres. Estos resultados coinciden con lo que hemos comentado para la población PREDIMED en el apartado anterior. En hombres el CT aumenta hasta los 65 años y luego se estabiliza o incluso disminuye, por eso en la población PREDIMED se observaba lo contrario. En cambio, las concentraciones de HDL-C fueron superiores en las mujeres (Gabriel R et al, 2008).

La prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular fue baja para la hipertensión (6,6 %), nula para la diabetes (por diseño del estudio) y más alta para la hipercolesterolemia (22,1 %). La prevalencia de HTA en la población adulta española se estima de 30-35%, siendo mayor en los varones hasta la edad de 40- 45 años, igualándose posteriormente hasta los 50-55 años, momento en el que la prevalencia en la mujer supera a la del varón. En nuestra población la prevalencia es menor, pero también tenemos mayor número de individuos de 25 a 44 años que de 45 a 55 años (Suarez C et al, 2000). Los resultados para la colesterolemia coinciden con la tendencia al alza de la hipercolesterolemia en España que se está documentando actualmente. Son cada vez más los jóvenes, más hombres que mujeres, con el colesterol por encima de los niveles adecuados. Según el documento "Control de la Colesterolemia en España, 2000: Un instrumento para la Prevención Cardiovascular", más de la mitad de las personas entre 35 y 64 años (57,6%) tiene una colesterolemia igual o superior a 200 mg/dl, nivel máximo

consensuado por las sociedades europeas para la prevención de la enfermedad coronaria. Al 16% de población con la misma edad se le diagnostica hipercolesterolemia definida por tener niveles iguales o superiores a 250 mg/dl (para que el diagnóstico sea determinante se mide el nivel de colesterol en dos ocasiones separadas en el tiempo). De hecho la gran mayoría de las personas desconocen que tienen colesterol y se lo detectan en un análisis rutinario.

Respecto a los factores ambientales, más de la mitad de la población estudiada caminaba más de 30 minutos al día, sin embargo el porcentaje disminuye si tenemos en cuenta si practican una actividad física. España figura entre los países con una mayor inactividad física en adultos con respecto al resto de países europeos (OMS, 2004). Los datos de actividad física muestran que sólo cerca del 40 % de la población de más de 16 años realiza una actividad física o deporte, tanto a nivel nacional como en la Comunidad Valenciana (Regidor E y Gutierrez-Fisac JL, 2005; Vioque J y Quiles J, 2003). En nuestro estudio las prevalencias de inactividad son menores. También es cierto que las diferencias metodológicas en la estimación del ejercicio físico, no permiten que podamos comparar adecuadamente los resultados con estas poblaciones. Pero también hay que considerar uno de los sesgos de los estudios de intervención y es que a veces suelen ser las personas que tienen unos estilos de vida más saludables los más predispuestos a participar. Otros factores también están promoviendo la inactividad que se está registrando en la actualidad, tal es el caso de que por ejemplo la actividad física ocupacional se ha visto considerablemente reducida debido al incremento de puestos de trabajo en el sector servicios con respecto al industrial, lo que ha llevado a aumentar el número de horas que pasamos sentados en el trabajo. También el trabajo doméstico se ha visto beneficiado por el desarrollo de nuevas tecnologías, que han conducido a la reducción de la energía calórica requerida para estas tareas cotidianas (James WP, 2008) y ha promovido la obesidad. En nuestro estudio, a pesar de no encontrar diferencias significativas entre sedentarios y no sedentarios para la obesidad e IMC si que observamos una tendencia y mejores valores para los individuos que no eran sedentarios. Observamos diferencias significativas para las concentraciones de TG, siendo los no sedentarios los que menores concentraciones registraron. El efecto beneficioso de la actividad física en el perfil lipídico ha sido ampliamente documentado (Sattelmair JR et al, 2009, Elosua R et al 2000, Swain DP et al, 2006; Berg A et al, 1997).

En cuanto al tabaco, el 20 % de la población fumaba sin diferencias entre hombres y mujeres. Aunque España sigue siendo uno de los países de la Unión Europea que presenta una mayor prevalencia de consumo, tanto en hombres como en mujeres, existen indicios, por datos preliminares de la ENS 2005 y estudios a nivel autonómico, que muestran claramente una tendencia descendente del tabaquismo en España y que situaría la prevalencia global de fumadores diarios en nuestro país en la franja alrededor del 25% (Ministerio de Sanidad, Política Social e

Igualdad) (Alonso de la Iglesia B et al, 2006). Esta prevalencia es similar a la de nuestro estudio. A pesar de los efectos perjudiciales del consumo de tabaco sobre los factores cardiovasculares, en nuestra población no obtuvimos datos significativos probablemente por falta de poder estadístico.

En cuanto al nivel de estudios, en nuestra población, los participantes que menores estudios registraban (estudios primarios) tenían mayor IMC, peso, % de grasa, circunferencia de la cintura, concentraciones de TG, CT, LDL-C y APOB en comparación con los que tenían diplomatura o licenciatura. Diversos estudios han puesto de manifiesto esta asociación observando que los sujetos con menor nivel socio-cultural presentaban diversos factores de riesgo cardiovascular (Aranceta J et al, 2001, Gutierrez-Fisac JL et al, 2005).

Por último, respecto a la situación laboral, los individuos en paro presentaron mayor peso, porcentaje tanto de grasa como de grasa visceral, CT y LDL-C. La inactividad laboral puede estar asociada a conductas más sedentarias y hábitos dietéticos no saludables (picar entre horas, consumo de alimentos ricos en calorías), hecho que podría estar relacionado con los resultados hallados.

5.2 DISCUSIÓN DEL CONSUMO DE ALIMENTOS Y SU ASOCIACIÓN CON LA OBESIDAD, TRIGLICÉRIDOS Y PARÁMETROS RELACIONADOS

5.2.1 ESTUDIO PREDIMED

Los hábitos dietéticos ejercen una gran influencia en el desarrollo de ECV (Van Dam RM et al, 2005). La preocupación global por el incremento de las enfermedades crónicas relacionadas con la dieta tales como la obesidad, la diabetes y ECV, ha motivado que se preste una mayor atención al consumo de alimentos de la población para conocer y poder modificar los patrones alterados de consumo. En los países mediterráneos el consumo de alimentos característicos de la DM y altos en AGMI ha disminuido en las últimas décadas para aumentar el consumo de AGS y azúcares (Schmidhuber J y Traill WB, 2006). En nuestra población el consumo de energía total fue de 2254 kcal/día. En cuanto al porcentaje de grasa de la dieta fue bastante elevado (39%), con especial relevancia a los AGMI. No es de extrañar la obtención de estos valores, ya que se trata de una población mediterránea de edad avanzada donde siguen conservándose la cultura tradicional mediterránea. Los efectos de la transición nutricional son más destacados en generaciones más jóvenes que se ven más influenciadas por otras tendencias alimentarias. Sin embargo, el consumo de carne roja en esta población mediterránea es elevado, alcanzando una media de una vez al día (Sotos-Prieto et al, 2011). Dentro de esta

clasificación, el consumo de jamón es de dos veces a la semana, cuya fuente de ácidos grasos difiere del resto de embutidos. Sin embargo, el consumo total de este tipo de carne resulta elevado en comparación con las recomendaciones alimentarias (SENC, 2004). Esto podría estar influenciado por las recomendaciones clásicas de consumir ternera a la plancha en múltiples dietas para perder peso y por la cultura tradicional de realizar platos cocinados, sopas, potajes, etc... con elevado contenido en carne y embutidos. Además, en nuestra población observamos diferencias de consumo entre hombres y mujeres. Mientras que las mujeres mostraron un mayor consumo de lácteos desnatados en general (lecha desnatada, yogur desnatado, queso fresco), verduras y frutas (kiwi) y carne blanca, los hombres consumieron más pan blanco, carne (cerdo, cordero, jamón serrano) fiambres y embutidos (chorizo, salchicha y tocino), frutos secos. Los estudios que analizan e identifican patrones dietéticos mediante análisis de cluster coinciden en que las mujeres presentan mayor puntuación para “patrones dietéticos sanos” o “dietas prudentes” en comparación con los hombres (Bamia C et al 2005; Robinson S et al, 2009). Según la encuesta Nacional de Salud de la Comunidad Valenciana, también hay un mayor porcentaje de hombres (23,8 %) que consumen de 1-2 veces al día embutidos mientras que lo hace el 18,3% de las mujeres. Por otro lado, en general, se observa un consumo total de pescado elevado, aproximadamente 4 veces semanales, característico de la DM donde se recomienda un consumo de 3 o más veces a la semana. El consumo medio de pescado reportado en el estudio epidemiológico MEDIS llevado a cabo en población mediterránea fue inferior (1.9 ± 1.2 v/sem), sin embargo consideraron el consumo medio de pescado por un periodo de 30 años (Panagiotakos DB et al, 2007 C). Si comparamos el consumo de pescado en población mediterránea con otras cohortes europeas dentro del Estudio EPIC llevado a cabo en hombres y mujeres desde 35-74 años de edad, el consumo de pescado en Reino Unido es uno de los más bajos (media de 10 g/día en mujeres y 14 g/día en hombres) en comparación con España donde el consumo medio de pescado fue más elevado (22,3 g/día en mujeres y 42.6 g/día en hombres) (Welch AA, et al 2002). En nuestro estudio el consumo de pescado en hombres y mujeres fue superior (68,4 g/día y 67,6 g/día respectivamente). Como podemos observar, las comparaciones se hacen difíciles por la distinta manera de expresar los resultados y los diferentes grupos de edad comparados.

Al analizar el consumo de alimentos por edad, observamos que los individuos con una edad inferior a 67 años tenían un mayor consumo de ternera, cordero, cerdo y huevos. Mientras que los mayores de 67 años tenían un consumo superior de leche entera y galletas. Esto podría estar relacionado a algunos de los procesos fisiológicos que se sufren con el envejecimiento como son la dificultad masticatoria, la pérdida de dientes y la disminución de la secreción de la saliva lo que dificulta el consumo y digestión de estos alimentos cárnicos. Por otro lado, y por la misma razón puede ser que la población más mayor cambie sus hábitos de desayunos para mojar en la leche alimentos (como las galletas) de más fácil

masticación. Además, citar que la población mas anciana pierde el sentido del gusto (ver apartado del sabor) por lo que necesitan mayor estímulo para percibir los sabores de los alimentos. Esto también podría explicar el porqué de un mayor consumo de leche entera (más grasa, más palatabilidad) en los más ancianos.

En cuanto a la asociación del consumo de alimentos con la obesidad y parámetros relacionados, observamos que los no obesos tenían un consumo más elevado de verdura, FS, y chocolate. Esto podría estar influenciado por las recomendaciones dietéticas, ya que se han transmitido mitos acerca del consumo de FS y la obesidad. Hecho que puede hacer que los obesos no consuman, al igual que pasaría con el chocolate. De todos modos, al tratarse de un estudio transversal, hay que considerar las limitaciones que presentan estos estudios y tener en cuenta el posible efecto de la causación reversa. Además, el consumo de embutidos en particular se asoció con mayor riesgo de obesidad y tanto el consumo de carne roja como de embutidos con un mayor peso. Diferentes estudios coinciden que patrones dietéticos caracterizados por un consumo elevado de carne roja y carne procesada están asociadas con un incremento de en los índices de obesidad (Sherafat-Kazemzadeh R et al, 2010) y obesidad central (Panagiotakos DB et al, 2007 D; Barbieri P et al, 2009). También el consumo de verduras y hortalizas y lácteos se correlacionaron negativamente con las concentraciones de TG. El consumo de FS, legumbres y vino tinto también se correlacionó negativamente con el IMC. El efecto beneficioso del consumo de verduras y frutas sobre la salud cardiovascular y el perfil lipídico está ampliamente documentado (Bendinelli B et al 2011; Varela-Moreiras G et al, 2010; Alvarez-Parrilla E et al, 2010). De igual modo, existen varios estudios que explican la relación inversa entre el consumo de FS y el IMC (Martinez-Gonzalez MA y Bes-Ballostro M, 2011; Bes-Rastrollo M et al, 2009, Garcia-Lorda P et al, 2003; Schroder H et al, 2004). El consumo de legumbres, por las propiedades nutricionales que contiene (alto contenido en fibra y por tanto efecto saciante, bajo índice glucémico) también podría estar asociado con menor IMC y mejor perfil lipídico (Hermsdorff HH et al, 2011), sin embargo a lo largo del tiempo se le han atribuido otras propiedades y han sido objeto de ser alimentos excluidos en dietas de adelgazamiento (quizá porque a veces se ha asociado mas con la carne y embutidos con los que tradicionalmente se cocinaban los platos).

La dieta también juega un papel importante en el perfil lipídico. La reducción del consumo de grasa saturada es el punto clave en las medidas encaminadas a la prevención de las enfermedades cardiovasculares, en concentro con la disminución de las concentraciones LDL-C. Se ha observado, también, que la sustitución de la grasa saturada por grasa monoinsaturada, aportada por grasa monoinsaturada, es más favorable que el reemplazamiento de la grasa saturada por hidratos de carbono. En estos casos se consigue una reducción de las concentraciones de HDL-C, pero el consumo de hidratos de carbono, en un porcentaje superior al 60% de la energía, produce un aumento de los triglicéridos y

una disminución de las concentraciones de concentraciones HDL-C (van Meijl et al, 2008, Sola; 2001; Soriguer et al, 1991).

Con respecto al consumo de alcohol, se ha observado que el consumo superior a 30 g de alcohol diarios de forma regular aumenta las concentraciones de TG mientras que mejora las concentraciones de HDL-C (Rimm et al, 1999) y el riesgo cardiovascular. Un reciente estudio llevado a cabo en población japonesa (27,000 hombres y 16,805 mujeres) estudiaron la relación entre el consumo habitual de alcohol y las concentraciones de no-HDL. Las concentraciones de no-HDL se definen como el colesterol total menos el HDL-C, que contiene partículas aterogénicas, apolipoproteína B, VLDL, IDL, LDL y lipoproteína (a). Finalmente concluyeron que los bebedores de mas de 10 mg y menos de 20 mg de alcohol al día presentaron significativamente menores concentraciones de no-HDL siendo este efecto mas pronunciado en mujeres que en hombres (Wakabayashi y Groschner 2009). En nuestra población, observamos una correlación positiva entre el consumo de vino tinto y las concentraciones de HDL-C tanto en hombres como en mujeres.

En cuanto a la adherencia a la DM, nuestra población, mostró una adherencia bastante alta en el estado basal, lo que concuerda al tratarse de una población mediterránea donde todavía se conservan las costumbres. La adherencia a la DM ha sido correlacionada positivamente con fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular (mejor índice glicémico, perfil lipídico, menor riesgo de obesidad y presión arterial en general) (Tzima N et al, 2007, Schröder H et al, 2003). En nuestra población observamos una relación entre la mayor adherencia a la DM y menor prevalencia de obesidad. Los participantes en el cuartil más alto de DM presentaban menor prevalencia de obesidad y también IMC. Varios estudios han mostrado resultados similares a los encontrados en nuestra población. Así, en el estudio ATTICA llevado a cabo por Panagiotakos et al, (2006) los individuos con alta adherencia a la DM presentaron 52% menos de probabilidad de tener sobrepeso u obesidad. Otros estudios encontraron que individuos con alta adherencia presentaban un 39 % menos de probabilidad de ser obesos (Schroder H et al 2004) y en otros estudios un 12 % menos (Panagiotakos DB, 2007 A). En España un estudio de cohorte también ha encontrado una asociación positiva del efecto de la DM con la incidencia de obesidad (Mendez MA et al, 2006)

5.2.2 ESTUDIO INDIMED

Durante los últimos 30 a 40 años, la dieta en España se ha alejado del patrón mediterráneo considerado saludable. Según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), durante los años 1964-1965 se seguía un patrón muy próximo al de la DM. Durante el 1990-1991 ya es manifiesto, sin embargo, el aumento del porcentaje de energía aportado por las grasas (del 32% al 42%). Este crecimiento va en detrimento de los hidratos de carbono, los cuales han pasado de proporcionar

del 53% de las calorías totales al 42%. En la población del INDIMED el consumo de energía fue 2294 kcal donde la grasa aportó el 36% y los hidratos de carbono 47,7% similar a los valores registrados.

Al analizar el consumo de alimentos en esta población observamos que existen diferencias por sexo con un mayor consumo de verduras, fruta (kiwi y pera) y grasas en las mujeres que en los hombres. En los hombres se halló un mayor consumo de pan, carne, embutidos y frutos secos que en mujeres. Estos alimentos están relacionados con almuerzos y aperitivos y de ahí que puedan ser comidas más frecuentes en población masculina debido a la cultura tradicional en nuestro país. Además, como puede observarse, estas diferencias de consumo en la población masculina se replica tanto en el estudio PREDIMED (de mayor edad) como en el INDIMED (población más joven), poniendo de manifiesto el arraigo de algunas costumbres. Como se ha mencionado anteriormente, también existen estudios que demuestran que las mujeres, en general, cuidan más su alimentación eligiendo opciones más saludables en cuanto a los alimentos que consumen.

Al estudiar las diferencias de consumo por edad observamos que la bollería y los dulces tienden a aumentar con la edad. Esto podría correlacionarse con el hecho de que las preferencias alimentarias o el sentido del gusto cambian con la edad. Algunos estudios han puesto de manifiesto que con la edad, el consumo de alimentos dulces y más ricos en grasa aumentan (más palatables).

Al igual que en el estudio PREDIMED al estudiar las diferencias de consumo entre obesos y no obesos, observamos que los no obesos consumían más fruta y también más FS. Las razones, van en consonancia con lo que se ha explicado en el apartado anterior. Igualmente, el consumo de FS se correlacionó negativamente con el IMC, el porcentaje de grasa y la cadera y el consumo de frutas, además de con las variables anteriores con la grasa visceral, cintura y peso. Ya se ha comentado la bibliografía que apoya tales resultados. El consumo de cerveza se correlacionó negativamente con el peso y el porcentaje de grasa, también el consumo de vino para este último parámetro. El consumo de whisky también se correlacionó negativamente con el IMC, peso, grasa visceral y circunferencia de la cintura. El estudio de cohorte SUN ha publicado recientemente que no había asociación entre el consumo de vino y la ganancia de peso al año, en cambio, el consumo de cerveza (más de 7 veces por semana) estuvo asociado con una ganancia de peso de 119 g/año (Sayon-Orea C et al, 2011). No obstante, existen numerosas evidencias científicas que desligan el consumo moderado de cerveza de la obesidad (Koppes LL et al, 2005; Veses Alcobendas AM, Marcos A, 2010; Kondo K, 2004). En esta línea, la investigación acerca de la asociación entre el consumo moderado de cerveza tradicional y sin alcohol y la composición corporal refleja que un consumo moderado de cerveza no provoca aumento del peso, ni modificaciones en la composición corporal. Sin embargo, la relación entre

el consumo de alcohol y el riesgo de obesidad no está clara (Lukasiewicz E et al, 2005).

En cuanto al consumo de alimentos y su asociación con los parámetros lipídicos observamos que el consumo de verduras se asoció negativamente con las concentraciones de LDL-C, la fruta con las concentraciones de TG y el consumo de cerveza positivamente con las concentraciones de TG pero también de HDL-C y APOB. El beneficio del consumo de frutas y verduras ya se ha comentado anteriormente. Respecto al consumo de cerveza el consumo moderado de alcohol, y de cerveza ha sido relacionado con cambios positivos en el HDL-C en hombres y mujeres (Koppes LL et al, 2005, Kondo K, 2005) y otros parámetros lipídicos. Si bien hay artículos que no han encontrado modificación en las concentraciones de TG (Koppes LL et al, 2005). A veces, se ha asociado el consumo de cerveza con “tapas” y otros alimentos, en ocasiones ricos en grasas y calorías que podrían enmascarar la verdadera relación entre el consumo de cerveza y alcohol en general con algunas variables.

Por otro lado, la adherencia a la DM en esta población también fue elevada (7,6 puntos). No observamos diferencias significativas entre la mayor adherencia y la prevalencia de obesidad. No obstante, el análisis de la adherencia a la DM en la población INDIMED, se analiza con más profundidad en el apartado 5.3.

Para esta población también analizamos los hábitos dietéticos. Los hábitos dietéticos son importantes para conocer más en detalle los motivos por los cuales la prevalencia de la obesidad está aumentando. El conocimiento de las tendencias en alimentación también nos permite abordar mejor no solo el control de peso sino la educación nutricional en general. El significado que hemos asignado a la comida ha cambiado de manera radical con el tiempo y ha ido adaptándose continuamente a nuevos modelos sociales y culturales. El progreso tecnológico e industrial y los modernos estilos de vida han alterado sustancialmente nuestros ritmos y hábitos dietéticos. Entre los factores que han influido en el cambio del patrón de alimentación cabe señalar las comidas fuera de casa. En nuestra población podemos observar cómo el consumo de pizza es más elevado en la población de 25 a 44 años, poniendo de manifiesto la tendencia al alta de estos hábitos.

Cuando se preguntó en el cuestionario general si respetaban todas las comidas el 21 % de la población no desayunaba. Esto se asocia también a la escasa disponibilidad de tiempo tanto para dedicarle a comer como a la preparación de las mismas.

Por último una última reflexión acerca de los factores que pueden estar influenciando el consumo de alimentos y la obesidad es el estrés. En España, a pesar de la cultura mediterránea y del clima soleado, se están alcanzando grados de estrés comparables a sociedades nórdicas. Esta situación se relaciona con un aumento de obesidad, en especial de obesidad abdominal, con alteraciones en el

metabolismo del cortisol y cambios de ingesta alimentaria. Destacar que nuestra población, el estrés que produce el trabajo medido en una escala del 1 al 5, fue de 3 puntos y de 2,5 puntos el estrés que produce la vida.

5.3 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN INDIMED

En este trabajo se han presentado resultados de los cambios obtenidos en el estudio de intervención nutricional con dieta mediterránea (grupo control, de AOV, FS, y DM (AOV+FS)). Los estudios de intervención, clínicos, aleatorizados son los estudios que proporcionan mayor evidencia científica en cuanto a los cambios observados. Por eso, a pesar de las dificultades que presentan estos estudios son unos de los más demandados por la comunidad científica.

Tras las 10 semanas de intervención, se ha constatado la buena adherencia y cumplimiento de las instrucciones dietéticas y la educación nutricional de cada uno de los grupos mediante la puntuación al cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos, lo que concuerda con los cambios bioquímicos observados. A pesar de que se produjo un incremento significativo en la puntuación media en todos los grupos, excepto el control, este incremento fue más destacado en el grupo de DM, lo que pone de manifiesto que los participantes no sólo han incorporado el AOV y los FS como parte de la intervención sino que se han adherido al resto de los ítems de la dieta mediterránea como parte del entrenamiento e instrucción previo a la intervención. Además, el cumplimiento en el grupo de AOV y DM también se corrobora con el hecho de que la energía procedente del AOV fue estadísticamente más alta tras las 10 semanas que al inicio del estudio sólo en estos dos grupos (AOV y DM). De igual modo, la energía procedente de los FS también fue significativamente superior en el grupo de FS y el de DM. Son varias las investigaciones que han destacado que el aumento en la puntuación a la adherencia a la DM tiene una relevancia clínica importante (Sofi F et al, 2011, Sofi F et al, 2008, Trichopoulou A et al, 2003). Así, recientemente, Sofi et al, (Sofi F et al, 2008) han constatado que el incremento en 2 unidades en la adherencia a la DM reduce en un 9% la mortalidad debida a ECV. En nuestro estudio, el grupo de AOV aumentó en 1,8 puntos, el de FS en 2,4 puntos y 5,6 en el de DM.

En cuanto a las variables que pueden contribuir a una mayor adherencia a la DM observamos que los individuos con sobrepeso consiguieron una mejora en la puntuación a la DM en el grupo de DM. Observamos también que entre los individuos que tuvieron cambios en más de 4 puntos había diferencias entre los fumadores y no fumadores, siendo mayor el porcentaje de no fumadores los que consiguieron cambios en más de cuatro puntos. Recientemente, el grupo PREDIMED ha publicado un artículo donde se evalúan los predictores a la DM en el estudio citado (Zazpe I et al, 2010). Aunque no encontraron asociación con las

variables que nosotros obtuvimos, el estar casado y algunos hábitos dietéticos en estado basal contribuyeron a predecir la probabilidad de alcanzar los objetivos de la intervención y así la adherencia a la DM. Tenemos que tener en cuenta que existen grandes diferencias entre nuestro estudio y el del PREDIMED en cuanto a las características de la población estudiada ya que se trata de individuos de edad avanzada (>55 años), con alta proporción de participantes casados, viudos, jubilados, etc. además de que el número de participantes es mayor.

Por otro lado, existen grandes evidencias sobre los beneficios de la DM en la salud cardiovascular y en la mortalidad y mayor longevidad en general (Keys et al, 1986, Trichopoulou et al, 2003). En nuestro estudio hemos evaluado si la intervención con AOV, FS, DM podría ayudar a mejorar características bioquímicas y antropométricas en población joven sana. En cuanto a las variables antropométricas, se observaron cambios significativos en el peso, IMC, cintura, cadera para todos los grupos de intervención (y no en el control) tras ajustar por edad, sexo y cambio de IMC (en el resto de variables diferentes al IMC). También se observaron cambios en el porcentaje de grasa para el grupo de AOV y FS.

En la actualidad existen grandes controversias acerca de cual es la mejor dieta para la pérdida de peso (dietas bajas en carbohidratos, altas en proteínas, bajas en grasas, etc.). Los frutos secos, y las dietas altas en grasas (AGMI), características de la DM, han sido asociados tradicionalmente a un aumento de peso corporal por el gran contenido graso que contienen. No obstante, las investigaciones realizadas recientemente no sólo no corroboran estos datos sino que demuestran lo contrario. Resultados de estudios epidemiológicos en grandes poblaciones ponen de manifiesto que aquellos individuos que consumen habitualmente FS presentan un menor IMC que los que no consumen (Bes-Rastrollo M et al, 2009, Garcia-Lorda P et al, 2003; Schroder H et al, 2004). Además, en la cohorte SUN (Seguimiento de Universidad de Navarra) al evaluar 11,895 participantes observaron una asociación inversa entre el consumo de FS y la ganancia de peso al año (Martinez-Gonzalez MA y Bes-Ballostro M, 2011). De igual modo un estudio reciente llevado a cabo en el proyecto EPIC-PANACEA puso de manifiesto que aquellos individuos con alta adherencia a la DM de acuerdo con la puntuación obtenida en un cuestionario de adherencia a la DM (11-18 puntos) mostraban en 5 años un cambio de peso de 20,16 kg (IC 95%:20,2-20,7 kg) y tenían un 10% menos de probabilidades de desarrollar sobrepeso y obesidad que aquellos individuos con una adherencia menor (0-6 puntos) (Romaguera D et al, 2010). También se han observado efectos positivos en la adiposidad abdominal con la mayor adherencia a la DM. Así un estudio que evaluó a 497,308 individuos con una edad comprendida entre 25-70 años de 10 países europeos observaron que la alta adherencia a la dieta mediterránea está asociada con menor adiposidad abdominal utilizando como medida la circunferencia de la cintura (Romaguera D et al, 2009)

En cuanto a los estudios de intervención dietética, en concordancia con nuestros resultados, también han demostrado que los individuos que incorporan diariamente FS en su alimentación diaria podrían ayudar a la no ganancia de peso (Li Z et al, 2010). Un estudio que evaluaba la ingesta de almendras (42-72 g diarias) en 81 individuos, durante 6 meses observaron que no existía una ganancia de peso significativa (Sabate J et al, 2002). De igual modo, García-Londa et al, (2003) comprobaron que, a corto plazo, la incorporación de FS a la dieta, en cantidades de hasta 50 g diarios no incrementa el peso. En el estudio PREDIMED, tras un año de intervención se observaron también efectos beneficiosos en la circunferencia de la cintura (Martinez-Gonzalez MA y Bes-Ballostro M, 2011).

Algunos de los mecanismos propuestos que podrían explicar estos hechos podrían ser que la absorción de los frutos secos podría ser incompleta, de manera que parte de su contenido graso podría no ser absorbido por el cuerpo humano y sería excretado por las heces. El consumo de frutos secos podría tener cierto efecto saciante, produciendo así una disminución del consumo de otros alimentos y ayudando a controlar la ingesta total de energía. Aunque aún no está demostrado, podría existir una adaptación del metabolismo, de manera que el consumo de energía podría ser más eficiente y el cuerpo conseguiría quemar más energía, evitando así una acumulación de grasa corporal (Brennan AM et al, 2010; García-Londa P et al, 2003; Rajaram S et al, 2006). Por tanto, nuestros resultados contribuyen a aumentar la evidencia de que una dieta tipo mediterráneo con intervención de AOV o FS no solo no induce a una ganancia de peso sino que produce una pérdida a corto plazo.

En cuanto a los cambios bioquímicos, también existen evidencias consolidadas de los efectos beneficiosos del seguimiento de una dieta mediterránea sobre diversos fenotipos intermedios. Tras 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED observamos cambios favorables para todos los grupos de intervención en el CT y el LDL-c. Tras ajustar por edad, sexo y cambio de IMC durante la intervención (para saber si los cambios se debían a la pérdida de peso en sí, o a la intervención) seguimos observando cambios en todos los grupos excepto para el AOV en el caso del CT. También analizamos otras apolipoproteínas con relevancia en el metabolismo lipídico. Observamos cambios significativos en cuanto a la disminución de la APOB para el grupo de FS y para el grupo de FS y DM para el ratio APOB/APOA. La lipoproteína(a) disminuyó significativamente en el grupo de AOV, aunque tras ajustar por las variables de confusión antes mencionadas se perdió la significación. En nuestro estudio no observamos diferencias significativas en las concentraciones de TG ni tampoco en el HDL-C. Varios estudios transversales han mostrado que la adherencia a la DM se asocia con un mejor perfil lipídico, sobre todo respecto a la concentración de CT (Sotos-Prieto M et al, 2010). Así, Tzima et al, (Tzima N et al 2007) publicaron que individuos con exceso de peso, sobrepeso (IMC 25-29,9) u obesidad, en el tercil más alto de la

puntuación a la DM presentaban menores concentraciones de CT (-13 %; $p=0,001$), tras ajustar por la edad, sexo e IMC respecto al primer tercil. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la trigliceridemia y en la concentración de HDL-C, lo que coincidiría con los resultados de nuestro estudio. Esta mayor adherencia a la DM también se asoció con menor colesterolemia ($p<0,001$) en el estudio de Panagiotakos y colaboradores (Panagiotakos et al, 2006).

Por otra parte, ensayos clínicos aleatorizados controlados de intervención, de mayor evidencia científica (nivel I), también han constatado una disminución en el CT tras la intervención con DM. En este sentido, Estruch R et al (2006) en el estudio piloto PREDIMED con individuos de alto riesgo cardiovascular, observaron que, solo en la DM suplementada con FS se consiguió reducir de forma significativa los niveles de CT ($p=0,040$) y TG ($p=0,022$), respecto al control. También consiguieron una reducción significativa en el índice aterogénico (relación colesterol total/HDL-C) frente al grupo control en el grupo de AOV y FS y también un aumento significativo de HDL-C. Ninguna de las dos dietas mediterráneas redujo de forma significativa los niveles de LDL-C frente a la dieta control baja en grasa. A diferencia, del PREDIMED, en el INDIMED no conseguimos cambios significativos en el HDL ni en el ratio LDL-HDL-c, pero sí en el CT y LDL-C en todos los grupos de intervención. Las diferentes características de la muestra de partida, podrían influir en la distinta respuesta a la dieta. Cambios en el CT y las concentraciones de LDL han sido constatados en varios estudios (Vincent-Baudry S et al, 2005; Ambring A et al, 2004). En un estudio cruzado de 4 semanas de duración cada fase, en 22 personas sanas, observaron una disminución significativa del CT, LDL-C, TG (17%, 22%, 17%) en el grupo que recibió DM (rica en AG n-3, esteroides y fibra) durante 4 semanas (Ambring A et al, 2004). También en el estudio de intervención Medi-RIVAGE de 3 meses de duración el grupo de DM redujo la concentración de LDL-C (Vincent-Baudry S et al 2005). También, en un estudio reciente, que evaluaba los efectos de la DM en dos grupos, uno con pérdida de peso y otro sin pérdida de peso, demostraron que la DM en ausencia de pérdida de peso conduce a cambios significativos en las concentraciones de CT (Richard C et al, 2010). En el estudio INDIMED, tras ajustar por el IMC, los cambios en el CT permanecieron significativos lo que sugiere el efecto beneficioso de la DM en sí misma sin considerar la pérdida de peso.

La relación entre el consumo de frutos secos y reducción en el riesgo de ECV ha sido establecido en numerosos estudios epidemiológicos. Así, Ros E et al (2004) llevaron a cabo un estudio en Barcelona aleatorizado cruzado en personas con moderada hipercolesterolemia, con el objetivo de establecer si una dieta conteniendo nueces (18% de la energía), las cuales son fuente de antioxidantes y ácidos grasos poliinsaturados, podría mejorar marcadores relacionados con la función endotelial respecto a otra dieta típica mediterránea con similar aporte de

energía, grasa, proteínas, hidratos de carbono, pero con aporte de grasa monoinsaturada, tras el seguimiento de cada dieta durante 4 semanas. Al igual que Estruch R et al (2006), observaron una disminución significativa del CT ($p=0,017$), pero también del LDL-C ($p=0,010$) con la dieta que aportaba nueces. Sin embargo, no encontraron diferencias en los niveles de TG y HDL-C, aunque sí una tendencia a la disminución en el ratio LDL/HDL colesterol ($p=0,061$). Esto estaría en concordancia con los resultados obtenidos en nuestro estudio, donde tampoco obtuvimos cambios significativos en el ratio LDL/HDL en el grupo de FS ($p=0,148$). A pesar de que existen estudios que muestran cambios positivos en el HDL-c tras la intervención con FS, un reciente metanálisis no deja tan clara dicha relación (Sabate J et al 2010). Otro estudio llevado a cabo en 71 M Canadienses sanas durante 12 semanas, tiempo durante el cual asistieron a sesiones en las cuales se promocionaba el seguimiento de la DM, se observó una disminución significativa en la concentración de CT a las 6 semanas de intervención ($p<0,05$), mientras que no se observaron cambios significativos tras 12 semanas. Los niveles de HDL-C, LDL-C y TG no se vieron afectados tras 6 o 12 semanas de intervención (Goulet J et al 2003). Como podemos observar, parece claro que la DM ejerza efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico sin embargo, las diferentes características del reclutamiento de los individuos, características de partida, tiempo de intervención, pueden influir en los resultados finales haciendo que existan ciertas discrepancias en los resultados entre estudios.

Mientras son varios los estudios que han mostrado el efecto hipocolesterolemiante de los FS y los beneficios en el perfil lipídico en general, los beneficios sobre el perfil lipídico cuando se sustituye el aceite de oliva refinado por el AOV no se conocen tanto. En nuestro estudio se ha observado un descenso de los niveles de LDL-C (tras ajustar por edad, sexo, y cambio de IMC), mientras que el CT dejó de ser significativo tras ajustar por el cambio de IMC. Un estudio cruzado, llevado a cabo durante 4 semanas para evaluar el efecto de una dieta rica en AOV y FS, mostraron cambios significativos tras la intervención con AOV en el LDL-C y en el CT (Damasceno NR et al, 2011). Aunque también analizaron otras variables relacionadas con el metabolismo lipídico (APOA, APOB, lipoproteína(a)) no obtuvieron resultados significativos. Recientemente, un estudio llevado a cabo por Solá R et al (2011) dentro del estudio PREDIMED han mostrado que los individuos en el grupo de AOV redujeron las concentraciones de APOB y APOB/APOA1. En nuestro estudio, también obtuvimos cambios en la concentración de APOB en el grupo de FS y en el ratio APOB/APOA1 tanto en el grupo FS como en el de DM. No obtuvimos cambios significativos en ninguna otra variable. Tan solo una tendencia en la lipoproteína(a). Los niveles de lipoproteína(a) están determinados por el tamaño de la APOA y se ha asociado con riesgo coronario, infarto de miocardio e ictus. Estudios recientes están analizando la interacción genotipo-fenotipo, sin embargo no hay mucha información en cuanto a la modulación por la dieta, por lo que serían interesantes futuros estudios.

Está demostrado que la sustitución del AOV en detrimento de los AGS tienen un beneficio en las concentraciones de LDL-C, pero los elementos minoritarios que contiene el AOV, así como los compuestos fenólicos y sustancias antioxidantes podrían explicar también estos efectos, sin embargo se necesitan más estudios que examinen estos aspectos (Perez-Jimenez F, 2007).

Por otro lado, también son varios los estudios que evidencian el efecto positivo de la DM y la tensión arterial. En nuestro estudio el consumo de AOV, FS y la AOV+FS junto con la adherencia a la DM mostró efectos beneficiosos para la TAS en todos los grupos excepto el control y para el grupo de FS y DM para la TAD. Sin embargo, tras ajustar por edad, sexo, y cambio de IMC, sólo se mantuvo la significación para la TAS. Los estudios transversales coinciden en que la mayor adherencia a la DM se asocia con menor TAS ($p < 0,001$) (Tzima N et al 2007, Panagiotakos DB et al, 2006; Pitsavos C et al 2007). La cohorte EPIC-Griega (European Prospective Investigation of Cancer), evaluó si la DM en conjunto o el aceite de oliva en particular reducían la presión arterial en 20,343 personas sin diagnóstico de hipertensión arterial. En este estudio, la puntuación a la DM se asoció de forma inversa y significativa con la tensión arterial, tanto sistólica como diastólica, al igual que la ingesta de aceite de oliva, frutas y vegetales (Psaltopoulou T et al, 2004). En cuanto a los estudios de intervención, en el estudio piloto PREDIMED también observaron una disminución significativa tanto en la TAS como TAD en ambos grupos de DM (DM con AOV y DM con FS), respecto a dieta control baja en grasa (Estruch R et al, 2006).

En general, la DM en su conjunto ha demostrado tener efectos protectores sobre la hipertensión por el efecto sinérgico de todos sus componentes (rico en antioxidantes, fibra, AGMI y AG n-3) (Kastorini CM et al 2011, Damasceno NR et al, 2011; Nuñez-Cordoba JM et al, 2009). En cuanto a los posibles mecanismos que expliquen el papel protector del consumo de AOV y la tensión arterial no es del todo clara. Algunas hipótesis son que la ingesta de AGMI podría estar asociada con una mejora de la sensibilidad a la insulina, produciendo una reducción en la tensión arterial. Otros autores sugieren que componentes fenólicos y antioxidantes así como el escualeno del AOV son los que podrían estar asociados a una menor tensión arterial (Esposito K et al, 2003; Owen RW et al, 2000). Respecto al consumo de FS y su asociación con la tensión arterial, se ha propuesto una de las características que podría ayudar en esta asociación es que los FS tienen un contenido bajo en sodio y contienen altas cantidades de AGMI y AGPI además de otros minerales como el magnesio, potasio, calcio, fibra y antioxidantes que influyen positivamente la tensión arterial. Así, los AGMI y AGPI son capaces de reducir los niveles de vasoconstricción de tromboxanos los cuales influyen la regulación de la tensión arterial. El magnesio además estimula la producción de óxido nítrico que es vasodilatador de las prostaciclinas y bloquea los canales de calcio induciendo la vasodilatación. Por otro lado, la ingesta de potasio reduce la

tensión arterial reduciendo el volumen extracelular modulando la actividad del sistema renina-angiotensina y por tanto reduciendo los efectos de la angiotensina. La fibra podría disminuir la tensión arterial por inducción de la saciedad, lo que hace que disminuya la ingesta energética contribuyendo a un menor peso (Casas-Agustench P et al, 2011).

En cuanto a la asociación entre la DM y la glucosa, son varios los estudios que han demostrado un papel protector de la DM sobre la diabetes y el mejor perfil glucémico (Panagiotakos DB et al, 2007, Estruch R et al, 2006;). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de glucosa ni de insulina. Andreoli A et al, (2008) tampoco encontró diferencias significativas cuando alargaba la intervención y el seguimiento durante dos meses más en mujeres obesas. De igual modo, Ambring A et al, (2004) no obtuvieron diferencias significativas en la glucemia e insulinemia al comparar una dieta basada en la mediterránea, rica en ácidos grasos omega 3, esteroides y fibra pero baja en grasa saturada (1869 kcal/d: 48% de la energía carbohidratos, 16% proteína, 34% grasa y 40 g de fibra), respecto a la dieta habitual sueca (2090 kcal/d: 48% carbohidratos, 15% proteínas, 36% grasa, 19 g fibra) Los efectos beneficiosos han sido vistos sobre todo en pacientes con diabetes, o con alguna patología del síndrome metabólico (Estruch et al, 2006). En personas normoglucémicas, en estudios de cohorte, se ha visto como la mayor adherencia a la DM puede prevenir el riesgo de Diabetes. Teniendo en cuenta las limitaciones del estudio, y un tamaño de muestra bajo, podría ser una falta de poder estadístico para poder observar tales asociaciones.

Algo parecido podría ocurrir al considerar el estado inflamatorio. Estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales han mostrado que la DM o el consumo frecuente de varios componentes de este patrón dietético, como el AOV o los FS se asocian con un menor estado inflamatorio (Eposito K et al, 2004; Panagiotakos DB et al, 2006; Ros E et al, 2004; Estruch R et al 2006). Así, Panagiotacos et al (2006) encontraron asociación negativa y significativa entre la adherencia a DM y la concentración de PCR ($p < 0,001$). Asimismo, la puntuación a la DM en el tercil más alto a la DM se asoció con una disminución en los niveles de PCR del 20% ($p = 0,015$) y del 17% para la IL-6 ($p = 0,025$); mientras que la menor adherencia a la DM se asoció con niveles más elevados de PCR ($> 3,0$ mg/ml) (Chrysohoou C et al, 2004). Salas-Salvado et al, (2006) en un estudio en sujetos con alto riesgo cardiovascular (339H/433M, 55-80 años), encontró asociación entre el consumo de algunos alimentos que integran el patrón típico de la DM (frutas, cereales, aceite de oliva virgen y nueces) con menores concentraciones de marcadores de inflamación, especialmente aquellos relacionados con la función endotelial (ICAM-1 y VCAM-1). Por el contrario, Michalsen et al, (2006) no observaron cambios en los niveles de PCR. En nuestro estudio sólo estudiamos las concentraciones de PCRus como

parámetro de inflamación y no observamos cambios significativos. De nuevo, la falta de poder estadístico podría haber sido una limitación.

En la actualidad el término dieta mediterránea está siendo objeto de la realización de múltiples estudios, no sólo en poblaciones mediterráneas, sino también de todos los países, demostrando en general efectos más beneficiosos que otros tipos de dieta en los fenotipos intermedios y finales analizados. Así, se ha demostrado que la dieta mediterránea produce una mayor reducción de marcadores de inflamación y de daño endotelial que la dieta baja en grasas. También resulta más eficaz en la reducción de la presión arterial que una dieta baja en grasa, y consigue reducciones más significativas de la glucemia.

En definitiva, el estudio de intervención INDIMED pone de manifiesto los efectos saludables de la DM observados tanto en estudios epidemiológicos como de intervención. Mejora el perfil lipídico y a la vez sugiere que podría ser útil para la pérdida de peso y otras variables antropométricas. Un seguimiento más prolongado podría ofrecer mas evidencia científica.

5.4 DISCUSIÓN DE CADA UNO DE LOS POLIMORFISMOS Y LAS INTERACCIONES GEN AMBIENTE

5.4.1 POLIMORFISMO rs1466113 DEL GEN *SSTR2*

En el estudio de prevalencia del polimorfismo rs1466113 en el gen *SSRT2* se ha encontrado una frecuencia alélica de 36% para el alelo C con una distribución genotípica de 40,4%GG, 46,3%GC y 13,3%CC. En la base de datos pubmed se ha encontrado indexada la prevalencia de este polimorfismo en distintas poblaciones. Así, los datos obtenidos en este estudio son similares a los encontrados en caucásicos con una frecuencia alélica de 33 % para el alelo C y algo inferior a la encontrada en una muestra de 30 tríos de madres, padres e hijos residentes en el estado de UTA, EEUU con ancestros del norte y este de Europa en población europea (44,2% (HapMap)) con una distribución genotípica superior para el alelo C en homocigosis que la muestra estudiada (33%GG, 45%GC, 21%CC). Además, se observa que la frecuencia alélica es superior a la de otras poblaciones de África subsahariana (15,8%) y Afroamericana (12,5%).

Por lo que respecta al estudio de asociación con variables antropométricas y bioquímicas, en el estudio de validación del Affymetrix GeneChip® de 100K en la población de Framingham se encuentra uno en el gen *SSRT2* (Fox et al, 2007) este polimorfismo (rs1466113) se asoció con variables antropométricas, circunferencia de la cintura y el IMC. En nuestro estudio también obtuvimos resultados vinculados a variables antropométricas. Así, se observó una asociación

significativa entre la mutación en homocigosis y el peso y la cintura en el caso de los hombres, con una tendencia a la significación en el caso del IMC. Asimismo, en la población general se observó una asociación significativa con la obesidad. Parece que los portadores de la mutación en homocigosis muestran una protección frente a la obesidad y a estas variables antropométricas. Por otra parte, en nuestro estudio encontramos nuevas asociaciones. Los portadores del alelo mutado en homocigosis presentaron valores significativamente menores de urea y hipertensión arterial.

En el IRAS Family Study se realizó un estudio de asociaciones genéticas en 1425 individuos descendientes de Hispánicos (90 familias) para identificar regiones del genoma ligadas con el fenotipo de obesidad. Además estudiaron 10 polimorfismos del gen de *SSRT2* para analizar 6 fenotipos de obesidad. El polimorfismo C-14106T estuvo asociado con el IMC. También se encontró asociación entre la circunferencia de la cintura-cadera, y la circunferencia de la cintura y el polimorfismo A1242G (Sutton et al, 2006).

En el estudio de interacción gen-dieta no encontramos interacciones significativas. Sin embargo, encontramos una asociación entre el polimorfismo y la ingesta de comida en la población mediterránea PREDIMED. Los individuos CC presentaban menor ingesta de lácteos, carnes, y legumbres que los portadores del alelo G. Estos sujetos también presentaban menor IMC y menor prevalencia de obesidad. Uno de los mecanismos plausibles por los que variaciones en el gen *SSTR2* podría influenciar el riesgo de obesidad es a través de su implicación en la ingesta de alimentos (Scalera G et al, 1998; Feifel D et al 1990; Stepanyan Z et al, 2007; Tachibana T et al, 2009; Ross AW et al, 2009). Aunque algunos estudios han mostrado que la administración de somatostatina juega un papel en el comportamiento alimentario y en la regulación del peso corporal en ratas y otros modelos animales (Scalera G et al, 1998; Feifel D et al 1990; Stepanyan Z et al, 2007; Tachibana T et al, 2009; Ross AW et al, 2009), los resultados han sido altamente contradictorios a causa de las múltiples acciones de este péptido en el sistema central y gastrointestinal. Recientemente se ha visto que la somatostatina modula la eficacia de la señal de la leptina en el hipotálamo (Stepanyan Z, et al 2007). De acuerdo con esto, otro estudio llevado a cabo en pollos ha mostrado que inyecciones intracerebroventriculares de somatostatina aumenta la ingesta de energía, sugiriendo que la somatostatina sirve como un péptido orexígeno (Tachibana T et al, 2009). Tomando todos estos resultados hallados en otros estudios, podemos hipotizar que el polimorfismo rs1466113 en el gen *SSTR2* podría estar asociado con menor expresión genética y subsecuentemente con menor efecto de la somatostatina. Esto conllevaría a una disminución de la ingesta de energía y por tanto del peso corporal y del riesgo de obesidad. Otra observación interesante en nuestro estudio es que el polimorfismo rs1466113 está asociado a la ingesta de proteínas. Una revisión de la literatura revela que esta observación

epidemiológica podría tener un complejo mecanismo detrás. Así, se ha visto que en ratones las interneuronas que contienen somatostatina están ampliamente distribuidas en el cortex anterior periforme, en un área responsable de la percepción y reconocimiento de los aminoácidos en la dieta (Gietzen, DW 1993). De acuerdo con esto Scalera G et al (2003) mostró un efecto dependiente de la administración periférica de somatostatina y la menor proteína basal de la dieta, así como menor ganancia de peso y movilidad gastrointestinal en ratones, lo que podría ayudar a explicar nuestros resultados.

En conclusión, hemos encontrado una asociación del polimorfismo rs1466113 en el gen *SSTR2* con el IMC en población mediterránea replicando resultados del estudio Framingham. Además, hemos hallado por primera vez una asociación entre este polimorfismo y la ingesta de comida. Sin embargo, considerando la complejidad del papel que desempeña la somatostatina, son necesarios más estudios que analicen la ingesta de comida.

Como se ha explicado en el apartado 1.2.3 se ha visto que el gen *SSTR2* está implicado en la inhibición de hormonas gastrointestinales, específicamente la gastrina y el ácido gástrico y reduce la tasa de absorción de nutrientes (Fung et al, 1997) y que por tanto *SSTR2* podría jugar un papel en los mecanismos de alimentación pudiendo influir en la obesidad. No obstante, al ser un polimorfismo novedoso no existen datos en la bibliografía que permitan comparar estos resultados. Por ello, sería interesante la replicación de los resultados obtenidos en otras poblaciones por otros estudios así como el análisis en profundidad de los mecanismos por los cuales este polimorfismo pueda estar implicado en la obesidad y la relación que pudiera encontrarse con la hipertensión.

5.4.2 POLIMORFISMOS rs7138803 DEL GEN *FAIM2*, rs7561317 DEL GEN *TMEM18* Y rs2568958 DEL GEN *NEGR1*.

En primer lugar, en cuanto al estudio de las frecuencias alélicas para los polimorfismos estudiados en los diferentes genes, el rs7138803 en el gen *FAIM2*, la frecuencia alélica hallada para el alelo menos prevalente en esta población fue similar a la de otras poblaciones europeas (Li S et al, 2010). En cambio en población asiática y subsahariana la frecuencia genotípica para AA fue inferior a la encontrada en nuestra población (3,5 y 3,5 % respectivamente vs 11% en nuestra población). La frecuencia alélica del alelo menor para el SNP rs7561317 en el gen *TMEM18* encontrada en nuestra población fue de 0,21 y similar a la hallada en población europea sueca (0,19) (Almen MS et al 2010). En población asiática la frecuencia alélica para el alelo A encontrada según datos del hapmap es inferior a la nuestra (0,093), en cambio en población subsahariana es similar a la nuestra (0,212). Por último, para el polimorfismo rs7561317, la frecuencia alélica en nuestra población coincide con el de otras poblaciones europeas (0,334) y de nuevo

diferente al considerar otras poblaciones. Es inferior en asiáticos (0,116) y superior en subsaharianos (0,473).

La elección del estudio de estos polimorfismos se realizó por su novedad, y por la nueva identificación de estos locus con la obesidad. La identificación de estos locus como posibles dianas para el abordaje de la obesidad, y por tanto, la identificación de estos SNPs fue realizada por estudios GWAs. Estos estudios se realizaron en el 2009 por el GIANT (Genetic Investigation of Antropometric Traits Consortium o Consorcio de Investigación Genética en medidas Antropométricas) (Willer CJ et al, 2009; Thorleifsson G et al 2009). Willer CJ et al (2009) para identificar nuevos loci, llevaron a cabo un metaanálisis en 15 estudios de GWAs para el IMC (tamaño de muestra superior a 32,000) y continuaron con los datos que proporcionaron señales más altas en 14 cohortes adicionales ($n > 59,000$). Tras este análisis se identificaron 6 nuevos locis asociados con la obesidad (entre ellos el *TMEM18* y *NEGR1*). Para confirmar su asociación con la obesidad llevaron a cabo el genotipado de los tag-SNPs en amplias poblaciones (cohorte EPIC-Norfolk, tamaño de muestra cerca de 15000) y validaron los resultados en 45,000 individuos más. Así confirmaron que variaciones en estos genes estaban asociadas con IMC.

Para nuestro estudio seleccionamos 3 polimorfismos en estos genes con el fin de validar o confirmar la asociación entre los mismos y la obesidad o parámetros relacionados en población mediterránea de alto RCV. En el estudio de asociación encontramos asociaciones significativas entre estos polimorfismos con la obesidad y parámetros relacionados. En cuanto al polimorfismo rs7138803 en el *FAIM2*, a pesar de no encontrar diferencias significativas con los parámetros antropométricos analizados, encontramos que los portadores del alelo mutado (AA) presentaban mayor peso que AG+GG cuando tenían una vida sedentaria o eran fumadores. En cambio, no se observaron diferencias en cuanto al peso y el genotipo cuando realizaban actividad física o no eran fumadores. Además, los individuos con el genotipo AA presentaron un menor consumo de energía que los GG+GA. La bibliografía existente, ha encontrado asociación entre este polimorfismo y el peso y la obesidad (Li S et al, 2010, Thorleifsson G et al 2009). No se han encontrado estudios hasta la fecha que analicen este polimorfismo y sus modulaciones ambientales. No obstante, es bien sabido el papel protector de la actividad física en el riesgo de obesidad. En cuanto al tabaco, la nicotina tiene un efecto de aumento del gasto energético, sin embargo su asociación con el peso ha sido controvertida. Todavía son necesarios estudios de replicación de estas asociaciones en otras poblaciones para aumentar el grado de evidencia científica y dilucidar los mecanismos que podrían estar implicados en la asociación de este polimorfismo y el riesgo de obesidad.

Por otro lado, el polimorfismo rs75613117 en el gen *TMEM18* estuvo asociado con la circunferencia de la cintura tanto de manera general como en hombres y en mujeres, de tal manera que los homocigotos mutados (AA)

presentaron menores cifras de circunferencia de la cintura que los GA y estos que los GG. También presentaron menores niveles de IMC y peso aunque tras el análisis multivariante no alcanzó la significación estadística. El polimorfismo más estudiado en este gen ha sido el rs65488238, aunque algunos estudios han visto que existe un gran desequilibrio de ligamiento con el rs75613117 objeto de estudio en esta tesis (Hotta K et al, 2009). Varios estudios analizando estos SNPs cerca del gen *TMEM18* han mostrado una fuerte asociación con la obesidad y con el IMC tanto en población caucásica (Willer CJ et al, 2009; Holzapel C et al, 2011, Almen MS et al, 2010) como en Japonesa (Hotta K et al 2009) y en adultos y niños (Almen MS et al, 2010). Renstrom F et al (2009) han encontrado que variaciones en el *TMEM18* estaban predominantemente asociadas con la acumulación de grasa, lo que está de acuerdo con nuestros resultados en cuanto a la asociación con la circunferencia de la cintura. Además, en el análisis de interacción gen-ambiente encontramos diferencias para el IMC en función del genotipo solo cuando la adherencia a la DM era baja. En cambio si la adherencia a la DM era alta, no se manifestaban estas diferencias. De igual modo, cuando consideramos el consumo de FS alto (>3 veces/seman) y bajo (<3 veces/semana) observamos, que existían diferencias en cuanto a la circunferencia de la cintura y el genotipo solo cuando el consumo era bajo. El *TMEM18* es un gen hipotalámico que se expresa en altas cantidades en el cerebro en una región responsable del control de la energía homeostática (Almen MS et al, 2010; Willer CJ et al, 2009) donde el sistema nervioso central procesa la regulación del peso corporal. Esta información, ha llevado a pensar a la comunidad científica a que la ingesta de energía y la procedencia de esta energía (AGS, hidratos de carbono, proteínas, etc) podría tener implicación en la expresión los genes identificados como dianas para la obesidad y que se expresan en el cerebro (Bauer F et al 2009). Aunque en nuestro estudio no hemos encontrado diferencias en la ingesta de energía en este gen, si que hemos encontrado diferencias para el IMC y circunferencia de la cintura en función de alta adherencia a la DM y la ingesta de FS. Es bien conocido el papel protector de la DM y de los FS, principalmente caracterizado por la ingesta de AGPI. Los AGPI son activadores de muchas señales metabólicas relacionadas no solo con el metabolismo lipídico sino también con señales de hambre/saciedad. Todavía no hay estudios que analicen la asociación de este polimorfismo con la obesidad y parámetros relacionados y su interacción con la dieta, por lo que todavía es pronto para encontrar una explicación para esta asociación. Son necesarios más estudios que analicen los mecanismos fisiológicos que podrían estar detrás de estas asociaciones.

En cuanto al polimorfismo rs2568958 estudiado en el gen *NEGR1*, hemos encontrado un menor peso, IMC y circunferencia de la cintura tanto en población general del PREDIMED como en hombres para los portadores del alelo G (GG+GA). Además, los portadores de la mutación también presentaron menor prevalencia de sobrepeso y menor riesgo de obesidad. Este polimorfismo también lo

estudiamos para la población INDIMED y replicamos la asociación con el peso corporal en el caso de los hombres. Desde la identificación de este locus con la obesidad (Willer CJ et al 2009, Thorleifsson G et al, 2009) son varios los estudios que han replicado que variaciones en el rs2568958 y rs2815752 (en desequilibrio de ligamiento) están asociados con el peso corporal, el IMC, y la obesidad (Willer CJ et al 2009; Renstron F et al, 2009; Bauer F et al 2009; HottaK et al, 2009). El gen *NEGR1* también está altamente expresado en el hipotálamo y podría tener una función en el sistema nervioso central (Willer CJ et al, 2009) y por tanto, en su implicación en la regulación del peso y en la ingesta de energía. Se ha visto que los alelos de riesgo para la obesidad para algunas variantes estudiadas en los genes *SH2B1*, *KCTD15*, *MTCH2* y *NEGR1* estaban asociadas con la ingesta de grasa saturada, hidratos de carbono, mono, di y polisacáridos. En nuestras poblaciones no hemos encontrado ninguna interacción entre la ingesta de energía o comida y el gen. Sin embargo, en la población PREDIMED, encontramos que el IMC solo era diferente entre genotipos cuando no se realizaba actividad física, en cambio, para los no sedentarios no existía esta diferencia a pesar de portar el alelo de riesgo para el IMC. Hasta la fecha no hay artículos que analicen interacciones gen-ambiente para estos polimorfismos, sin embargo, se vuelve a poner de manifiesto el papel preventivo de la actividad física para desarrollar obesidad incluso en las personas genéticamente predisuestas. Por último, no podemos explicar la asociación de este polimorfismo y el sexo masculino, sin embargo se sabe que hay algunos polimorfismos que se asocian al sexo. No obstante, más estudios son necesarios para ampliar la información acerca de estas asociaciones.

En conclusión, hemos encontrado asociaciones entre variaciones en los genes *FAIM2*, *TMEM1* y *NEGR1* y la obesidad y parámetros antropométricos replicando previos resultados extraídos de estudios de asociación genética amplia tanto en población mediterránea de edad avanzada como en población adulta sana. Además, hemos encontrado modulaciones gen-ambiente (adherencia a la DM, consumo de FS, actividad física y tabaco) novedosas para estos genes que podrían ayudar a dar recomendaciones preventivas en aquellos individuos mas susceptibles genéticamente para la obesidad. No obstante, para que esto pueda llevarse a la práctica, todavía es demasiado pronto, ya que los resultados son muy preliminares y se requiere replicación de estas interacciones por otras poblaciones para aumentar el grado de evidencia. Además, todavía se conoce poco sobre los mecanismos fisiológicos que podrían estar implicados en la asociación entre estos polimorfismos, el consumo de alimentos o energía y el riesgo de obesidad.

5.4.3 POLIMORFISMOS rs2167444 Y rs508384 DEL GEN *SCD1*

En primer lugar, la frecuencia alélica de los polimorfismos estudiados en este gen fue similar a la reportada por el grupo sueco que analizó estos polimorfismos en población europea sueca (Warensjo E et al, 2007). La frecuencia genotípica en

población asiática y afroamericana para el alelo mutado es inferior a las de población caucásico o europea.

Variaciones genéticas en este gen en humanos han sido escasamente estudiadas. Resultados en animales de experimentación ponen de manifiesto que la disrupción o disminución de la actividad del gen *SCD1* conlleva una reducción en la adiposidad y un incremento en la sensibilidad a la insulina. Además, también parece que estos ratones son resistentes a la ganancia de peso cuando se les induce a una dieta (Ntambi JM, et al, 2002; Rahman et al 2003). Nuestro objetivo fue analizar si variaciones en dos SNP en este gen estaban asociados a con la obesidad o parámetros antropométricos. En nuestra población observamos que los portadores de la variante mutada en homocigosis (rs2167444) tenían menor circunferencia de la cintura (tendencia a la significación). Warensjo E et al (2007) analizaron los dos polimorfismos estudiados en nuestra muestra obtuvieron asociaciones significativas en el mismo sentido tanto para la circunferencia de la cintura como para el IMC. Además, los portadores del alelo mutado para el SNP rs508384 tuvieron menor riesgo de obesidad que los homocigotos para el alelo salvaje. La evidencia describe el *SCD1* como una diana potencial para prevenir o tratar la obesidad. A pesar de los estudios comentados anteriormente basados en modelos animales, dos estudios llevados a cabo en humanos y uno en ratón mostraron que el incremento celular de la actividad de *SCD1* influye en la composición celular de ácidos grasos mediante la promoción de la síntesis de ácidos grasos y la disminución de la oxidación. De esta manera, la disminución de la expresión de *SCD1* podría proteger contra la obesidad y la resistencia a la insulina (Mauvoisin D, Mounier C, 2011, Hulver MW et al, 2005; Jiang G et al, 2005; Sampath H et al, 2007; Stefan N et al, 2008). Sin embargo, otros dos estudios independientes en humanos han asociado la baja actividad hepática de *SCD1* con ácido graso y resistencia a la insulina (Stefan N et al, 2008). Todavía se necesitan más datos para poder confirmar esta asociación con la obesidad. En nuestro estudio, se podría sugerir que la variante mutada de los polimorfismos estudiados podría ejercer influencia en la expresión del gen. Si el gen se expresa menos, su actividad disminuye y por tanto tendría sentido la relación con la obesidad tal y como se ha visto en otros estudios. No obstante, son necesarios más estudios que confirmen dicha hipótesis.

Al considerar el perfil lipídico hemos encontrado una asociación con las concentraciones de TG. Los homocigotos mutados para el polimorfismo rs2167444 tuvieron mayores concentraciones de TG y los portadores de la mutación para el polimorfismo rs508384 mayor riesgo de hipertrigliceridemia. Estas asociaciones irían en sentido inverso con las encontradas para los parámetros antropométricos, pero tendrían más sentido si consideramos los estudios que demostraron hígado graso cuando la actividad del *SCD1* estaba disminuida. El *SCD1* está asociado con el metabolismo lipídico por el papel fisiológico que desempeña esta enzima lipogénica. No podemos olvidar el papel de *SCD1* en el metabolismo para entender

la posible asociación con la concentración de TG. SCD1 desatura sustratos como el palmitoil-CoA (C16:0) y estearoil-CoA (C18:0) convirtiéndolos en palmitoleoil-CoA (C16:1) y oleoil-CoA (C18:1) respectivamente (Mahfouz MM et al, 1980). Estos AGMI son los sustratos clave para la formación de fosfolípidos, TG y colesterol. Los TG son predominantes en el tejido adiposo en humanos y se forman desde el ácido oleico, principal producto de la reacción del SCD1. El ácido oleico y el palmitoleico son la mayor fuente de AGMI en la membrana de los fosfolípidos. La alteración anormal del ratio ácido esteárico/ácido oleico juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades como la diabetes, ECV, obesidad y otras enfermedades. Durante estado de ayunas, se ha visto que la actividad de la SCD1 disminuye y es rápidamente inducida cuando hay un consumo alto de hidratos de carbono (Ntambi JM 1999). En un estudio han hallado que las concentraciones de TG, independientemente de las variaciones que puedan sufrir por la restricción de hidratos de carbono o la pérdida de peso, están correlacionadas con la expresión de SCD (Mangravite LM et al, 2007). En humanos, como hemos comentado antes, la actividad SCD es mayor con una dieta rica en hidratos de carbono y baja en grasa. Sin embargo, en el estudio de Mangravite LM et al (2007) observaron que la correlación entre el cambio en las concentraciones de TG inducido por la dieta y la expresión del SCD en el tejido adiposo era independiente de la ingesta de carbohidratos. Estos resultados sugieren que la correlación de la expresión de SCD en el tejido adiposo con las concentraciones de TG refleja la acción de mecanismos no mostrados en la actividad sistémica del SCD lo que incluye una contribución sustancial de SCD hepática (Attie AD et al, 2002). No obstante, todavía se necesitan más estudios para explicar los mecanismos por los cuales mutaciones en este gen en humanos podrían alterar el metabolismo de TG así como su asociación con la obesidad.

En nuestra población, es de destacar que hemos obtenido una interacción significativa gen-dieta para las concentraciones de TG. De modo que, las concentraciones de TG solo eran mayores en los mutados para el polimorfismo rs2167444 cuando la adherencia a la DM era baja. Sin embargo, cuando la adherencia era alta no se observaron diferencias en la concentración de TG entre los mutados y no mutados. Respecto a esta interacción, se sabe que existe una regulación nutricional de la expresión del gen *SCD1*. Los AGPI tanto los n-3 como los n-6 han sido descritos como potentes inhibidores de la expresión del gen *SCD1* (Ntambi JM, 1999). Esta regulación podría ser importante para la regulación de la secreción de VLDL como el mayor AG sintetizado *de novo* en el hígado y transformado en TG, el principal componente de las VLDL (Gibbons GF, 1990). El ácido docohexaenoico (DHA) y araquidónico (AA) al cual pertenece la familia omega-3 han sido identificados como los principales inhibidores de SCD1 así como los omega-6 (ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido linoléico conjugado (CLA)). El efecto del CLA en la transcripción del SCD1 parece ser diferente de un isómero a otro (trans-10, cis-12 versus cis-9, trans-11). CLA inhibe la transcripción

del *SCD1* en ratones y bovinos mientras que en humanos este efecto parece ser principalmente post-transcripcional. (Choi Y et al, 2001). Si consideramos que la DM se caracteriza por proporcionar un elevado porcentaje de grasa a la dieta de la cual su gran mayoría son AGPI (AGMI procedentes del AOV y AGPI procedentes tanto de FS como de pescado), podría tener sentido que en condiciones de alta adherencia, donde el contenido en AGPI es elevado, la actividad y la expresión del gen *SCD1* estuvieran disminuidas, de tal manera que la producción o formación de TG fuera menor. Mientras que en condiciones de baja ingesta de AGPI, principales inhibidores del *SCD1*, esto no sucediera y por tanto se manifestaran las diferencias en la concentración de TG.

En conclusión, estos resultados sugieren que variaciones en el gen *SCD1* están asociadas a menor riesgo de obesidad y circunferencia de la cintura replicando resultados obtenidos por el grupo sueco (Warensjo E et al, 2007). Además, variaciones en este gen están asociadas a variaciones en la concentración de TG y riesgo de HTG, estando estas asociaciones moduladas por la alta adherencia a la DM. Sin embargo, se requieren más investigaciones que puedan determinar cual es papel del SCD como gen candidato para el control de la obesidad y enfermedades relacionadas así como el papel de la dieta y su capacidad para modular determinadas asociaciones.

5.4.4 POLIMORFISMOS rs3818292 Y rs7069102 DEL GEN *SIRT1*

Las frecuencias alélicas halladas para el alelo menor en los polimorfismos estudiados fueron similares a las reportadas por Peeters AV et al (2008) en población belga caucásica. También la frecuencia alélica hallada para el SNP rs7069192 fue similar a la encontrada por Weyrich et al (2009) en población alemana caucásica (0,301 en nuestro estudio y 0,301 en el de Weyrich et al (2009)). Sin embargo, al comparar las frecuencias alélicas con los datos obtenidos en el Hapmap, los asiáticos tenían una frecuencia alélica para el alelo menor mayor (0,314 frente a 0,05 en nuestra población) para el rs3818292. En cambio, los subsaharianos y afroamericanos menor (0,037 frente a 0,05 en nuestra población). Para el rs7069102 sucedió algo similar, pero en este caso la población asiática todavía tienen una frecuencia mayor para el alelo menor en comparación con nuestra población y población caucásica (0,856 vs 0,301). La frecuencia alélica registrada para la población subsahariana y afroamericana fue similar a la europea.

Por lo que respecta al estudio de asociación, no encontramos resultados significativos para los SNPs estudiados y fenotipos relacionados con la obesidad. En cuanto a las variaciones genéticas en este gen y sus principales asociaciones, el primer estudio en aportar datos significativos entre variaciones genéticas en el gen *SIRT1* y la obesidad y parámetros antropométricos fue el llevado a cabo por Peeters AV et al (2008). Este grupo reportó resultados significativos estudiando los dos SNPs analizados en nuestro estudio. El polimorfismo rs3818192 estuvo asociado

con la grasa visceral en varones obesos, sin encontrar diferencias en mujeres. Y los portadores de la variante mutada para el rs7069102 tuvieron un menor riesgo de obesidad que los no portadores. Una de las explicaciones por las que el SNP rs7069102 podría estar asociado con la obesidad es que este SNP se encuentra en un bloque haplotípico de desequilibrio de ligamiento que también contiene otros SNPs localizados en la región promotora y en exones. En nuestro estudio no encontramos resultados significativos. Una de las limitaciones que podría aumentar la probabilidad de no encontrar resultados significativos es la baja frecuencia alélica del alelo menor para el rs3818292, además el estudio comentado incluía más de 1000 pacientes obesos. Las diferencias de las características de la muestra y el tamaño muestral podrían ser una limitación para el estudio de asociación en nuestra población. Sería adecuado aumentar el tamaño de muestra para explorar posibles asociaciones. Además de este estudio belga, tres SNP en el gen de la *SIRT1* (rs3740051, rs2236319, and rs2272773), han sido estudiados y asociados con la tasa del gasto energético en población fina (Weyrich P et al, 2009). Parece plausible que una reducción en gasto energético causada por variantes en el gen *SIRT1* podría estar asociada con la obesidad. Otros dos estudios recientes encontraron también asociaciones significativas. Uno llevado a cabo en 3,574 participantes holandeses mostraron que el rs2273773 estaba asociado con el IMC ($p=0,001$) (Van den Berg SW et al, 2009). El segundo estudio investigó 3 SNPs en dos poblaciones holandesas ($n=6,251$ y $n=2,347$) y encontró que dos SNPs de los estudiados (rs7895833 y rs1467568) estaban asociados con el IMC y con la obesidad (Zillikens MC et al, 2009). Sin embargo el estudio llevado a cabo por Weyrich P et al (2009) que también estudió uno de los polimorfismos estudiados en nuestro estudio no encontró asociaciones significativas para este SNP (rs7069102) y la obesidad o el IMC, ni Flachsbar F et al (2006) al analizar variaciones genéticas en la *SIRT1* y la longevidad en humanos. Sin embargo, la relación entre las variaciones genéticas en este gen y sus posibles efectos sobre la expresión está menos estudiada. Solo hay un estudio reciente cuyo objetivo ha sido investigar la asociación entre SNPs en *SIRT1*, la expresión del *SIRT1* y la obesidad en 1,533 sujetos obesos y 1,237 sujetos controles no obesos en población francesa (Clark SJ et al, 2011). Este grupo encontró una asociación entre 4 SNPs (rs11599176, rs12413112, rs33957861, and rs35689145) y el IMC ($p<0,05$) siendo el alelo menor el que se asociaba con menores valores de IMC. Sin embargo, ningún SNP estuvo asociado con los niveles de expresión del gen. Esto pone de manifiesto la necesidad de continuar investigando en este sentido para dilucidar si variaciones genéticas en el gen *SIRT1* podrían tener relación con la expresión del gen y esta con la obesidad.

A pesar de que variaciones en este gen en humanos ha sido menos estudiado, estudios de expresión han intentado poner de manifiesto la posible relación entre la activación de este gen y la obesidad. En los últimos 20 años, los biólogos han demostrado que las proteínas sirtuinas pueden retrasar el proceso de

envejecimiento en muchas especies animales (Bordone et al 2006, Crujeiras AB et al 2008). Las sirtuinas han recibido mucha atención en los últimos años por su vinculación con resveratrol, un compuesto encontrado en el vino tinto que ha demostrado efectos beneficiosos contra el cáncer, enfermedades del corazón y la inflamación en estudios con animales (Lagouge M et al 2006). La expresión del gen *SIRT1* ha sido asociado con resultados beneficiosos sobre la sensibilidad a la insulina, la glucólisis y lipogénesis sobre todo en condiciones de restricción calórica (Pfluger et al, 2008). Según una investigación llevada a cabo por un grupo de la Universidad de Navarra, parece que el seguimiento de una dieta hipocalórica activaría las sirtuinas lo que podría ayudar a retrasar el envejecimiento y las ECV y a través de su activación ayudaría a la pérdida de peso y a la disminución del estrés oxidativo (Crujeiras AB et al 2008).

Por otro lado, en nuestro estudio tampoco encontramos interacciones gen-ambiente. Un estudio encontró que la ingesta de vitamina E podría modular variaciones genéticas en este gen con el IMC. Así, individuos en el tercil mas bajo de ingesta de vitamina E tenían más IMC (Zillikens MC et al, 2010). Hasta la fecha es el único estudio que ha encontrado resultados significativos. Dada las características de nuestro estudio y población sería interesante analizar mas a fondo si la ingesta de AOV (rico en vitamina E) podría modular algunos parámetros antropométricos. Para ello, sería necesario ampliar el tamaño de muestra o analizar otras variantes genéticas.

En conclusión, a pesar de no encontrar asociaciones significativas entre las variaciones estudiadas en el gen de *SIRT1* y la obesidad y parámetros relacionados, dado el interés que está despertando este gen, sería interesante analizar mas en profundidad otras variaciones genéticas en este gen y las posibles modulaciones tanto por los componentes de la DM como por la adherencia a la DM en su totalidad.

5.4.6 POLIMORFISMO rs5082 DEL GEN *APOA2*

En primer lugar, en el estudio de prevelancia de los polimorfismos genéticos en la población mediterránea estudiada se observó que la frecuencia alélica del polimorfismo en la región promotora del gen *APOA2* varía entre etnias. La frecuencia alélica obtenida en nuestra población, tanto en la población PREDIMED como INDIMED, fue similar a la obtenida en otras poblaciones caucásicas y europeas (Hapmap, Corella D et al, 2009; Corella D et al, 2011). Sin embargo, la frecuencia genotípica para el alelo menor (CC) varía entre etnias (1% a 15%) (Corella D et al, 2010). Según datos del Hapmap, la prevalencia del genotipo CC es nula y la frecuencia alélica de 4,1%. En nuestra población la prevalencia del genotipo CC fue de 14,8 % y 15,2 % para el PREDIMED e INDIMED respectivamente. En población subsahariana, la frecuencia genotípica de CC

también fue menor que en población caucásica (5,3%) e incluso en un estudio han encontrado déficit de variación en SNPs en este gen (Fullerton SM et al, 2002).

En segundo lugar, en el análisis de asociación para este polimorfismo observamos que el genotipo CC estuvo asociado con mayores niveles de IMC, peso y circunferencia de la cadera en la población PREDIMED. En el INDIMED, también los individuos CC presentaron mayores niveles de IMC en la población general con tendencia a la significación. Además, los CC presentaron mayores niveles de circunferencia de la cadera, tal y como ocurrió en el PREDIMED. Al estratificar por sexo, las mujeres CC presentaron mayores niveles de IMC, circunferencia de la cintura y de la cadera. En el estudio INDIMED encontramos una asociación con las concentraciones de TG. Los resultados obtenidos en nuestros estudios están en consonancia con la bibliografía consultada. Así, este SNP ha sido asociado con mayor circunferencia de la cintura en hombres (van 't Hooft FM et al, 2001), con mayor depósito abdominal en mujeres (Lara-Castro C et al, 2005), con mayor ratio circunferencia de la cintura/cadera en población francesa (Duesing K et al, 2009) y con mayor IMC en blancos americanos (Corella D et al, 2007). También se han analizado variaciones en este gen y su asociación con diabetes, sin embargo la asociación es controvertida. En caucásicos franceses no encontraron asociaciones significativas entre variaciones en el gen *APOA2* y la DMT2 (Duesing K et al, 2009). Se sabe que el cambio de T>C en el polimorfismo estudiado (rs5082) afecta al elemento D del promotor de la *APOA2*, demostrando que hay una caída del 30% en la actividad basal de transcripción (van 't Hooft FM et al, 2001; Lara-Castro C et al, 2005). Aunque Castellani et al (2001) encontró un incremento en el peso corporal en ratones que sobreexpresaban *APOA2* de murino, los mecanismos por los cuales *APOA2* podría influenciar el peso corporal son desconocidos. En cuanto a la asociación encontrada con las concentraciones de TG, algunos estudios muestran una relación positiva entre la apoA2 y la síntesis de LDL-apoB en humanos (Marzal-Casacuberta et al, 1996). A pesar de que algunos estudios hayan encontrado una sobreexpresión de *APOA2* en hipertrigliceridemia (Castellani et al, 2001), su papel en humanos es controvertido. Recientemente, el grupo Julve et al (2010) ha sugerido que la ApoA2 juega un papel crucial en el catabolismo de los TG mediante la regulación de la actividad de la lipoproteína lipasa.

Con respecto al estudio de las interacciones gen-ambiente, en el estudio PREDIMED encontramos una interacción significativa con la ingesta de AGS para modular los niveles de IMC. Así, en aquellos individuos que tenían un consumo menor (<22g/grasa saturada/día), *APOA2* no estaba asociado con el IMC, mientras que si que existía asociación para los individuos con el genotipo CC cuando la ingesta de grasa saturada era superior a 22 g de grasa saturada al día. Para la población INDIMED, encontramos también una interacción gen-adherencia a la DM para modular los valores de IMC y de circunferencia de la cintura. Los

individuos con el genotipo CC tenían mayor IMC y circunferencia de la cintura cuando la adherencia a la DM era baja. Esta interacción encontrada con la ingesta de AGS en la población mediterránea (PREDIMED) replica resultados obtenidos en tres poblaciones americanas (Corella D et al, 2009). Los mecanismos detrás de estas interacciones son todavía desconocidos, sin embargo, existen algunas evidencias que apoyan estos resultados. APOA2 es la segunda apolipoproteína más abundante de la HDL y juega un papel complejo en el metabolismo de las lipoproteínas, la resistencia a la insulina, la obesidad y la susceptibilidad a la arteriosclerosis (Castellani et al 2001, Castellani et al 2008). Castellani et al (2001) encontró que el ratón transgénico para APOA2 tenía incrementado el peso corporal y contenido de grasa en comparación con el ratón control. Este grupo también encontró que en estos ratones la resistencia a la insulina era mayor. Estos resultados estaban en concordancia con las observaciones de Weng W et al (1996). La deficiencia de APOA2 estuvo asociada con menores concentraciones de HDL-C, AG libre, glucosa, y niveles de insulina. Sin embargo, existen algunas discrepancias y resultados controvertidos en cuanto a la sobreexpresión de APOA2 y la resistencia a la insulina (Martín-Campos JM et al, 2004; Escola-Gil JC et al, 2002). Una de las fuentes que discrepa con estas asociaciones va en el sentido de nuestros resultados. La diferencia en la expresión de *APOA2* depende del tipo de dieta administrada (Martín-Campos JM et al, 2004, Blanco-Vaca F et al 2001). Una posible hipótesis para integrar los resultados observados en humanos y en animales es que el alelo C se asocia en general con menor expresión de APOA2 lo que conllevaría a menores niveles de APOA2. Si APOA2 actúa como señal de saciedad, menores niveles de APOA2 actuarían aumentando el apetito. Este apetito sería preferentemente por comida rica en grasa saturada y esta alta ingesta conduciría a un mayor peso o resistencia a la insulina (Corella D et al, 2011). Esto podría estar en consonancia con nuestros resultados donde los individuos con el genotipo CC que no consumen una alta cantidad de grasa saturada, no tienen ese aumento de peso.

Por otro lado, en cuanto a la interacción observada con la DM en su conjunto en lugar de con la ingesta de nutrientes específicos, la DM se caracteriza por una ingesta elevada de grasa pero por una ingesta baja de AGS. Esto junto con el efecto y la sinergia de otros componentes podrían explicar la interacción observada que iría en el mismo sentido que la encontrada en la población PREDIMED.

En conclusión, la variación en el promotor del gen de la *APOA2* está asociada con el peso e IMC, circunferencia de la cadera y la circunferencia de la cintura en dos poblaciones mediterráneas (edad avanzada y edad adulta). Además, hemos replicado y observado interacción gen-dieta con la ingesta de AGS para modular el peso corporal en la población PREDIMED. En el INDIMED también hemos encontrado que la mayor adherencia a la DM modula el IMC y la

circunferencia de la cintura en aquellos individuos más susceptibles genéticamente para estos fenotipos (CC). Sin embargo, se requieren más estudios prospectivos para caracterizar mejor estas modulaciones.

5.4.7 POLIMORFISMOS rs17020112, rs10863430, rs3748022, Y rs10863389 DEL GEN *IKKE*

En primer lugar, comentar que las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados difirieron bastante entre poblaciones. Puesto que es la primera vez que se estudian estos polimorfismos en humanos y no existe bibliografía al respecto nos hemos basado en la información del Hapmap para comparar. Así para el SNP rs17020112, las frecuencias alélicas halladas en nuestra población fueron similares a las reportadas en poblaciones según el Hapmap. Sin embargo, en asiáticos la frecuencia genotípica para el genotipo CC fue superior a la obtenida en nuestra población (12,5% vs 0,2%), también fue mas elevada la frecuencia alélica (0,33 vs 0,03). En población subsahariana y afroamericana la prevalencia de CC fue mayor a la nuestra pero menor a la asiática (5,4 y 4,5% respectivamente vs 0,2%).

La frecuencia alélica para el alelo menor del rs10863430 obtenida en nuestro estudio fue similar a la de otras poblaciones europeas, sin embargo al estudiar la frecuencia genotípica, la prevalencia del genotipo TT fue mayor en nuestra población que en otras poblaciones europeas (2,7% vs 0,9%). Respecto a otras razas, los asiáticos no presentaron frecuencia genotípica para TT y una frecuencia alélica muy baja (0,012 vs 0,16 en nuestra población) y en subsaharianos la frecuencia genotípica fue mayor (TT: 8,7%).

También hubo diferencias en la distribución genotípica para el polimorfismo rs3748022 entre etnias. La prevalencia de los genotipos hallada en nuestra población concuerda con la obtenida en población europea. La frecuencia genotípica para la variante mutada en población asiática fue mayor (TT 12,2%) y nula en población subsahariana en comparación con la obtenida en nuestro estudio (TT=4,6%)

Por último, la prevalencia de los genotipos del polimorfismo rs10863389 fue similar a la de poblaciones europeas y de nuevo diferente a la asiática (CC: 12,2%; CT: 43,9%; TT: 43,9%) y la subsahariana (CC: 2,7%, CT: 34,5%, TT: 62,8%) en comparación con la hallada en nuestra población (CC: 42,4; CT: 43%; TT: 14,6%). Diferencias en la variación genética entre diferentes es bien conocida, es por ello que en ocasiones se hace complicado las comparaciones con los fenotipos de interés.

El gen *IKKE* ha sido identificado como un gen diana para la obesidad recientemente por un estudio realizado en animales de experimentación (Chiang-

hey et al 2009). Sin embargo, hasta ahora no se han encontrado estudios que analicen la posible implicación de variantes genéticas en este gen con fenotipos relacionados con la obesidad en humanos. De ahí que uno de nuestros objetivos fuera seleccionar tag-SNPs en este gen para explorar posibles asociaciones con la obesidad y parámetros relacionados. Para ello, seleccionamos los SNPs, utilizando el Haploview y con unos criterios seleccionados (ver apartado de métodos). Tras seleccionar los SNPs, de los 4 polimorfismos estudiados obtuvimos asociaciones con parámetros antropométricos y de RCV en tres de ellos. Así, en el análisis de asociación encontramos asociaciones significativas del polimorfismo rs17020112 con IMC en la población general y en mujeres, de manera que los mutados presentaban un IMC significativamente superior que lo portadores de la variante ancestral. También obtuvimos una tendencia a la significación para la asociación entre los homocigotos mutados GG del rs10863430 y el mayor IMC, prevalencia de obesidad y mayor riesgo de obesidad tras ajuste multivariante. Además, para este polimorfismo encontramos una interacción gen-adherencia a la DM, de tal manera que el riesgo de obesidad para los GG era menor solamente cuando tenían una adherencia a la DM elevada.

Por último, los homocigotos mutados TT para el rs 10863389 presentaron mayor riesgo de diabetes y de síndrome metabólico que los CC+CT. El grupo que identificó este gen como posible diana terapéutica mostró que al comparar los ratones knockout con controles tras alimentarlos con una dieta alta en grasa, los knockout estaban protegidos contra la obesidad, la inflamación crónica en el hígado, la estatois hepática y la resistencia a la insulina. Además los ratones knockout presentaron un incremento en el gasto energético y la termogénesis (Chiang-Hey et al 2009). Es bien sabido que la obesidad es enfermedad crónica inflamatoria que aumenta la predisposición a desarrollar resistencia a la insulina y DMT2 (Shoelson, S.E et al 2009, Hotamisligil et al 2006, Wellen, K.E et al 2005). Por tanto, una hipótesis que podría ser formulada para explicar nuestros resultados es que variaciones en el gen *IKKE* podrían resultar en una menor expresión del gen *IKKE* y por tanto proteger frente a la obesidad y parámetros relacionados. Además lo individuos con alto consumo en grasas, procedentes del AOV y FS como es característico de la DM, haría que los individuos mas susceptibles genéticamente de desarrollar obesidad estuvieran protegidos. Sin embargo se trata de una información muy preliminar y es necesario seguir investigando variaciones genéticas en este gen en otras poblaciones así como los mecanismos por los cuales podría haber un link entre variaciones genéticas, expresión del gen y fenotipos de interés.

Respecto a la asociación encontrada con la DMT2 y el síndrome metabólico, ratones knockout para el gen *IKKE* también mostraron menor resistencia a la insulina y DMT2. Además varios estudios han indicado que la ruta metabólica del factor *IKK/ NF-κB* está implicada en la resistencia a la insulina y la inflamación

(Sriwijitkamol A et al 2006, Wunderlich, F.T et al 2008). De todos, modos el mecanismo que puede explicar esta asociación es todavía desconocido.

En conclusión, hemos encontrado una novedosa asociación entre variaciones en el gen *IKKE* y la obesidad, parámetros relacionados, DMT2 y síndrome metabólico confirmando que este gen podría tener implicación en el desarrollo de obesidad y otras enfermedades relacionadas. También la adherencia a la dieta mediterránea podría modular el riesgo de obesidad en aquellos individuos genéticamente más susceptibles. No obstante, hay que tener en cuenta las limitaciones de este estudio, como son la escasa prevalencia de algunos polimorfismos estudiados, además de que se trata de resultados muy preliminares y no estudiado hasta el momento en otras poblaciones. Por tanto mas información es necesaria para dilucidar los mecanismos que podrían estar detrás de estas asociaciones.

5.4.8 POLIMORFISMO -1131T>C y S19W DEL GEN *APOA5*

En primer lugar, en el estudio de prevalencia de los polimorfismos genéticos en la población mediterránea estudiada se vio que la frecuencia alélica de los polimorfismos del gen de la *APOA5* varía mucho entre etnias en los distintos continentes. Así, en el caso del polimorfismo del promotor de la *APOA5* el alelo -1131C es más prevalente en Indios comparado con personas de Reino Unido (20% vs 4%, $p=0,0001$) mientras que el alelo 19W es menos prevalente (3 % vs 6%, $P=0,0015$ respectivamente) (Chandak et al, 2006). La frecuencia alélica obtenida de la variante -1131 T>C en la población de estudio se enmarca adecuadamente con las frecuencias reportadas por el centro (6%) y el sur de Europa (8%) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, HapMap). En nuestro estudio la frecuencia alélica para el alelo C fue del 7 % lo que concuerda con el estudio llevado a cabo por Ribalta et al, (2002) en 408 individuos españoles así como por Dorfmeister et al, (2007) en 931 individuos europeos blancos donde la frecuencia alélica encontrada para el alelo C fue de 7%. No obstante, se observa que la frecuencia de esta variante es mas elevada en nativos americanos (18%), asiáticos (27% en chinos y 29% en japoneses) y en africanos (13%) que en poblaciones europeas (bases de datos del Pubmed). En el caso de la variante S19W, a diferencia del polimorfismo anterior, es más frecuente en poblaciones europeas que en otras poblaciones no europeas. Este polimorfismo fue genotipado en las dos poblaciones estudiadas. La frecuencia de la variante S19W encontrada en nuestro estudio fue de 6% (PREDIMED), 5,5% (INDIMED) similar a la encontrada en europeos (7%), Centro y sur de Europa (Martin et al, 2003) y diferente en indios americanos (3%) y afrocaribeños (4%) (Dorfmeister et al, 2007). Destacar, que debido al escaso tamaño de muestra en la población INDIMED, y la escasa frecuencia genotípica WW, en esta muestra, el equilibrio Hardy Weingberg fue significativo.

En cuanto a las asociaciones de estas variantes genéticas con fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular, el punto de partida más relevante que hemos analizado ha sido la posible asociación de los polimorfismos del gen de la *APOA5* y las concentraciones plasmáticas de triglicéridos en ayunas, ya que la literatura previa mostraba bastante consistencia en este sentido, además, el incremento de la concentración de triglicéridos en plasma es un factor de riesgo independiente para la enfermedad coronaria arteriosclerótica (Malloy et al, 2001). El gen de la *APOA5* es un gen candidato para el estudio de las enfermedades cardiovasculares por su implicación en el metabolismo lipídico, concretamente en el metabolismo de los triglicéridos, aunque todavía no se conoce bien su mecanismo de acción. El polimorfismo -1131T>C y S19W forman parte de diferentes haplotipos, *APOA5**2 (-1131T>C) y *APOA5**3 (S19W) donde tienen un efecto diana en el aumento de la concentración de TG (Pennacchio et al, 2002, Dorfmeister et al, 2007). Ello fue lo que les hizo interesante para ser incluidos en nuestro estudio. Estos dos polimorfismos estudiados en esta lipoproteína han demostrado en nuestro estudio, una asociación con los niveles plasmáticos de triglicéridos, al estudiar toda la población en su conjunto, aunque con algunas modulaciones, revelando pues un importante factor genético determinando las concentraciones de triglicéridos en esta población mediterránea de elevado riesgo cardiovascular. En el estudio aislado de estos polimorfismos, son los portadores del alelo menos común (-1131C) en el promotor de la *APOA5* los que presentan las mayores concentraciones de triglicéridos plasmáticos. Esta asociación de esta variante con la trigliceridemia está ampliamente respaldada por la bibliografía. Así, en el estudio de Talmud et al, (2002) que incluyó 2808 hombres caucásicos fue observada la asociación entre el alelo -1131C y la elevación de triglicéridos en plasma. En el estudio Framingham donde se estudiaron a 1129 hombres y 1262 mujeres los portadores de esta variante tuvieron mayores concentraciones de triglicéridos tanto en hombres como en mujeres (Lai et al, 2004), mientras que en nuestro estudio esta asociación se ha observado en la población general, no obstante hay que destacar que el tamaño de muestra era bastante superior. Asimismo, Pennacchio et al, (2002) analizó hombres y mujeres de diferentes grupos étnicos (848 caucásicos, 1392 afroamericanos, y 420 hispánicos) y observó que el impacto del polimorfismo -1131T>C fue más pronunciado en hispánicos que en caucásicos y no fue detectable en afroamericanos. No obstante, se ha llegado a sugerir que -1131T>C y el resto de polimorfismos integrantes de haplotipos *APOA5**2 faltan de funcionalidad y que las asociaciones encontradas, como en nuestro caso, reflejarían el hecho de que -1131 T>C es un marcador de variaciones funcionales del propio gen *APOC3* (Talmud et al, 2002).

Por otro lado, diversos estudios indican que los portadores de la variante 19W presentan cifras más elevadas de triglicéridos (Pennacchio et al, 2002, Pennacchio et al, 2001, Talmud et al, 2006, Lai et al, 2007). Así, un estudio con 902 mujeres diabéticas puso de manifiesto la asociación significativa entre la variante S19W y

los mayores niveles de TG en plasma ($P=0,001$) (Qi L et al, 2007). En este sentido, estudios llevados a cabo en caucásicos (1354 individuos de Alemania y 1770 procedentes de Austria) también muestran resultados similares, los portadores de 19W así como de -1131C tuvieron mayores niveles de TG y menores de HDL-C (Grallert et al, 2007). Al igual que los estudios anteriores, los resultados obtenidos en este estudio muestran mayores concentraciones de triglicéridos en los portadores del alelo mutado, pero sólo se llegó a alcanzar la significación estadística en el caso de los hombres (PREDIMED). Para el INDIMED, no encontramos diferencias significativas para las concentraciones de TG aunque los WW presentaban mayores concentraciones de CT y de LDL-C. No obstante, hay que tener en cuenta la limitación del tamaño de muestra. Resultados similares a los hallados en la población PREDIMED, fueron obtenidos por Dorfeister et al, (2007) en un estudio llevado a cabo en pacientes con diabetes tipo 2 en 931 europeos blancos, 610 indios asiáticos y 167 afrocaribeños. Comparando los homocigotos -1131T y 19S con los portadores de -1131C y 19W todos los grupos tuvieron concentraciones más altas de triglicéridos pero sólo fue significativa en el caso de -1131C en europeos ($P=0,04$) pero no en el caso de la S19W, donde solo fue significativa para los asiáticos. Tampoco se encontró asociación en 537 pacientes canadienses con enfermedad coronaria (Lee et al, 2004) ni en indios Pima en el estudio de Chandak et al, (2006) posiblemente debido, en este último caso, a la menor frecuencia alélica de este polimorfismo. No obstante, estudios de asociación genética tanto en población general como en hiperlipidemia familiar combinada muestran que la variante S19W confiere un incremento del riesgo de hipertrigliceridemia independiente y específicamente en estado de homocigosis. Además, es conocido que mutaciones en esta molécula pueden alterar la capacidad de unión de los receptores de las lipoproteínas. Así, S19W podría conferir en caso de los portadores de la variante 19W una incapacidad para la interacción con los receptores lipídicos.

También queremos destacar como resultado importante en el presente estudio la asociación significativa entre el polimorfismo del promotor de la *APOA5* y un menor peso corporal en los portadores de la variante mutada. En este sentido, existe un trabajo previo en el que se estudiaba la interacción entre los polimorfismos de la *APOA5* y el consumo de grasa en la dieta determinando el IMC y el riesgo de obesidad en los participantes en el estudio Framingham (Corella et al, 2007). En dicho estudio se encontró una interacción significativa entre el aporte de ácidos grasos monoinsaturados y el polimorfismo del promotor de la *APOA5* determinando el peso corporal, de forma que cuando la ingesta de AGM era alta (superior al 11% de la energía de la dieta), los portadores del alelo mutado (-1131C) tenían menor IMC que los homocigotos normales. Esta situación no ocurría con ingestas de AGM más bajas. En esta población mediterránea la ingesta media de AGM es claramente superior al 11% (superior al 16% como se indica en las tablas descriptivas de resultados), por lo que nuestros resultados de observar un

mejor peso en los portadores del alelo menos frecuente del promotor de la *APOA5* serían consistentes con esta referencia previa.

En este sentido también podríamos explicar la asociación entre menores concentraciones de HDL-C en los portadores del alelo mutado de los polimorfismos de la *APOA5*, aunque no hemos encontrado referencias previas que analicen dicha observación.

En cuanto a las interacciones gen-dieta las variantes del gen de la *APOA5* determinando fenotipos relacionados con el metabolismo de los triglicéridos, indicar que existen algunos trabajos previos donde se ha abordado su estudio. Así, en el primer trabajo de Pennachio et al, (2001) en el que publicaba por primera vez la asociación del polimorfismo de la *APOA5* con concentraciones de triglicéridos, ya se analizaba el efecto de varias dietas en una muestra de 501 individuos sanos caucásicos tras su dieta habitual y después de 4-6 semanas consumiendo dietas altas en grasa (35 a 46% de la energía) y baja en grasa (20 a 24% de la energía). Se llegó a la conclusión de que el efecto de los polimorfismos (SNP1, SNP2, SNP3 o -1131T>C) en el gen de la *APOA5* eran independientes de la dieta consumida, siendo los niveles de triglicéridos entre un 20-30% mayores en individuos portadores del alelo mutado que en individuos homocigotos para el alelo salvaje independientemente de la dieta alta o baja en grasa. En nuestro estudio, aunque de manera general hemos encontrado una asociación entre la media de TG de la población y los polimorfismos, cuando analizamos de manera más detallada los distintos grupos de dieta, observamos que en el cuartil más alto de adherencia a la dieta mediterránea, los portadores del alelo mutado del promotor de la *APOA5* no presentan el incremento de TG que se observa en los individuos agrupados en los cuartiles 1, 2 y 3 de dieta mediterránea. Asimismo, al estudiar los demás factores ambientales, también encontramos una modificación en las concentraciones de triglicéridos con el hábito tabáquico, de manera que los portadores de la mutación no presentaron significativamente mayores concentraciones de triglicéridos cuando presentaban la condición de no ser fumadores. A pesar de que no hay estudios que analicen interacciones de este polimorfismo con el hábito tabáquico, el tabaco se ha relacionado negativamente con las concentraciones de triglicéridos (Sola et al, 2001). Se trata pues de una observación novedosa que hay que replicar en posteriores estudios, y que de confirmarse podría resultar muy útil para los individuos que presentan los TG elevados por ser portadores de mutaciones genéticas en el promotor de la *APOA5*, ya que se conseguiría la normalización de dicho TG elevados siguiendo una dieta mediterránea unida a unos hábitos saludables como es no fumar.

No se han encontrado muchos estudios que estudien las interacciones entre genes y factores ambientales reportando asociaciones significativas. Entre ellos destacamos la publicación centrada en el estudio Framingham, donde se encontró una interacción gen-dieta significativa entre el polimorfismo -1131T>C y la ingesta

de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en relación a las concentraciones de lípidos en plasma y el tamaño de partículas de las lipoproteínas. Mientras que estas interacciones no se encontraron para el polimorfismo S19W. El alelo -1131C estuvo asociado con mayores niveles de triglicéridos en ayunas sólo en personas que consumían altas cantidades de AGPI (>6 %) sin diferencia de sexo (Lai et al, 2006). En dicho estudio también se analizó el origen de los AGPI, encontrando que los efectos nocivos en el metabolismo lipídico de elevadas concentraciones de AGPI en los portadores del alelo mutado se limitaban a los n-6 y no a los n-3.

Por otro lado, y en relación a la interacción gen-dieta comentada anteriormente entre los polimorfismos de la APOA5 y el peso corporal, otro estudio llevado a cabo por Aberle et al, (2005) en hombres hiperlipémicos tras seguir una dieta con restricción energética durante tres meses, los portadores del alelo -1131C tuvieron una pérdida significativa de peso (13,4%) mientras que no en homocigotos TT. No obstante, no existen muchos estudios más publicados que se centren en las interacciones entre la dieta y el polimorfismo -1131T>C y S19W. Aun así, estas interacciones necesitan de su replicación en otras poblaciones para aumentar su nivel de evidencia científica.

En cuanto a las modulaciones gen-ambiente reportadas para el polimorfismo S19W de la APOA5, encontramos que, si bien de manera general los portadores de la mutación presentaron mayores concentraciones de triglicéridos a pesar de no ser significativos, al estudiar de manera más detallada la práctica de actividad física aquellos que no eran sedentarios y portaban la mutación presentaron menores niveles de triglicéridos que los no portadores de la mutación y sedentarios. No se han encontrado estudios que analicen este efecto en dicho polimorfismo por lo que son necesarios más estudios que pongan de manifiesto este efecto si bien, son varios los estudios que han estudiado las variaciones del perfil lipídico con la práctica de actividad física (Boraita, 2004).

Por último, analizamos la concentración de APOA5 en suero y estudiamos si esta concentración dependía de los polimorfismos estudiados en el gen APOA5 en una submuestra de la población PREDIMED. Encontramos que las concentraciones de APOA5 estaban positivamente asociadas con las concentraciones de TG en la población general y en mujeres así como en sujetos con hipertrigliceridemia. Además, las concentraciones de APOA5 fueron menores en los sujetos portadores de C que en los TT mientras que fueron superiores en los portadores 19W que en los homocigotos SS. Es sabido que APOA5 juega un papel importante en la regulación de las concentraciones de TG. Varios estudios en modelos animales han sugerido que el mecanismo por el cual APOA5 podría tener un efecto en la disminución de TG es debido a la estimulación de la actividad de la lipoprotein lipasa (Schaap FG, et al 2004; Merkel M et al; 2005; Sotos-Prieto et al, 2010). Sin embargo, todavía no conclusiones definitivas sobre este mecanismo. El incremento observado en nuestra población de las concentraciones de APOA5 y las

concentraciones de TG podría indicar, tal y como se ha mencionado en otros estudios (Hyun YJ et al 2009; Henneman P et al, 2007), que la estimulación de la actividad de la lipoproteína lipasa no normaliza los niveles de TG en la hipertrigliceridemia. Correlaciones positivas de las concentraciones de APOA5 y los niveles circulantes de TG esta de acuerdo con resultados previos (Hyun YJ et al 2009; Henneman P et al, 2007; Schaap FG et al, 2006; Jang Y et al, 2009). Sin embargo, observaciones diferentes fueron halladas en población japonesa para la correlación entre APOA5 y TG en diabéticos (Ishihara M et al, 2005). En cuanto a las concentraciones de APOA5 en sujetos normolipidémicos sanos previas investigaciones han apoyado la correlación negativa entre APOA5 y TG (Hyun YJ et al, 2009; Ishihara M et al, 2005; Zhao SP et al 2007). En nuestro estudio también encontramos asociación interesante entre variaciones en el gen *APOA5* y la variación en la concentración de APOA5. En los individuos TT las asociaciones con la concentración de APOA5 están en la dirección opuesta a las concentraciones de TG siendo los portadores del alelo C aquellos que menores niveles de APOA5 presentaron. Ishihara et al, (2005) mostró, por primera vez, que el genotipo CC estaba significativamente asociado a menores concentraciones de APOA5. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios (Niculescu LS et al, 2010; Jang Y et al, 2009; Dallinga-Thie GM et al, 2006). Sin embargo, Talmud et al (2006) no encontró ninguna asociación entre el alelo -1131C y los niveles de APOA5. Se ha propuesto que el polimorfismo -1131T>C actúa como marcador genético para las variantes cerca del gen *APOC3*, por tanto su relación con las concentraciones de APOA5 es difícil de establecer. Un estudio reciente ha observado que bajas concentraciones de APOA5 en plasma podrían ser debidas, en parte a *APOC3* el cual regula la transcripción de los genes *APOA1/APOC3/APOA4* y hace que no se incremente la expresión del gen *APOA5* porque elementos Alu bloquearían su acción (Vu-Dac N et al, 2004). Por lo que respecta al SNP S19W y su relación con las mayores concentraciones de APOA5, otros estudios han hallado una asociación similar (Talmud PJ et al, 2006; Henneman P et al, 2007; Niculescu LS et al, 2010). Talmud PJ et al (2005) mostro que este SNP (variante que causa cambio de Ser por Trp) indicaba un cambio en la conformación de la proteína que influencia en un 50 % menos de eficiencia en la secreción de proteína comparando con la señal del péptido S19, lo cual resulta en menores concentraciones de APOA. Por esta razón, todavía no está claro la explicación de los efectos opuestos en la concentración de APOA5 y los portadores del alelo 19W.

En conclusión, hemos encontrado asociaciones significativas entre variaciones en el gen *APOA5* (-1131T>C y S19W) y las concentraciones de TG en la población PREDIMED, en el INDIMED la tendencia fue la misma pero la limitación del tamaño de muestra no permite establecer asociaciones significativas.

Encontramos interacciones gen-ambiente significativas para modular las concentraciones de TG en el polimorfismo -1131T>C en cuanto a la adherencia a la

DM y el tabaco. También las concentraciones de TG fueron diferentes en función de la susceptibilidad genética para el polimorfismo S19W en función de la actividad física. Por último, nuestro estudio muestra que las concentraciones de APOA5 están positivamente correlacionadas con las concentraciones de TG en la población general PREDIMED y en sujetos con hipertrigliceridemia, si bien son necesarios más estudios en humanos que ayuden a clarificar el papel funcional de la APOA5. También proporcionamos evidencia de que el -1131C está asociado con menores concentraciones de APOA5 y que el alelo 19W está asociado con mayores concentraciones de APOA5. Todavía son necesarios más estudios para que nos ayuden a explicar y a entender el mecanismo por el cual variaciones en este SNP se asocian con un defecto en la secreción de la proteína. Estudios futuros que analicen las interacciones gen-ambiente también ayudaran a establecer recomendaciones más personalizadas en función del genotipo.

5.4.9 POLIMORFISMO rs1799884 DEL GEN GCK

En cuanto a los polimorfismos elegidos por su novedad, la frecuencia alélica del alelo menor o menos común del polimorfismo rs1799884 (-30A>G), situado en la zona promotora del gen *GCK* hallada en nuestra población fue del 19%, similar a la obtenida en otras poblaciones europeas (20%). Sin embargo, la distribución genotípica encontrada en nuestra población (64,5% GG, 32,4% GA, 2,9% AA) fue distinta a la hallada en los residentes de Utah con ascendencia europea occidental y septentrional de la colección CEPH (67,8% GG, 23,7% GA, 8,5% AA). Esta colección comprende 11 poblaciones con una muestra de 1.301 muestras (incluida la original de 270 muestras utilizadas en la Fase I y II del Proyecto Internacional HapMap). En población de África sub-sahariana la frecuencia alélica del alelo menor es inferior a la reportada en nuestro estudio y en población europea (A: 11,7%). Además, en población asiática, concretamente en japoneses, no se encontró frecuencia genotípica para los homocigotos mutados. Los estudios de barrido genómico indicaron una asociación entre este polimorfismo y la glucemia o riesgo de diabetes. El polimorfismo rs1799884 (-30G>A) del gen *GCK* en nuestro estudio se asoció con glucemia en ayunas, si bien no se consiguieron valores significativos. Asimismo los individuos que presentaron la mutación en homocigosis presentaron menores concentraciones de triglicéridos tanto en hombres como en mujeres. Además, encontramos un riesgo elevado de diabetes tras ajustar por factores de confusión para los homocigotos mutados. Los estudios relacionados con dicho polimorfismo en el gen *GCK* muestran valores similares para el riesgo de diabetes (Vaxillaire et al, 2009), y también para la hiperglucemia (Vaxillaire et al, 2009; März et al, 2004; Rose et al, 2005) y el deterioro de la función de las células β (Vaxillaire et al, 2009; März et al, 2004; Rose et al, 2005; Yamada et al, 1997; Stone et al, 1996). Así, en una cohorte de 2576 hombres y 2636 mujeres participantes en el estudio longitudinal DESIR (Data from Epidemiological Study

on the Insulin Resistance Syndrome) el alelo -30A fue asociado con el riesgo de diabetes al final del estudio de seguimiento (OR ajustada: 1,34 [IC 95% 1,07-1,69] (Vaxillaire et al, 2009). Algunos estudios han reportado que el polimorfismo del promotor en el gen *GCK* influencia la producción específica de glucocinasa por las células beta lo que podría actuar en un incremento de hiperglucemia elevando la liberación de insulina estimulada por glucosa (Sparsø et al, 2009). Por otro lado, un estudio llevado a cabo en 3210 individuos en el estudio de Nutrición y Salud en población avanzada en China no encontró una asociación con el riesgo de diabetes para el alelo A mientras que sí para los mayores niveles de glucosa en ayunas y con un impedimento de la función de la célula beta estimada por el HOMA-B, lo cual coincide con el papel biológico del *GCK* en la secreción de insulina por las células beta (Qi et al, 2009).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo referentes al análisis de interacción gen-ambiente revelan, de manera general, una tendencia a la significación entre los niveles de glucosa en ayunas y el polimorfismo del promotor del gen *GCK*. En el análisis detallado de adherencia a la dieta mediterránea observamos que los portadores del alelo mutado en homocigosis en el cuartil más alto de adherencia a la dieta mediterránea no presentaron el incremento de glucosa que se observaba en los individuos agrupados en los cuartiles 1, 2 y 3 de dieta mediterránea. Esto revela una nueva interacción gen-dieta poniendo de manifiesto que la alta adherencia a la dieta mediterránea es capaz de modular las concentraciones de glucosa en los mutados para esta mutación por una mayor susceptibilidad genética. Sin embargo, no se observaron modificaciones para el resto de factores ambientales. Respecto a estos resultados no existe bibliografía que estudie la interacción de este polimorfismo con factores ambientales, por lo que dichas observaciones serían novedosas. No obstante, son necesarios más estudios que repliquen resultados similares para alcanzar una mayor evidencia científica.

5.4.10 POLIMORFISMO rs1260326 (P446L) DEL GEN *GCKR*

El polimorfismo rs1260326 fue genotipado en las dos poblaciones estudiadas. En el estudio de prevalencia del polimorfismo rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* la frecuencia alélicas para el alelo menor en el estudio PREDIMED fue de 45% y de 40,2% en el estudio INDIMED, similar a la reportada en europeos según el Hapmap (P=40%) y según el estudio prospectivo DESIR llevado a cabo en población francesa en 4833 individuos (43,9%) (Vaxillaire et al, 2008). En cuanto a la distribución genotípica hallada en población europea se han observado valores similares para los heterocigotos (50% según el Hapmap y 50.9% en PREDIMED y 54,5% en INDIMED) y algo diferentes para los homocigotos salvajes (35% Hapmap y 29.6% PREDIMED, 32,5% INDIMED) y para los homocigotos mutados (15% en el Hapmap y 19.5% en nuestro estudio). Mientras las frecuencias alélicas reportadas en población asiática fueron similares a la población europea

(P=44% y L=55%) en población afroamericana la frecuencia alélica del alelo menor fue notablemente inferior (L=16.7%) así como la frecuencia genotípica para los homocigotos mutados (8,3%). Algo similar se observó para la población África subsahariana, aunque en esta población no se encontró frecuencia genotípica para los homocigotos mutados.

Por lo que respecta al estudio de asociación de este polimorfismo con concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados se observó una clara asociación entre los portadores de la mutación y las mayores concentraciones de triglicéridos tanto en la población general como por sexo para la población PREDIMED, para el INDIMED se observó esta tendencia pero el escaso tamaño de muestra no permitió obtener diferencias significativas. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado por la bibliografía. Así, el estudio prospectivo DESIR estudió la asociación de este polimorfismo en 4833 individuos y observaron que los portadores de la mutación mostraron mayores niveles de triglicéridos (3.41%) durante los 9 años de estudio (Vaxillaire et al, 2008) y contrariamente también mostraron menor glucosa en ayunas (-1.43 %) y menores niveles de insulina (-4.23%). En nuestro estudio los portadores de la mutación también mostraron una tendencia en cuanto a los menores niveles de glucosa en ayunas. Asimismo estudios recientes derivados del estudio Iniciativa de la Genética de la Diabetes y estudios de asociación genética reportaron el polimorfismo intergénico rs780094 en el mismo gen explicando variaciones interindividuales en las concentraciones de triglicéridos. (Saxena et al, 2007, Tam et al, 2009; Orho-Melander et al, 2008, Sparsø et al, 2009). Este polimorfismo se encuentra en fuerte desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo estudiado en este estudio; rs1260326 (P446L). Orho-Melander y sus colaboradores comunicaron recientemente, en un estudio de mapeo genético, una fuerte señal de este polimorfismo con las mayores concentraciones de triglicéridos. ($P=1,5 \times 10^{-9}$) y con menores asociaciones con la glucemia en ayunas y la sensibilidad a la insulina (Orho-Melander et al, 2008). En nuestro estudio tampoco encontramos fuertes asociaciones con los niveles de glucosa pero sí con las concentraciones de triglicéridos aunque nuestro tamaño de muestra fue inferior al estudiado en otros estudios. A pesar de la alta asociación con las concentraciones de triglicéridos, no se encontraron asociaciones con otros parámetros lipídicos como el HDL-C, HDL-C y CT al igual que ocurre en otros estudios (Vaxillaire et al, 2008).

Los mecanismos que explican los efectos opuestos en cuanto a las concentraciones de triglicéridos y niveles de glucosa en ayunas permanecen todavía por ser bien definidos. Una explicación potencial es el efecto opuesto y primordial de la utilización del incremento de glucosa y el flujo glicolítico en el metabolismo lipídico y glucídico en el hígado. Con el incremento de la utilización de glucosa y el flujo glucolítico, la fosfoenol piruvato carboxilasa y la glucosa 6 fosfato son desreguladas, mientras que el *GCK*, fosfofructokinasa y la síntesis de

ácidos grasos son reguladas. Estos cambios incrementan la síntesis de glucógeno y las concentraciones de malonil CoA y acyl coA en la lipogénesis de novo y la producción de VLDL-TG (Gerich., 1993).

Es tentador proponer que la variante P446L sustituya un residuo conservado entre los mamíferos y que podría ser el causante de la variante. Sin embargo, un estudio anterior que había estudiado la sensibilidad de los mutados GCKR-L446 a la fructosa 6 fosfato y 1-fosfato, utilizando ratas *GCKR*, no informó de ningún efecto en comparación con la proteína de tipo salvaje (Veiga-da-Cunha et al, 2003). Las características diferenciales entre humanos y ratas *GCKR* (Brocklehurst et al, 2004) podría haber enmascarado una consecuencia funcional de la variante L446, o si actúa en distintos sitios u otra proteína diana permanece por ser dilucidado. Otra alternativa propuesta sería que otros SNPs pudieran estar relacionados ya que la variante P446L se encuentra en un gran bloque haplotipo que cubre por lo menos 400 Kb de secuencia genómica (www.hapmap.org).

Basado en modelos animales tales como la sobreexpresión mediada por adenovirus de *GCK* hepático o *GKR* en ratones con dieta (Slosberg et al, 2001) que induce diabetes; una mayor actividad del *GCK* resulta en una mejora de la interacción con el *GCK*, conduciendo a una liberación mas eficiente de enzima *GCK* con el subsecuente efecto beneficioso en el metabolismo de la glucosa y por otro lado con el efecto concomitante en la alteración del perfil lipídico. Además, la expresión de *GCKR* es más alta en el hígado, de manera que el incremento de triglicéridos podría ser secundaria al incremento del metabolismo de la glucosa causado por un incremento en la actividad de la *GCKR*. De este modo, y teniendo en cuenta los estudios con modelos animales, sería esperable también un incremento de la *GCK*, así, un incremento del flujo glicolítico aumenta, como se ha especificado antes, los niveles de glicerol 3 fosfato y molonil Co-A.

Por otro lado y por lo que respecta al estudio al estudio de interacción gen-ambiente, de manera general, observamos significativamente mayores niveles de TG en los heterocigotos y homocigotos mutados del polimorfismo del *GCKR*. Al analizar las posibles modulaciones por los factores ambientales estudiados, obtuvimos resultados significativos para la adherencia a la DM, de manera que los portadores de la mutación, en el cuartil mas alto de adherencia a la DM no presentaron el incremento de TG que se observaba en los individuos agrupados en los cuartiles 1, 2 y 3 de DM en la población PREDIMED. Aunque en la población INDIMED no se obtuvieron resultados significativos para la diferente adherencia a la DM y las distinta respuesta en las concentraciones de TG en función del genotipo, si que se observó la misma tendencia que en el PREDIMED. Además, en el estudio de intervención INDIMED, encontramos que tras las 10 semanas de intervención los individuos en el grupo de DM que tenían el genotipo de riesgo para las concentraciones de TG presentaban menor aumento en las concentraciones de TG que los PP+PL. Para nuestro conocimiento esta es la primera vez que se ha

estudiado la influencia de la DM y el riesgo genético de P446L en las concentraciones de TG (Sotos-Prieto et al, 2011). Perez-Martinez et al (2009) estudió la respuesta postprandial de los TG a la ingesta de grasa y encontró que los sujetos con el alelo de riesgo tenían mayores concentraciones de TG en ayunas, hipertrigliceridemia y TG postprandiales. Otro estudio de intervención encontró resultados consistentes con el grupo Perez-Martinez et al, 2009 (Shen H et al, 2009). Estos resultados podrían apoyar nuestros resultados en el sentido de que el perfil de AG de la dieta podría modular la susceptibilidad genética a presentar concentraciones de TG más elevadas. Un alto contenido en AGS podría tener un efecto negativo para los portadores del alelo L en las concentraciones de TG, mientras que la grasa procedente de AOV y FS (característica de la DM) podría modular este riesgo.

Por otro lado, en el estudio PREDIMED hemos encontrado asociaciones conjuntas significativas para la modulación de las concentraciones de TG en función del genotipo y el consumo de AOV, verduras, FS, y el bajo consumo de carnes y derivados y bebidas azucaradas. Son bien conocidos los efectos beneficiosos de la DM en el metabolismo lipídico y otros parámetros (Sotos-Prieto M et al 2010). Sin embargo, como hemos citado anteriormente no existe todavía bibliografía disponible que hayan analizado los componentes dietéticos y la dieta en su conjunto para modular el riesgo genético en las concentraciones de TG del polimorfismo P446L en el gen *GCKR*.

En conclusión, hemos encontrado que el SNP P446L en el gen *GCKR* está estadísticamente asociado con las concentraciones de TG en la población mediterránea PREDIMED replicando estudios previos. Además, hemos encontrado, por primera vez, que el patrón de adherencia a la DM podría modular los efectos del SNP P446L en las concentraciones de TG. También hemos identificado los principales ítems de la dieta MD que ejercen este efecto beneficioso en las concentraciones de TG (alto consumo de AOV, FS, verduras, y bajo consumo de carne, mantequilla y bebidas azucaradas). Nuestros resultados sugieren que la adopción de una DM podría ayudar a disminuir las concentraciones de TG, especialmente entre los más susceptibles genéticamente. Sin embargo, se requieren más estudios que analicen patrones dietéticos para establecer mejor recomendaciones personalizadas.

5.4.11 POLIMORFISMO rs6950982 (P446L) DEL GEN DE LA *SERPINE1*

En cuanto a los polimorfismos elegidos por su novedad, la frecuencia alélica del polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1* hallada en nuestra población fue del 22%, similar a la obtenida en otras poblaciones europeas (22,5%). Sin embargo, la distribución genotípica encontrada en nuestra población (60,5%AA, 34,2%AG, 5,2%GG) fue distinta a la hallada en 30 individuos caucásicos no relacionados (72,2%AA, 9,1%AG, 18,2%GG) y a la encontrada en muestra de 30

tríos de madres, padres e hijos residentes en el estado de UTA, EEUU con ancestros del norte y este de Europa en población europea (55%AA, 45%AG, 0%GG). La frecuencia alélica fue superior en población europea que en poblaciones asiáticas (8,9%) o África subsahariana (2,5%). Los estudios de barrido genómico indicaron una asociación entre este polimorfismo y la tensión arterial. El polimorfismo rs6950982 situado cerca del gen de la *SERPINE1* en nuestro estudio ha sido asociado con la presión arterial sistólica sólo en hombres. Sin embargo, hemos encontrado asociación significativa con variables relacionadas con lípidos. Así, encontramos una asociación significativa para los homocigotos de la variante mutada con los mayores niveles de triglicéridos tras ajustar por sexo y edad. Aunque esto no se observó entre sexos, los hombres homocigotos mutados también tuvieron mayores niveles de colesterol total y HDL-C. La mayoría de los estudios relacionados con variantes en el gen de la *SERPINE1* se han centrado en el estudio del polimorfismo del promotor 4G/5G ubicado a -675 pb del sitio de la transcripción el cual induce variaciones en la expresión génica alterando los niveles de PAI-1 en la circulación. También se ha considerado al polimorfismo 4G/5G del PAI-1 como un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares en la población general (Kohler et al, 2000). En un estudio de casos y controles encontraron una asociación del polimorfismo 4G/5G del PAI-1 con el perfil de lípidos en el grupo de controles, donde los portadores del genotipo 5G/5G presentaron niveles más altos de colesterol total, triglicéridos y VLDL-c, y de manera general un mayor perfil aterogénico (Ruiz-Quezada et al, 2005). Una posible explicación molecular de la interacción entre lípidos y el polimorfismo 4G/5G, es el elemento de respuesta a VLDL (VLDLE) ubicado a un lado del polimorfismo 4G/5G, ya que probablemente la proteína represora que se une al genotipo 5G/5G sea un factor transcripcional que promueve la expresión de VLDL-c. Esto explicaría el hecho de que el genotipo 5G/5G se asocie con niveles altos de VLDL-c, TG y CT, mientras que el genotipo 4G/4G presente niveles disminuidos (Kohler et al, 1998; Eriksson et al, 2000). No obstante, hay estudios anteriores que obtuvieron resultados contradictorios ya que el alelo 5G reduce la actividad transcripcional y la producción de fibrinógeno, por lo que en principio podría considerarse un cambio favorable. Los portadores del genotipo homocigoto 4G/4G tienen cifras de PAI-1 superiores a las del 5G/5G, y una capacidad fibrinolítica del plasma reducida. Como se desprende de los estudios de asociación, los portadores del alelo 4G serían más propensos a padecer la enfermedad coronaria (Kohler et al, 2000 y Ye et al, 1995) aunque las conclusiones del estudio ECTIM (Ye et al, 1995) han sido negativas. Esto pone de manifiesto las posibles interacciones gen-ambiente que hacen que los efectos de los polimorfismos puedan ser distintos. En este sentido, un estudio llevado a cabo por Perez-Martinez et al, (2008) en 59 voluntarios donde todos recibieron una alimentación de estabilización de cuatro semanas rica en grasa saturada y tras ésta se suministró, de forma aleatorizada y cruzada, una alimentación típica Mediterránea rica en gasa monoinsaturada y otra

pobre en grasa, y rica en hidratos de carbono se observó que los portadores del alelo 4G (4G/4G y 4G/5G) mostraron una disminución de las concentraciones de PAI-1 tras la dieta rica en AGMI comparado con la dieta rica en AGS y alta en carbohidratos. Los homocigotos para el alelo 5G mostraron cifras más bajas de PAI-1, independientemente de la alimentación recibida. Esto evidencia una interacción gen-dieta para los portadores del alelo 4G, los cuales son hiperrespondedores a la presencia de AGMI.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo referentes al análisis de interacción gen-dieta revelan, de manera general, una asociación entre la media de TG de la población y el polimorfismo del gen de la *SERPINE1*; en el análisis detallado observamos que los portadores del alelo mutado en homocigosis en el cuartil más alto de adherencia a la dieta mediterránea no presentaron el incremento de TG que se observaba en los individuos agrupados en los cuartiles 1, 2 y 3 de dieta mediterránea. En el estudio más detallado, teniendo en cuenta el consumo alto o bajo de aceite de oliva se observaron resultados similares para los portadores del alelo mutado en homocigosis del polimorfismo rs6950982 del gen de la *SERPINE1*. Además, los portadores del alelo mutado en homocigosis en la categoría de mayor consumo de aceite de oliva, tuvieron significativamente menores valores de PAD que los homocigotos normales y heterocigotos en la misma categoría. Se trata pues de una observación interesante que pone de manifiesto que el seguimiento de una estricta dieta mediterránea puede tener efectos beneficiosos para los portadores del alelo mutado determinando las concentraciones de triglicéridos. Además, estos resultados sugieren que el aceite de oliva es un componente fundamental de la dieta mediterránea para la reducción de los triglicéridos y de PAD en los mutados recesivos. Sin embargo, debido a la novedad de este polimorfismo y también su asociación con parámetros lipídicos, es necesario la replicación en posteriores estudios.

En nuestro trabajo se ha visto implicado el polimorfismo rs6950982, además de con la presión arterial sistólica en hombres, con los niveles lipídicos. No obstante hay que tener en cuenta que este polimorfismo es intergénico y que por tanto es necesario la realización de más estudios que indiquen la funcionalidad de este polimorfismo sobre los genes responsables y que puedan explicar los resultados obtenidos. Además se requiere la replicación de estos resultados en otros estudios así como estudios de posible modulación genética por factores ambientales que contribuyan al conocimiento científico.

Un inconveniente metodológico que tiene la población analizada para el estudio de las asociaciones e interacciones gen-dieta, es que al tratarse de una población de alto riesgo cardiovascular reclutada en centros de Atención Primaria, posee información sobre sus analíticas y sus factores de riesgo cardiovascular. Este conocimiento, y el hecho de recibir asistencia sanitaria continuada por su médico de atención primaria puede influir alterando las asociaciones genotipo-fenotipo-

dieta. Es decir, si una determinada variante genética ejerce influencia determinando las concentraciones de lípidos, al detectarse éstas elevadas en una analítica rutinaria, el médico puede aconsejar cambios dietéticos, así como tratamiento farmacológico para normalizar las concentraciones o fenotipos alterados, minimizando las asociaciones observadas. Este hecho ha sido tenido en cuenta en los análisis estadísticos realizados y en las interpretaciones de los resultados obtenidos.

5.2 DISCUSIÓN DE LA PERCEPCIÓN DEL SABOR Y LAS PREFERENCIAS ALIMENTARIAS EN LA POBLACIÓN INDIMED Y SUS PRINCIPALES ASOCIACIONES. ESTUDIO GENÉTICO DEL SABOR

5.2.1 PERCEPCIÓN DEL SABOR, CONSUMO DE ALIMENTOS Y SU ASOCIACIÓN CON VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS.

La percepción del sabor amargo en nuestro estudio INDIMED ha sido medida mediante un test de sabores a través de dos compuestos, el PTC y el PROP. En nuestra población consideramos agrupar como catadores, catadores medios y no catadores para la concentración mas alta (5,6 mM) basándonos en la descriptiva inicial de las puntuaciones así como en la bibliografía (existe gran diversidad en cuanto a las concentraciones utilizadas, tema que se discutirá mas adelante). El porcentaje de no catadores fue de 43,5% (PTC) y 41,5% (PROP), catadores medios 37,4% (PTC) y 35,8% (PROP) y super catadores de 28,7% (PTC) y 22,8% (PROP). Según la bibliografía aproximadamente el 70% de los Caucásicos del Oeste de Europa son considerados como catadores mientras que el 30% como no catadores (Guo SW y Reed DR, 2001). Bartoshuk et al, (1994), mostraron que este grupo de catadores podía ser dividido en no catadores, catadores medios, supercatadores (30-50-20% respectivamente). En nuestra población esta tendencia coincide con los supercatadores aunque es más alta para los no catadores y mas baja para los catadores medios. Es difícil establecer unos porcentajes porque pueden variar con la edad, el sexo, la etnia etc. Además, como se ha citado anteriormente, los métodos usados para medir la percepción al sabor amargo varía entre estudios y esta falta de estandarización es una limitación importante para comparar los resultados de diferentes estudios (Zaho L et al, 2003, Tepper BJ et al, 2001). En nuestro estudio, hemos utilizado papel de filtro impregnado en estas sustancias tal y como Zhao. L et al, (2003) utilizaron en su estudio para identificar a catadores, catadores medios y supercatadores. Utilizando esta metodología, este grupo identificó un porcentaje de no catadores, catadores medios y supercatadores de 27%, 42%, and 31% respectivamente. En nuestra población todavía sigue siendo

mayor el porcentaje de no catadores, pero hay que tener en cuenta que la categorización utilizada no fue la misma ya que partimos de diferentes concentraciones.

En cuanto al consumo de alimentos en función de ser no catador, catador medio o supercatador, se ha hipotizado que a los catadores no les gusta el sabor amargo y por tanto evitan el consumo de alimentos con compuestos amargos tales como las verduras crucíferas mientras que los no catadores preferirían tales sustancias.

En nuestra población no encontramos diferencias de consumo de verduras amargas en función de la percepción al PTC/PROP lo que coincide con algunos estudios realizados en jóvenes universitario y en mujeres de edad avanzada (Tepper BJ et al 2009) donde no se encontraron diferencias entre catadores y no catadores en cuanto a las preferencias o la ingesta de vegetales amargos. (Drewnowski A et al 2007). Sin embargo, existen controversias al respecto porque otros artículos de investigación mostraron, que en mujeres jóvenes o mujeres con cáncer de pecho, las supercatadoras mostraban menor preferencia por coliflor, espinacas, que los no catadores (Drewnowski A et al, 2000 y Drewnowski A et al, 1999). Dinehart et al, (2006) mostraron, usando un modelo estructural que consideraba múltiples variables simultáneamente que la mayor sensibilidad al PROP predecía menores preferencias por las crucíferas y otros vegetales de hoja verde y por tanto, menor frecuencia de consumo. Sin embargo, la edad, también era un predictor para estas preferencias. De hecho, varios estudios han observado que en niños preescolares existe esta concordancia (Tsuji M et al 2011; Bell KI and TepperBJ, 2006). En nuestra población no encontramos diferencias en cuanto al sexo ni la edad para la percepción del sabor amargo ni la elección de tales alimentos, sin embargo, y discrepando con la bibliografía que apoya la relación del PROP y las preferencias por compuestos amargos, nosotros encontramos que los no catadores daban mayor puntuación a la preferencia al sabor amargo.

En cuanto a la relación entre el PTC/PROP y el consumo de bebidas amargas, en nuestra población se observó como los supercatadores para el PTC consumían significativamente menos bebidas amargas (vino, cerveza, tónica) que los no catadores. Para el PROP, a pesar de no ser significativas las diferencias también se observó la misma tendencia. En este sentido, existen estudios que apoyan que los catadores perciben más el amargo de la cerveza (Intranuovo et al, 1998) así como la irritación del alcohol y el vino (Duffy VB et al, 2004A, Pronin AN et al, 2007, Hayes JE et al, 2011), sin embargo no está clara la relación entre el estatus del PROP y la ingesta de alcohol (Duffy VB 2004B).

El status del PROP ha sido también asociado con mayor percepción de la intensidad de otras sensaciones orales incluyendo el dulce (Yeomans MR et al, 2007). En nuestra población no encontramos ninguna correlación. Otros estudios:

han mostrados resultados contradictorios, sobre todo en poblaciones mas jóvenes por lo que la relación, hasta ahora, no está clara (Mennella JA et al 2005).

En nuestro estudio también analizamos la percepción del sabor dulce, umami, ácido y salado y el consumo y las preferencias alimentarias. No encontramos diferencias significativas salvo para el dulce, donde los supercatadores tendían a comer menos dulces (chocolate). Es bien sabido que el sabor dulce es un factor muy potente e influyente en la aceptación de la comida. Sin embargo, son pocos los estudios que se han centrado en evaluar su percepción y el consumo de alimentos (Bachmanov AA et al 2011). La mayoría de los estudios se centran en las variaciones genéticas relacionadas con este sabor y aceptación alimentaria

Por otro lado, en cuanto a la relación entre la percepción del sabor amargo (PTC/PROP) y el peso corporal también, existe una alta controversia. En nuestro estudio encontramos mayor circunferencia de la cintura en los supercatadores para el PROP (5,5mM). Además, al analizar la variable de percepción del sabor como continua, observamos que los obesos daban mayor puntuación a la percepción del sabor amargo que los no obesos. Algunos estudios indican que la percepción del sabor amargo está asociado con el IMC pero sólo en mujeres de tal manera que los no catadores tienen un mayor IMC que los medios catadores o los supercatadores (Tepper BJ et al 2008). De igual modo, las mujeres no catadores tuvieron mayor circunferencia de la cintura que los no catadores (Tepper BJ etl 2008 B) lo cual iría en contra de los resultados de nuestro estudio. Se ha hipotizado que el mayor IMC en aquellos individuos que mas perciben el sabor amargo podría estar relacionado a que estos individuos descartarían el consumo de alimentos amargos, principalmente verduras y consumirían mas otro tipo de alimentos. Sin embargo dicha relación no está clara ya que en el consumo de alimentos intervienen muchos factores como son los culturales, la educación, etc lo que podría explicar poca consistencia entre los resultados.

Para el resto de sabores, observamos que las personas con sobrepeso y obesidad presentaban mayor puntuación a las concentraciones extremas para el sabor salado. Respecto al sabor umami, no encontramos diferencias significativas entre normopeso, sobrepeso y obeso para las puntuaciones a la percepción de dicho sabor, solo para mujeres y en el borde de la significación. Algunos estudios han intentado diferenciar la percepción del sabor salado y el umami porque puede llegar a confundirse, pero no hemos encontrado artículos que hablen directamente de la percepción del sabor salado y la obesidad. Investigaciones recientes ponen de manifiesto que mujeres obesas requerían mayores concentraciones de monosodio glutamato para detectar el sabor umami. Sin embargo, su percepción y su habilidad para discriminarlo de la sal eran similares a lo normopeso (Pepino MY et al 2010). Aunque en nuestro estudio no hemos obtenido resultados significativos para la percepción del sabor umami y el consumo de alimentos, investigadores del grupo de Russell Keast de, descubrieron que la sensibilidad a este sabor no es la misma

en todas las personas. Y también comprobaron que aquellas personas que demostraron más sensibilidad tenían tendencia a ingerir menos grasas y eran más delgadas y viceversa: las que tenían menos sensibilidad al umami tomaban más grasas y sufrían más sobrepeso. Hay que tener en cuenta que el tamaño de muestra de este estudio es pequeño y puede limitar el obtener resultados significativos. No obstante, todavía no está clara la relación existente entre la percepción del umami, la obesidad y el consumo de alimentos.

5.2.2 ESTUDIO GENÉTICO DEL SABOR

Para el estudio genético del sabor analizamos tres polimorfismos en el gen del receptor del sabor amargo *TAS2R38*. Las frecuencias alélicas obtenidas para los polimorfismos estudiados fueron similares a las de otras poblaciones europeas. Si bien la distribución genotípica fue un poco superior para el genotipo II (36,2%) (V296I), VV (35,2%) (A262V), AA (43%) (P49A) a la estudiada en europeos (33%). Las frecuencias genotípicas para estos genotipos son inferiores en poblaciones asiáticas que en caucásicos o sur americanos (Khataan NH et al, 2009).

Al examinar la relación entre el genotipo y la percepción del sabor amargo (PTC/PROP), existe una clara asociación entre la percepción del sabor amargo y los factores genéticos, de tal manera que los individuos con el genotipo 49P, A262, V296 presentaron una puntuación significativamente mayor al PTC y PROP para las concentraciones 0,56mM, 1,8mM, 5,6 mM para el PTC y 1,8 y 5,6 mM en el caso del PROP. De este modo, los individuos con el genotipo PAV fueron definidos como catadores (mayor percepción del sabor amargo) y por el contrario, los del genotipo AVI como no catadores (o no sensibles para la percepción del sabor amargo). La bibliografía existente coincide claramente con esta asociación. En la actualidad parece clara la asociación entre la percepción del sabor amargo y los factores genéticos tanto en diferentes etnias como en hombres y mujeres (Khataan NH et al, 2009, Tepper BJ et al, 2009). En nuestro estudio también se encontraron estas asociaciones al estratificar por sexo y por edad (>44 años y <44 años). Con la edad (Mennella JA et al, 2010) disminuye la habilidad para percibir el sabor pero los factores genéticos para la percepción del sabor amargo mediante los compuestos analizados continúan siendo significativos en nuestra población.

Si se examina además el genotipo y el consumo de alimentos, en la muestra estudiada solo obtuvimos diferencias en el consumo de café. Aquellos con el genotipo PAV (supercatadores) tuvieron un mayor consumo de café que los individuos con el genotipo AVI. No se obtuvieron diferencias de consumo para vegetales amargos ni otros alimentos. Algunos estudios se han centrado en analizar la influencia del PROP estatus y la percepción de diversas sustancias amargas de algunos alimentos. Se ha visto como los supercatadores perciben más el café y el chocolate negro que los no catadores pero no se han encontrado diferencias con el

consumo de estos alimentos (Tepper BJ et al 2009). Lo que observamos fueron diferencias significativas en el consumo de energía, de tal manera que los individuos con el genotipo AVI tuvieron un consumo de energía superior a los individuos con el genotipo PAV. De acuerdo con nuestros resultados, un estudio llevado a cabo por Tepper et al, (2008) concluyó que el genotipo AVI/AVI en mujeres, tenían una ingesta energética superior. En este estudio también observaron que a pesar de tener una ingesta energética más alta también había una asociación con una dieta más saludable. Esto indica que aunque las mujeres AVI/AVI están consumiendo más energía que PAV/AVI o PAV/PAV sus elecciones son más saludables. En nuestro estudio no pudimos observar diferencias de consumo de alimentos ni elecciones más saludables, en cambio observamos que tras el periodo de intervención, y tras ajustar por factores de confusión, los individuos con el genotipo AVI tuvieron una disminución de peso mayor que los individuos con el genotipo PAV. Así como la relación entre el genotipo-fenotipo está bastante clara, la asociación con el consumo de alimentos es más controvertida. Se han observado diferencias en las preferencias alimentarias en función del genotipo en estudios llevados a cabo en niños (Duffy VB et al, 2010, Tepper BJ et al, 2009), sin embargo, en adultos tales asociaciones no están claras (Gorovic N et al, 2011, Ooi SX et al, 2010, Timson NJ et al, 2005) y a pesar de que con el estatus de catador variables como la edad y sexo puedan influir en las preferencias alimentarias esta asociación con el genotipo es menos importante (Feeney E et al, 2010). En conclusión, hasta ahora, se ha identificado *TAS2R38* como un marcador genético que exhibe variaciones fenotípicas en la percepción del sabor amargo destacables en humanos. Los factores genéticos son un componente más en la elección de alimentos pero la influencia de otros factores ambientales tales la cultura, la educación previa etc contribuyen de manera importante en la ingesta de alimentos, haciendo que esta diferencia sea más destacada en gente adulta que en niños. Esta podría ser una de las razones por la cual las asociaciones con el consumo de alimentos no estén claras y se necesiten estudios más completos, que consideren otras variables para poder distinguir y dilucidar el peso de los componentes implicados en la elección de alimentos.

En cuanto a la asociación entre los polimorfismos en el gen del receptor de sabor amargo *TAS2R38* y el resto de sabores, en nuestra población encontramos una asociación entre el polimorfismo A262V y la puntuación al sabor dulce de manera que los portadores de V presentaban una mayor sensibilidad al sabor dulce. Como se comentó anteriormente, existen algunos estudios que indican que los supercatadores para el PROP perciben con mayor intensidad soluciones de sacarosa (Yeomans MR et al, 2009). Los individuos con el genotipo VV también son más sensibles a la percepción del sabor amargo (PTC/PROP) lo que podría tener una relación la capacidad de tener mayor sensibilidad a discriminar las soluciones de sacarosa. Sin embargo, la asociación genética en el gen *TAS2R38* y la percepción del sabor dulce ha sido menos estudiada. Un estudio llevado a cabo por Manella JA

et al, (Manella JA et al, 2005) en niños y madres, observó que no había correspondencia entre los genotipos del *TAS2R38* y la preferencia del dulce en adultos aunque sí en niños. Esto sugiere que las fuerzas culturales y la experiencia podrían superar al efecto del genotipo en la preferencia por el dulce. Otros estudios evaluando el factor genético en la percepción del sabor dulce observó que variaciones en las subunidades *TAS1R2* y *TAS1R3* no se correlacionaron con el sabor dulce, en cambio variaciones en el gen *TAS1R3* estaba asociado con la disminución de la sensibilidad al azúcar (Mainland JD y Matsunami H, 2009). Son necesarias más investigaciones para obtener más información acerca del factor genético en la percepción del sabor dulce y su posible relación con otros fenotipos.

En nuestro estudio no obtuvimos ninguna relación entre los polimorfismos estudiados y la percepción de otros sabores. Un estudio reciente investigó que el polimorfismo R757C en el gen *TAS1R3* estaba correlacionado con variaciones en la percepción del sabor umami (Chen QY et al 2009). Este sabor ha despertado el interés de muchos científicos por lo que investigaciones futuras aportarán más información acerca de la relación de este sabor no sólo con el componente genético sino también con el consumo de alimentos y su relación con la obesidad.

5.6 DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE EXPRESIÓN EN LA POBLACIÓN INDIMED

5.6.1 ADN POLIMERASA K (*POLK*)

Estudios epidemiológicos han sugerido un efecto protector del aceite de oliva y otros componentes de la Dieta Mediterránea en la salud cardiovascular (Trichopoulou et al., 2000; Covas et al., 2007). Tras el consumo del aceite de oliva se ha observado una disminución de la concentración del 8-oxi desoxiguanosina, considerado un marcador sistemático de la oxidación del DNA (Fito et al 2007). De este modo, sería lógico hipotizar que el consumo de AOV pudiera regular la expresión de los genes reparadores del DNA. Un estudio reciente sugiere un posible papel protector de un gen involucrado en la reparación del ADN, concretamente el *POLK* (DNA polimerasa K) en la reparación por escisión de nucleótidos en mamíferos (Ogi et al., 2006) (Imadome, K et al 2008). Más tarde una investigación llevada a cabo por Konstantinidou et al 2010 en un estudio de intervención con dieta mediterránea más suplemento de aceite de oliva con diferente contenido en polifenoles, observaron que el consumo de DM disminuía la expresión de *POLK* en células mononucleares de la sangre. *POLK* es un gen reparador del daño del ADN que copia moldes de ADN no dañado. Mutaciones somáticas promovidas por la oxidación del ADN son consideradas un paso crucial

en la carcinogénesis al igual que en el proceso arterosclerótico (Bogani P et al 2007, Rough J et al 2009, Kunkel, T et al 2003).

Así, Konstantinidou et al 2009, observaron un aumento de la expresión de un gen involucrado en la reparación del DNA, concretamente el DNA polimerasa K (*POLK*) tras 6 horas de post intervención con 50 ml de aceite de oliva virgen (fold change 1,44).

Los resultados hallados en nuestro estudio están en concordancia con el de Konstantinou et al 2010 llevado a cabo en un estudio de intervención y con los resultados del EUROLIVE (Machowetz, A., et al 2007) en el que encontraron una disminución de la expresión del *POLK* y del daño de oxidación del ADN con una intervención de DM y AOV. Esto sugiere que el contenido en AGMI así como otros componentes menores del aceite de oliva, como el contenido en polifenoles, podrían tener un papel protector en la oxidación y daño del ADN.

Por tanto, los resultados derivados de nuestro estudio confirman el papel protector del AOV en el contexto de una DM y además del consumo de FS y ambos dentro de una alta adherencia a la DM. Así, se puede derivar que el seguimiento de una DM rica en AGMI y polifenoles así como otros componentes puede ser una herramienta útil en la prevención del daño celular y por tanto de la arterosclerosis

5.6.2 SIRTUINA 1 (*SIRT1*)

Las sirtuinas son proteínas desacetilasas NAD dependientes que han ganado una considerable atención durante los últimos años por su potencial papel en el tratamiento de algunas enfermedades asociadas con arterosclerosis, obesidad y también, mayormente estas proteínas han sido asociadas con la longevidad (Frye; 1999, Crujeiras et al, 2008; Yu W et al, 2009, Pfluger et al, 2008). La gran mayoría de los estudios realizados para evaluar cambios en la expresión de *SIRT1* han sido realizados en animales de experimentación (Tauriainen E et al, 2011; Pfluger et al, 2008).

Desde hace unos años, son diversos los centros de investigación que persiguen conocer con más detalle el efecto de la dieta sobre las sirtuinas, lo que ayudaría al desarrollo de nuevas terapias para regular trastornos metabólicos y luchar contra las enfermedades crónicas. Se ha comprobado en animales de experimentación y también en humanos (obesos sometidos a restricción calórica) que una alimentación baja en calorías afecta directamente a las sirtuinas, provocando su activación y la consiguiente pérdida de peso y disminución del estrés oxidativo celular (Tauriainen E et al, 2011; Crujeiras et al, 2008). Se está estudiando a fondo la teoría de cómo la restricción calórica retrasa el envejecimiento al reducir la formación de radicales libres en las mitocondrias. Es bien sabido que la reducción

de la ingesta de alimentos (restricción calórica) extiende la vida útil en una amplia gama de especies. Al parecer, las enzimas implicadas en este proceso de protección son las sirtuinas (*SIR2*, *SIRT1* en los mamíferos). Estas enzimas regulan el silenciamiento de los genes, la reparación del ADN, además del envejecimiento y la regulación de muerte celular programada (Frye; 1999).

Nuestro estudio de intervención nutricional estuvo basado en el seguimiento población adulta joven durante 10 semanas sometidas a una intervención nutricional con AOV, FS y DM. A pesar que el objetivo inicial no era exclusivamente la pérdida de peso ni la restricción calórica los participantes mostraron una pérdida de peso significativa. Hasta la fecha, no se han realizado investigaciones relacionadas con el efecto de la intervención de una DM en la expresión de sirtuinas. Nosotros hemos observado que la intervención con AOV, FS y DM produce una regulación positiva de la expresión de sirtuinas. Esto podría estar relacionado con el hecho de la capacidad de la dieta para frenar el envejecimiento por el contenido de antioxidantes (entre otros componentes de la dieta) capaz de frenar los radicales libres y por tanto el daño oxidativo. La DM está principalmente caracterizada por un contenido elevado de antioxidantes (Sotos-Prieto et al, 2010, Trichopoulos et al, 2003). Los frutos secos, en especial las nueces han sido catalogadas como uno de los frutos secos y alimentos en general con gran contenido en antioxidantes, sin mencionar las conocidas propiedades del AOV sobre el beneficio cardiovascular. Por tanto, el seguimiento de este tipo de dietas y consumo de alimentos podrían mejorar los biomarcadores relacionados con el estatus oxidativo y así incrementar la expresión del gen *SIRT1* en células de la sangre.

Por otro lado, estos genes (*SIRT1* y *SIRT2*) han sido objeto de numerosas investigaciones para evaluar la asociación entre el resveratrol, antioxidante natural presente en la piel de la uva negra, el vino tinto o las nueces, y la expresión de sirtuinas (Costa Cdos S et al, 2011). Investigaciones recientes han puesto de manifiesto que el resveratrol es capaz de modular también la actividad de las sirtuinas, activándolas, lo que podría también estar directamente relacionado con los hallazgos de nuestro estudio no solo por el alto contenido del consumo de nueces (30g/día) sino también por el consumo de vino.

En conclusión, el seguimiento de una alimentación que incluya AOV, FS y en general el patrón de DM podría estar asociada con un aumento en la expresión de sirtuinal y por tanto con un beneficio sobre las ECV por su papel en la arterosclerosis y en la longevidad. No obstante se requieren más estudios de investigación en humanos que analicen el papel de la DM en la expresión de sirtuinal y los posibles mecanismos asociados al beneficio cardiovascular.

5.7 DISCUSIÓN DE LAS ESTANCIAS FUERA DE ESPAÑA

5.7.1 ESTANCIA EN UNIVERSITY COLLEGE OF LONDON (UCL), LONDON

Los resultados de este proyecto muestran que la identificación de 5 SNPs en el gen *SP100* pueden ser indicadores de parámetros relacionados con el perfil lipídico y parámetros relacionados (tensión arterial), así como factores de inflamación (PCR). Por la funcionalidad de esta proteína se podría sugerir que podría tener implicación en estos desordenes metabólicos. El gen *SP100* antígeno nuclear esta localizado en el cromosoma 2 y codifica para una proteína de 480 aminoácidos ácidos con múltiples sitios de fosforilación para la casein kinasa tipo 2 (Szostecki et al, 1990). El hecho de que Sp100-A interaccione con la proteína heterocromatina (HP1) sugiere que Sp100 podría funcionar en vías metabólicas de la cromatina (Seeler et al, 1998). La importancia de que forme parte de los cuerpos nucleares de PML (leucemia promelocitica cuerpo nuclear) es que las PML están implicados en diferentes procesos como la regulación transcripcional, supresión del crecimiento, apoptosis, y además, los PML podrían estar relacionados con la degradación de proteosomal de proteínas etiquetadas con ubiquitina, proteínas virales mal plegadas, y activadores transcripcionales. Recientemente, un grupo de investigación de Hamburgo que esta trabajando en la función de esta proteína han encontrado una implicación de esta proteína con el metabolismo lipídico, concretamente en el metabolismo de las apolipoproteínas, ya que esta proteína esta implicada en la regulación genética de proteínas relevantes en el metabolismo lipídico, al menos en hepatocitos humanos y lo mas probable es que también en los adipocitos (datos no publicados). Por tanto, estas asociaciones encontradas serían totalmente novedosas por lo que es necesario su replicación en otras poblaciones con un tamaño de muestra elevado para consolidar estos resultados además de otros estudios funcionales que propongan y expliquen posibles mecanismos por los cuales variaciones en el *SP100* podrían conducir a desordenes metabólicos.

5.7.2 ESTANCIA EN MEDICAL RESEARCH COUNCIL, INSTITUE OF METABOLIC SCIENCE, CAMBRIDGE

Los resultados obtenidos en la cohort EPIC-Norfolk derivados del estudio transversal muestran que la alta adherencia a la DM definida según la escala rMED tiene un efecto positivo en las concentraciones de TG, HDL-C, y apolipoproteínas. Son varios los estudios que han mostrado consistencia acerca de los beneficios de la dieta mediterránea sobre fenotipos intermedios y finales de riesgo cardiovascular (Kastorini CM et al, 2011; Panagiotakos et al, 2006; Tzima et al, 2007; Pitsavos et al, 2007, Sotos-Prieto et al, 2010; Estruch et al, 2006). Sin embargo, son menos los estudios que han estudiado la asociación entre la adherencia a la DM y la concentración de apolipoproteínas. Además, añadimos y replicamos resultados de

esta tesis en cuanto al estudio de asociación entre el polimorfismo rs789004 (en alto grado de desequilibrio de ligamiento con el rs1260326 en el gen *GCKR*) y su asociación con las concentraciones de TG. Dicha asociación está respaldada por la bibliografía tal como se discutió en la sección 5.4.10 de esta tesis. Además, se observó una asociación con las concentraciones de colesterol total y apoB. Pocos estudios han examinado esta relación (Chasman et al, 2008). De igual modo, e interesantemente se replicaron resultados obtenidos en el estudio PREDIMED en cuando a la modulación de las concentraciones de TG por la adherencia a la DM. Pero además, se proporcionó nuevas modulaciones. Por motivos de confidencialidad, la discusión de este tema no se puede realizar en profundidad en este apartado.

5.7.3 ESTANCIA EN HARVARD SCHOOL OF PUBLIC HEALTH, BOSTON.

Se ha intentado estudiar y replicar una interacción gen*adherencia a la dieta mediterránea en la población de las Enfermeras de Boston (Nurses' Health Study). Sin embargo, los estudios de replicación son difíciles de llevar a cabo debido a las múltiples diferencias que se pueden encontrar entre poblaciones. No obstante, a pesar de no obtener un valor significativo para la interacción sí que se observa un patrón similar en ambas poblaciones al considerar el análisis estratificado. Los resultados presentados se están elaborando en la actualidad en formato artículo para ser enviado a publicar. Además, otros análisis se están realizando en la actualidad para estudiar con más profundidad la importancia de los ítems de la dieta mediterránea en las concentraciones de triglicéridos en función del genotipo. La discusión de estos resultados se han realizado en la sección 5.10 de la tesis.

De los polimorfismos asociados con enfermedad coronaria, se ha conseguido encontrar una modulación gen dieta mediterránea, sin embargo, estudios más detallados se continúan llevando a cabo en la actualidad. El riesgo individual de padecer arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular asociada depende de la interacción entre factores ambientales y genéticos. Por eso identificar nuevos factores de riesgo cardiovascular (tanto ambientales como genéticos) es un reto fundamental de la investigación biomédica actual. Se estima que el 50% de la susceptibilidad a padecer arteriosclerosis y enfermedad cardiovascular asociada tiene una base genética. El cromosoma 9 p21.3 ha sido recientemente identificado como una región con susceptibilidad tanto para la enfermedad coronaria como para el infarto de miocardio. En diversas poblaciones (Europeas, Japonesas, Africanas, Chinas etc). Diversos polimorfismos y bloques haplotípicos han sido hallados y estudiados en relación a las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, las interacciones de estos polimorfismos con factores ambientales no han sido tan estudiadas por lo que todavía son necesarias más investigaciones en este sentido.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. En población de edad avanzada y de alto riesgo cardiovascular una mayor adherencia a la dieta mediterránea se asoció a una menor prevalencia de obesidad y a valores favorables de otros fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular. Esta asociación favorable la hemos confirmado en el estudio de intervención dietética INDIMED. En dicho estudio pudimos comprobar que la intervención nutricional con aceite de oliva virgen, frutos secos y dieta mediterránea es capaz de producir cambios en los patrones de consumo de alimentos aumentando la adherencia a la dieta mediterránea. Además, esta mayor adherencia a la dieta mediterránea así como la intervención nutricional para todos los grupos excepto el grupo control, se asocia significativamente con cambios favorables en medidas antropométricas, concentraciones plasmáticas de lípidos y otros parámetros bioquímicos. Tanto en el estudio PREDIMED como INDIMED, un mayor consumo de alimentos típicos de la dieta mediterránea como frutas, verduras y frutos secos se asociaron a un perfil cardiovascular más saludable.
2. En el estudio nutrigenético la mayoría de los polimorfismos seleccionados han mostrado asociaciones estadísticamente significativas con parámetros antropométricos y concentraciones plasmáticas de triglicéridos, replicando asociaciones ya descritas en otras poblaciones. Además, hemos encontrado nuevas asociaciones descritas por primera vez. Entre las asociaciones significativas más relevantes destacamos las siguientes: el polimorfismo -1131 T>C y S19W en el gen *APOA5*, el rs1260326 (P446L) en el gen *GCKR*, y el rs6950982 en el gen *SERPINE1* con concentraciones de triglicéridos; el polimorfismo rs1466113 en el gen *SSTR2* y el rs2568958 en el gen *NEGR1* con el peso corporal; el polimorfismo rs1466113 en el gen *SSTR2*, rs2568958 en el gen *NEGR1*, rs5082 en el gen *APOA2* y rs17020112 en el gen *IKKE* con el IMC en la población general, y, en hombres para el SNP en el gen *NEGR1*. El rs1466113 en el gen *SSTR2* y rs7561317 *TMEM18* con la circunferencia de la cintura y rs5082 en el gen *APOA2* y rs10863430 en el gen *IKKE* con la circunferencia de la cadera, tanto en PREDIMED como en INDIMED.

3. La adherencia a la dieta mediterránea, así como otros factores ambientales pueden modular los efectos de los polimorfismos genéticos estudiados. Entre ellos destacamos las siguientes modulaciones: la alta adherencia a la dieta mediterránea modificó el efecto de los polimorfismos -1131T>C en el gen *APOA5*, rs120326 en el gen *GCKR*, rs6950982 en el gen de la *SERPINE1* y el rs2167444 en el gen *SCD1* en las concentraciones de triglicéridos. El tabaco estuvo asociado con las concentraciones de triglicéridos para el polimorfismo -1131T>C en el gen de la *APOA5* y con el rs7138803 en el gen *FAIM2*. El realizar actividad física o no también mostró diferencias en las concentraciones de triglicéridos para el polimorfismo S19W y rs2568958 en el gen *NEGR1* con el IMC. El consumo de FS se asoció con diferencias en la circunferencia de la cintura en el rs7561317 del gen *TMEM18* y el consumo de AGS con el IMC para el rs5082 del gen *APOA2*. Algunas de estas asociaciones e interacciones se han investigado en otras poblaciones europeas y americanas, replicando los resultados (fundamentalmente para los genes *GCK* y *GCKR*). El conocimiento en profundidad de estas interacciones permitirá establecer estrategias más eficaces de prevención personalizada en base al genoma y a las distintas variables ambientales con las que actúa.
4. En el análisis de la asociación entre polimorfismos genéticos en el receptor del sabor amargo y la capacidad de percepción de dicho sabor a través de los tests de laboratorio, hemos podido constatar una alta correlación entre genética y percepción del sabor. Sin embargo, aunque la relación genotipo-percepción del sabor es bastante clara, la asociación genotipo-consumo de alimentos es más difusa dada la cantidad de factores ambientales que intervienen en el consumo de alimentos.
5. En el estudio de nutrigenómica nos ha permitido conocer que una intervención nutricional a corto plazo con alimentos de la dieta mediterránea es capaz de modificar significativamente la expresión de genes candidatos seleccionados. Así, observamos que en los tres grupos de intervención se produjo una regulación negativa del *POLK*, gen asociado con la reparación del ADN, en comparación con el grupo control replicando estudios anteriores en cuanto al consumo de AOV y añadiendo evidencia acerca del consumo de frutos secos y dieta mediterránea. Además, hemos observado, por primera vez, una regulación positiva del *SIRT1* con una intervención dietética con aceite de oliva vírgenes, frutos secos y dieta mediterránea. Estos resultados añaden evidencia del efecto beneficioso del consumo de aceite de oliva virgen, frutos secos y seguimiento en general de la dieta mediterránea en la regulación de la expresión de genes asociados con las enfermedades cardiovasculares. Posteriores estudios permitirán analizar con más detalle el perfil genómico de estas intervenciones dietéticas.

The CONCLUSIONS of this thesis are:

1. Higher adherence to Mediterranean diet was associated with a lower prevalence of obesity and other intermediate cardiovascular phenotypes in the high cardiovascular risk elderly population. We confirmed this positive association in the nutritional intervention study (INDIMED). In this study we found that nutritional intervention with virgin olive oil, mixed nuts and a Mediterranean diet can produce changes in food consumption patterns increasing adherence to Mediterranean diet. Moreover, higher adherence to Mediterranean diet and nutritional intervention for all groups except for the control group is significantly associated with favorable changes in anthropometric measures, plasma lipids and other biochemical parameters. Both, in INDIMED and PREDIMED study, higher typical Mediterranean food consumption such as fruits, vegetables and mixed nuts were associated with a healthier cardiovascular profile.
2. In the nutrigenetic study, most of the selected polymorphisms showed statistically significant associations with anthropometric parameters and plasma triglyceride concentrations, replicating association previously described in other populations and describing new ones for the first time. Common polymorphisms that were identified in Genome Wide Association studies for anthropometric and lipids traits showed associations with:
 - Body weight (rs1466113 in *SSTR2*, rs2568958 in *NEGR1*); BMI (rs5082 in *APOA2*), waist circumference (rs1466113 in *SSTR2*, rs7561317 in *TMEM18*, rs5082 in *APOA2*). Obesity risk (rs1466113 in *SSTR2*), overweight prevalence (rs2568958 in *NEGR1*)
 - TG concentrations (-1131 T> C and S19W in *APOA5*, rs1260326 (P446L) in *GCKR*).

Moreover, new pleiotropic effects were identified:

- Waist circumference (rs10863430 in *IKKE* gene) and BMI (rs17020112 in *IKKE* gene), hip circumference (rs5082 in *APOA2* gene), obesity risk (rs508384 in *SCD1* gene)
- Diabetes prevalence (rs10863430 *IKKE* gene)
- TG concentrations (rs695082 in *SERPINE1* gene, rs2167444 in *SCD1* gene), total cholesterol (rs695082 in *SERPINE1* gene), LDL-C (rs695082 in *SERPINE1* gene) hypertriglyceridemia status (rs508384 in *SCD1* gene)

3. Adherence to a Mediterranean diet and other environmental factors modified the genetic effects of the SNPs studied for obesity and CVD. Amongst the environmental factors, high adherence to a Mediterranean diet modified triglyceride concentrations for polymorphisms-1131T> C in *APOA5* gene, rs120326 in the *GCKR* gene, rs6950982 in the *SERPINE* gene and rs2167444 in the *SCD1* gene and the risk of obesity in the rs10863440 polymorphism in the *IKKE* gene. A smoking habit was associated with triglyceride concentrations for polymorphism 1131T> C in *APOA5* gene and the rs7138803 in the gene *FAIM2*. Physical activity condition also modulated genetic susceptibility to having higher BMI and TG concentrations in rs2568958 in *NGRE1* gene and S19W in *APOA5* gene. Genetic susceptibility to higher waist circumference as regards rs7561317 in *TMEM18* gene was modulated depending on nut consumption. Moreover, a rs5082 *APOA2* gene-saturated fatty acids interaction for BMI was found*. Some of these associations and interactions have been investigated in other European and American populations, replicating the results mainly for *GCK* and *GCKR* genes. More in-depth knowledge on the mechanisms underlying this interaction will no doubt contribute to the realization of more effective prevention strategies
4. In the association analysis of genetic polymorphisms and bitter taste receptor, we found a high correlation between genetics and taste perception. However, although the genotype-perception of taste is quite clear, the association genotype-food consumption is more diffuse given the amount of environmental factors involved in food intake.
5. The nutrigenomics study showed that a short-term dietary intervention with Mediterranean foods can significantly modify candidate atherosclerotic gene expression. Increased virgin olive oil, mixed nut intake and adherence to a Mediterranean diet may reduce CVR risk by down-regulating *POLK* gene expression (involved in DNA repair) and increasing *SIRT1* gene expression (association shown for the first time). This indicates and adds evidence to the beneficial effect of virgin olive oil consumption, mixed nuts and Mediterranean diet in the regulation of atherosclerotic gene expression.

- AACE/ACE position statement on the prevention, diagnosis, and treatment of obesity (1998 revision). AACE/ACE Obesity Task Force
- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 2003;34:154–6.
- Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med*. 2006;355(8):763-78.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN). Estudio Aladino, 2011. http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/estudio_aladino.shtml
- Alaupovic P, Mack WJ, Knight-Gibson C, Hodis HN. The role of triglyceride-rich lipoprotein families in the progression of atherosclerotic lesions as determined by sequential coronary angiography from a controlled clinical trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:715–722.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005 24-30;366(9491):1059-62.
- Almén MS, Jacobsson JA, Shaik JH, Olszewski PK, Cedernaes J, Alsiö J, Sreedharan S, et al. The obesity gene, TMEM18, is of ancient origin, found in majority of neuronal cells in all major brain regions and associated with obesity in severely obese children. *BMC Med Genet*. 2010 Apr 9;11:58
- Alvarez-Parrilla E, De La Rosa LA, Legarreta P, Saenz L, Rodrigo-García J, González-Aguilar GA. Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and non-smoking adults. *Int J Food Sci Nutr*. 2010;61(4):369-80.
- Allender Steven, Scarborough Peter, Peto Viv and Rayner Mike, Leal Jose, Luengo-Fernandez Ramon and Gray Alastair *European Cardiovascular Disease Statistics*, 2008.
- Ambring A, Friberg P, Axelsen M, Laffrenzen M, Taskinen MR, Basu S, Johansson. Effects of a Mediterranean-inspired diet on blood lipids, vascular function and oxidative stress in healthy subjects. *M Clin Sci*. 2004;106(5):519-25.
- Andersen, L.B., Schnor, P., Schroll, M, Hein, H.O. All-cause mortality associated with physical activity during leisure time, work, sports, and cycling to work. *Archives of Internal Medicine*, (2000) 160, 1621-1628.
- Andreoli A, Lauro S, Di Daniele N, Sorge R, Celi M, Volpe SL. Effect of a moderately hypoenergetic Mediterranean diet and exercise program on body cell

- mass and cardiovascular risk factors in obese women. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62(7):892-7.
- Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Foz Sala M, Mantilla T, Serra Majem L, Moreno B, Monereo S, Millán J; Grupo Colaborativo para el estudio DORICA fase 2. Tables of coronary risk evaluation adapted to the Spanish population: the DORICA study *Med Clin (Barc).* 2004;123(18):686-91. Spanish.
 - Arós F, Boraita A, Alegría E, Alonso AM, Bardají A, Lamiel R, et al. Guidelines of the Spanish Society of Cardiology for clinical practice in exercise testing. *Rev Esp Cardiol.* 2000;53(8):1063-94
 - Attie, A. D.; Krauss, R. M.; Gray-Keller, M. P.; Brownlie, A.; Miyazaki, M.; Kastelein, J. J.; et al. Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.*, 2002, 43, 1899-1907.
 - Avenell A, Broom J, Brown TJ, Poobalan A, Aucott L, Stearns SC, et al. Systematic review of the long-term effects and economic consequences of treatments for obesity and implications for health improvement. *Health Technol Assess.* 2004;8(21):iii-iv, 1-182.
 - B. Alonso de la Iglesia, H. Ortiz Marrón, E. Saltó Cerezuela, J. Toledo Pallarés. Epidemiología del tabaquismo: efectos sobre la salud, prevalencia de consumo y actitudes. Estrategias de prevención y control. *Prev Tab* 2006; 8(Supl. 1): 2-10
 - Bachmanov AA, Bosak NP, Floriano WB, Inoue M, Li X, Lin C, Murovets VO, Reed DR, Zolotarev VA, Beauchamp GK Genetics of sweet taste preferences. *Flavour Fragr J.* 2011;26 (4):286-294.
 - Bamia C, Orfanos P, Ferrari P, Overvad K, Hundborg HH, Tjønneland A et al. Dietary patterns among older Europeans: the EPIC-Elderly study. *Br J Nutr* 2005;94(1):100-13.
 - Barbieri P, Palma RF, Nishimura RY, Damião R, Bevilacqua M, Massimino F et al; Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. Factors associated with stages of change for red meat and vegetable intake by Japanese-Brazilians. *Cad Saude Publica* 2009;25(7):1466-74.
 - Barrio E, Abellán A. Indicadores demográficos. En: Sancho M (ed). Informe 2006. Las personas mayores en España. Madrid: Instituto de Mayores y Servicios Sociales (IMSERSO) 2006;35-44.
 - Bartoshuk LM Comparing sensory experiences across individuals: recent psychophysical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chem Senses.* 2000;25(4):447-60
 - Bartoshuk LM, Duffy VB, Miller IJ. PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiol Behav.* 1994;56(6):1165-71.
 - Bartoshuk LM, Duffy VB, Miller IJ. PTC/PROP tasting: anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiol Behav.* 1994;56(6):1165-71
 - Basterra-Gortari, F.J., Forga, L., Bes-Rastrollo, M., Toledo, E., Martínez, J.A., Martínez- González, M.A. Effect of smoking on body weight: longitudinal analysis of the SUN cohort. *Rev. Esp. Cardiol.* 2010, 63 (19), 20–27
 - Bauer F, Elbers CC, Adan RA, Loos RJ, Onland-Moret NC, Grobbee DE, et al. Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with

- adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference *Am J Clin Nutr*. 2009;90(4):951-9.
- Belda O, Serrano P, Bozada JM, Fraile J, Garrido M, Guerrero R, et al. Percutaneous endoscopic gastrostomy. Reality in the intra- and extra-community clinical nutritional practice. *Rev Clin Esp*. 2005;205(10):472-7.
 - Bell KI, Tepper BJ. Short-term vegetable intake by young children classified by 6-n-propylthiouracil bitter-taste phenotype. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(1):245-51
 - Belza MJ, Quiroga J, Beland F, Zunzunegui MV. Hypertension in elderly persons: prevalence, knowledge, treatment and control. *Aten Primaria*. 1997;19(7):367-71
 - Bendinelli B, Masala G, Saieva C, Salvini S, Calonico C, Sacerdote C, et al. Fruit, vegetables, and olive oil and risk of coronary heart disease in Italian women: the EPICOR Study. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(2):275-83.
 - Berg A, Halle M, Franz I, Keul J. Physical activity and lipoprotein metabolism: epidemiological evidence and clinical trials. *Eur J Med Res*. 1997;2(6):259-64
 - Bertomeu V, Morillas P, Gonzalez-Juanatey JR, Quiles J, Guindo J, Soria F, et al. Prevalence of Peripheral Arterial Disease in Patients with Acute Coronary Síndrome (PAMISCA) Investigators. Prevalence and prognostic influence of peripheral arterial disease in patients ≥ 40 years old admitted into hospital following an acute coronary event. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008;36(2):189-96.
 - Bes-Rastrollo M, Wedick NM, Martinez-Gonzalez MA, Li TY, Sampson L, Hu FB. Prospective study of nut consumption, long-term weight change, and obesity risk in women. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(6):1913-9
 - Bijnen, F.C., Feskens, E.J., Caspersen, C.J., Nagelkerke, N., Mosterd, W.L., & Kromhout, D. Baseline and previous physical activity in relation to mortality in elderly men: the Zutphen Elderly Study. *American Journal of Epidemiology*, 1999. 150, 1289-1296.
 - Bingham SA, Gill C, Welch A, et al. Validation of dietary assessment methods in the UK arm of EPIC using weighed records, and 24-hour urinary nitrogen and potassium and serum vitamin C and carotenoids as biomarkers. *Int J Epidemiol* 1997;26 Suppl 1:S137-51.
 - Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, Stroes ES, Otvos JD, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation*. 2007;116(18):2029-35
 - Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC, Martín-Campos JM, Julve J. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res* 2001; 42: 1727-1739.
 - Bogani, P., Galli, C., Villa, M., and Visioli, F. (2007) Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* 190, 181-186
 - Boraita A. Plasma lipid profile is improved by participation in sports, but at what intensity? *Rev Esp Cardiol*. 2004;57(6):495-8.
 - Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, et al: Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol* 2006; 4: e31

- Bottomley MJ, Collard MW, Huggenvik JI, Liu Z, Gibson TJ, Sattler M The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol.* 2001 Jul;8(7):626-33.
- Brennan AM, Sweeney LL, Liu X, Mantzoros CS. Walnut consumption increases satiation but has no effect on insulin resistance or the metabolic profile over a 4-day period. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(6):1176-82.
- Brown S, Ordovás JM, Campos H. Interaction between the APOC3 gene promoter polymorphisms, saturated fat intake and plasma lipoproteins. *Atherosclerosis.* 2003;170(2):307-13.
- Buckland G, González CA, Agudo A, et al. Adherence to the Mediterranean diet and risk of coronary heart disease in the Spanish EPIC Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2009;170:1518-29
- Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim UK, Drayna D, Meyerhof W The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol.* 2005;15(4):322-7
- Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 1999;341(15):1097-105.
- Camargo A, Ruano J, Fernandez JM, Parnell LD, Jimenez A, Santos-Gonzalez M, 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.
- Campos H, D'Agostino M, Ordovás JM. Gene-diet interactions and plasma lipoproteins: role of apolipoprotein E and habitual saturated fat intake. *Genet Epidemiol.* 2001;20(1):117-128.
- Cardello AV. Chemical stimulation of single human fungiform taste papillae: sensitivity profiles and locus of stimulation *Sens Processes.* 1978;2(3):173-90.
- Casas-Agustench P, López-Uriarte P, Ros E, Bulló M, Salas-Salvadó J. Nuts, hypertension and endothelial function. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011; Suppl 1:S21-33.
- Castellani LW, Goto AM, Lusis AJ. Studies with apolipoprotein A-II transgenic mice indicate a role for HDLs in adiposity and insulin resistance. *Diabetes.* 2001;50(3):643-651.
- Castellani LW, Nguyen CN, Charugundla S, et al. Apolipoprotein AII is a regulator of very low density lipoprotein metabolism and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11633-11644.
- Chandola T, Britton A, Brunner E, Hemingway H, Malik M, Kumari M, Badrick E, Kivimaki M, Marmot M Work stress and coronary heart disease: what are the mechanisms? *Eur Heart J.* 2008;29(5):640-8.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ. T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell.* 2000;100(6):703-11.
- Chaudhari N, Roper SD. The cell biology of taste. *J Cell Biol.* 2010 9;190(3):285-96.

- Chen QY, Alarcon S, Tharp A, Ahmed OM, Estrella NL, Greene TA, Rucker J, Breslin PA. Perceptual variation in umami taste and polymorphisms in TAS1R taste receptor genes. *Am J Clin Nutr.* 2009;90(3):770S-779S.
- Chen Z, Boreham J. Smoking and cardiovascular disease. *Semin Vasc Med.* 2002
- Chiang SH, Bazuine M, Lumeng CN, Geletka LM, Mowers J, White NM, et al. The protein kinase IKKepsilon regulates energy balance in obese mice. *Cell.* 2009 Sep 4;138(5):961-75.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 1979;18(24):5294-9.
- Choi Y., Park Y., Pariza M.W., Ntambi J.M., Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 (2001) 689-693
- Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults: The ATTICA Study. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44(1):152-8.
- Chung WK, Leibel RL. Considerations regarding the genetics of obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2008, Suppl 3:S33-9.
- Cizza G, Requena M, Galli G, de Jonge L. Chronic sleep deprivation and seasonality implications for the obesity epidemic. *J Endocrinol Invest.* 2011 Jun 27. [Epub ahead of print]
- Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B et al. Association of Sirtuin 1 (SIRT1) Gene SNPs and Transcript Expression Levels With Severe Obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2011 Jul 14. doi: 10.1038/oby.2011.200. [Epub ahead of print]
- Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 2005;37:161-5
- Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 2006;354:1264-72
- Comité de Expertos de la OMS sobre la obesidad: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. WHO technical report series, 894. Ginebra (Suiza): Organización Mundial de la Salud, 2000.
- Corella D, Arnett DK, Tsai MY, Kabagambe EK, Peacock JM, Hixson JE, et al. The -256T>C polymorphism in the apolipoprotein A-II gene promoter is associated with body mass index and food intake in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study. 2007 *Clin Chem* 53:1144-52
- Corella D, Carrasco P, Sorlí JV, Coltell O, Ortega-Azorín C, Guillén M, González JI, Sáiz C, Estruch R, Ordovas JM. Education modulates the association of the FTO rs9939609 polymorphism with body mass index and obesity risk in the Mediterranean population. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 Dec 24. [Epub ahead of print]

- Corella D, Ordovas JM. Nutrigenomics in cardiovascular medicine. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009;2(6):637-51.
- Corella D, Ordovas JM. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS THAT INFLUENCE LIPID METABOLISM: Interaction with Dietary Factors. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:341-90.
- Corella D, Peloso G, Arnett DK, Demissie S, Cupples LA, Tucker K, Lai CQ, Parnell L, Coltell O, Lee YC, Ordovas JM. APOA2, dietary fat, and body mass index replication of a gene-diet interaction in 3 independent populations. *2009 Arch Internal Med* 169:1897-906
- Corella D, Peloso G, Arnett DK, Demissie S, Cupples LA, Tucker K, Lai CQ, Parnell LD, Coltell O, Lee YC, Ordovas JM. APOA2, dietary fat, and body mass index: replication of a gene-diet interaction in 3 independent populations. *Arch Intern Med.* 2009 Nov 9;169(20):1897-906.
- Corella D, Qi L, Sorlí JV, Godoy D, Portolés O, Coltell O, Greenberg AS, Ordovas JM. Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5121-6.
- Corella D, Tai ES, Sorlí JV, Chew SK, Coltell O, Sotos-Prieto M, García-Rios A, Estruch R, Ordovas JM. Association between the APOA2 promoter polymorphism and body weight in Mediterranean and Asian populations: replication of a gene-saturated fat interaction. *Int J Obes (Lond).* 2011;35(5):666-75.
- Corella D, Tucker K, Lahoz C, Coltell O, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ, Ordovas JM. Alcohol drinking determines the effect of the APOE locus on LDL-cholesterol concentrations in men: the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr.* 2001 Apr;73(4):736-45
- Costa Cdos S, Rohden F, Hammes TO, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM. Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPAR γ 1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. *Obes Surg.* 2011;21(3):356-61.
- Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Abete I, González-Muniesa P, Martínez JA. Energy restriction in obese subjects impact differently two mitochondrial function markers. *J Physiol Biochem.* 2008;64(3):211-9.
- Crujeiras AB, Parra D, Goyenechea E, Martínez JA. Sirtuin gene expression in human mononuclear cells is modulated by caloric restriction *Eur J Clin Invest.* 2008;38(9):672-8.
- Cummings DE, Schwartz MW. Genetics and pathophysiology of human obesity. *Annu Rev Med.* 2003;54:453-71.
- Dallinga-Thie GM, van Tol A, Hattori H, van Vark-van der Zee LC, Jansen H, Sijbrands EJ; DALI study group. Plasma apolipoprotein A5 and triglycerides in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49(7):1505-11.
- Damasceno NR, Pérez-Heras A, Serra M, Cofán M, Sala-Vila A, Salas-Salvadó J, Ros E. Crossover study of diets enriched with virgin olive oil, walnuts or almonds. Effects on lipids and other cardiovascular risk markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21 Suppl 1:S14-20.

- Day N LR, Khaw KT, Bingham S, Welch A. EPIC-Norfolk: study design and characteristics of the cohort. *Br J Cancer* 1999;80:95–103.
- de Koning L, Merchant AT, Pogue J, Anand SS. Waist circumference and waist-to-hip ratio as predictors of cardiovascular events: meta-regression analysis of prospective studies. *Eur Heart J*. 2007;28(7):850-6.
- de Mello VD, Kolehmainen M, Pulkkinen L, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, et al. Downregulation of genes involved in NFkappaB activation in peripheral blood mononuclear cells after weight loss is associated with the improvement of insulin sensitivity in individuals with the metabolic syndrome: the GENOBIN study. *Diabetologia*. 2008;51(11):2060-7
- DellaPenna D. Nutritional genomics: manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science*. 1999;285(5426):375-9.
- Després JP. Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Crit Pathw Cardiol*. 2007;6(2):51-9.
- Dinehart ME, Hayes JE, Bartoshuk LM, Lanier SL, Duffy VB. Bitter taste markers explain variability in vegetable sweetness, bitterness, and intake. *Physiol Behav*. 2006;87(2):304-13.
- Drewnowski A, Henderson SA, Cockroft JE. Genetic sensitivity to 6-n-propylthiouracil has no influence on dietary patterns, body mass indexes, or plasma lipid profiles of women. *J Am Diet Assoc*. 2007;107(8):1340-8.
- Drewnowski A, Henderson SA, Levine A, Hann C. Taste and food preferences as predictors of dietary practices in young women. *Public Health Nutr*. 1999;2(4):513-9.
- Dubé MC, Lemieux S, Piché ME, Corneau L, Bergeron J, Riou ME, Weisnagel SJ. The contribution of visceral adiposity and mid-thigh fat-rich muscle to the metabolic profile in postmenopausal women. *Obesity (Silver Spring)*. 2011 Jan 27. [Epub ahead of print]
- Duesing K, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Balkau B, Froguel P, Gibson F. Evaluating the association of common APOA2 variants with type 2 diabetes. 2009 *BMC Med Genet* 10:13
- Duffy VB, Davidson AC, Kidd JR, Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Reed DR, Snyder DJ, Bartoshuk LM. Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-n-propylthiouracil (PROP) bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004;28(11):1629-37. (B)
- Duffy VB, Hayes JE, Davidson AC, Kidd JR, Kidd KK, Bartoshuk LM. Vegetable Intake in College-Aged Adults Is Explained by Oral Sensory Phenotypes and TAS2R38 Genotype. *Chemosens Percept*. 2010;3(3-4):137-148.
- Duffy VB, Peterson JM, Bartoshuk LM. Associations between taste genetics, oral sensation and alcohol intake. *Physiol Behav*. 2004;82(2-3):435-45. (A)
- Dulac C. The physiology of taste, vintage 2000. *Cell*. 2000;100(6):607-10.
- Enkhmaa B, Anuurad E, Zhang W, Tran T, Berglund L. Lipoprotein(a): Genotype-Phenotype Relationship and Impact on Atherogenic Risk. *Metab Syndr Relat Disord*. 2011 Jul 12. [Epub ahead of print]

- Eny, K.M, Wolever, T.M.S., Corey, P.N. and El-Sohehy, A. Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in two distinct populations. *Am. J. Clin. Nutr.* (2010) 92:1501-10.
- Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F, Julve J. Overexpression of human apolipoprotein A-II in transgenic mice does not increase their susceptibility to insulin resistance and obesity. *Diabetologia* 2002; 45: 600–601.
- Esposito, K., Nappo, F., Giugliano, F., Giugliano, G., Marfella, R., and Giugliano, D. Effect of Dietary Antioxidants on Postprandial Endothelial Dysfunction Induced by a High-Fat Meal in Healthy Subjects, *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 77, 139–143
- Essick GK, Chopra A, Guest S, McGlone F. Lingual tactile acuity, taste perception, and the density and diameter of fungiform papillae in female subjects. *Physiol Behav.* 2003;80(2-3):289-302
- Estruch R, Martínez-González MA, Corella D, Salas-Salvadó J, Ruiz-Gutiérrez V, Covas MI, et al; PREDIMED Study Investigators Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2006, 4;145(1):1-11
- Feeney E, O'Brien S, Scannell A, Markey A, Gibney ER. Genetic variation in taste perception: does it have a role in healthy eating? *Proc Nutr Soc.* 2011;70(1):135-43.
- Feifel D, Vaccarino FJ. Central somatostatin: a re-examination of its effects on feeding. *Brain Res.* 1990;535:189-94.
- Fernández-Ballart JD, Piñol JL, Zazpe I, Corella D, Carrasco P, Toledo E, et al. Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br J Nutr.* 2010;103(12):1808-16
- Fernández-Real JM, Vayreda M, Casamitjana R, Saez M, Ricart W. Body mass index (BMI) and percent fat mass. A BMI > 27.5 kg/m² could be indicative of obesity in the Spanish population. *Med Clin (Barc).* 2001;117(18):681-4
- Fischer R, Griffin F, England S, garn sm. Taste thresholds and food dislikes. *Nature.* 1961;191:1328.
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA.* 2010;303(3):235-41.
- Fogelholm, M., Kukkonen, M., & Harjula, K. (2000). Does physical activity prevent weight gain: A systematic review. *Obesity Reviews*, 1, 95-111.
- Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA.* 2003;289(2):187-93
- Fraser GE, Bennett HW, Jaceldo KB, Sabaté J. Effect on body weight of a free 76 Kilojoule (320 calorie) daily supplement of almonds for six months. *J Am Coll Nutr.* 2002;21(3):275-83.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science.* 2007;316(5826):889-94.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.

- Friedman GD, Cutter GR, Donahue RP, Hughes GH, Hulley SB, Jacobs DR Jr, Liu K, Savage PJ. CARDIA: study design, recruitment, and some characteristics of the examined subjects. *J Clin Epidemiol.* 1988;41(11):1105-16
- Fruchart-Najib J, Bauge E, Niculescu LS, et al. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:397-404.
- Frye RA (June 1999). "Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260 (1): 273-9.
- Fullerton SM, Clark AG, Weiss KM, Taylor SL, Stengård JH, Salomaa V, Boerwinkle E, Nickerson DA Sequence polymorphism at the human apolipoprotein AII gene (APOA2): unexpected deficit of variation in an African-American sample. *Hum Genet.* 2002;111(1):75-87.
- Fushan AA, Simons CT, Slack JP, Manichaikul A, Drayna D. Allelic polymorphism within the TAS1R3 promoter is associated with human taste sensitivity to sucrose. *Curr Biol.* 2009;19(15):1288-93.
- Gabriel R, Alonso M, Segura A, Tormo MJ, Artigao LM, Banegas JR, et al; ERICE Cooperative Group Prevalence, geographic distribution and geographic variability of major cardiovascular risk factors in Spain. Pooled analysis of data from population-based epidemiological studies: the ERICE Study. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61(10):1030-40.
- García-Lorda P, Megias Rangil I, Salas-Salvadó J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57 Suppl 1:S8-11
- Gibbons GF, Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein, *Biochem. J.* 268 (1990) 1-13.
- Gietzen, DW. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr* 1993; 123: 610-625.
- Glanz K, Basil M, Maibach E, Goldberg J, Snyder D. Why Americans eat what they do: taste, nutrition, cost, convenience, and weight control concerns as influences on food consumption. *J Am Diet Assoc.* 1998;98(10):1118-26.
- Goldstein GL, Daun H, Tepper BJ Influence of PROP taster status and maternal variables on energy intake and body weight of pre-adolescents. *Physiol Behav.* 2007;90(5):809-17.
- Gorovic N, Afzal S, Tjønneland A, Overvad K, Vogel U, Albrechtsen C, Poulsen HE. Genetic variation in the hTAS2R38 taste receptor and brassica vegetable intake. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011;71(4):274-9.
- Goulet J, Lamarche B, Nadeau G, Lemieux S. Effect of a nutritional intervention promoting the Mediterranean food pattern on plasma lipids, lipoproteins and body weight in healthy French-Canadian women. *Atherosclerosis.* 2003;170(1):115-24.
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary. *American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Cardiol Rev.* 2005;13(6):322-7.

- Guillen M, Sotos-Prieto M, Corella D: Sustainable Agriculture and New Biotechnologies (ISBN:9781439825044) capitulo Sustainable Agriculture and New Biotechnologies
- Guldner HH, Szostecki C, Schröder P, Matschl U, Jensen K, Lüders C, Will H, Sternsdorf Splice variants of the nuclear dot-associated Sp100 protein contain homologies to HMG-1 and a human nuclear phosphoprotein-box motif.T. *J Cell Sci.* 1999 Mar;112 (Pt 5):733-47.
- Guo SW, Reed DR. The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol.* 2001;(2):111-42.
- Guo SW, Reed DR. The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol.* 2001;28(2):111-42.
- Gutiérrez-Fisac JL, Regidor E, Banegas JR, Rodríguez Artalejo F. Prevalence of obesity in the Spanish adult population: 14 years of continuous increase. *Med Clin (Barc).* 2005;124(5):196-7.
- Hayes JE, Wallace MR, Knopik VS, Herbstman DM, Bartoshuk LM, Duffy VB.. Allelic variation in TAS2R bitter receptor genes associates with variation in sensations from and ingestive behaviors toward common bitter beverages in adults. *Chem Senses.* 2011;36(3):311-9
- Henneman P, Schaap FG, Havekes LM, et al. Plasma apoAV levels are markedly elevated in severe hypertriglyceridemia and positively correlated with the APOA5 S19W polymorphism. *Atherosclerosis* 2007;193(1):129-34
- Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A, Illig T, Wichmann HE, Meitinger T, Hunter D, Hu FB, Colditz G, Hinney A, Hebebrand J, Koberwitz K, Zhu X, Cooper R, Ardlie K, Lyon H, Hirschhorn JN, Laird NM, Lenburg ME, Lange C, Christman MF.A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science.* 2006;312(5771):279-83
- Hermsdorff HH, Zulet MÁ, Abete I, Martínez JA A legume-based hypocaloric diet reduces proinflammatory status and improves metabolic features in overweight/obese subjects.*Eur J Nutr.* 2011 Feb;50(1):61-9
- Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Brönnner G, Müller TD, Grallert H, Illig T, Wichmann HE, Rief W, Schäfer H, Hebebrand J. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One.* 2007;2(12):e1361
- Hinney A, Vogel CI, Hebebrand J. From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2010;19(3):297-310.
- Holzappel C, Grallert H, Baumert J, Thorand B, Döring A, Wichmann HE, Hauner H, Illig T, Mielck A. First investigation of two obesity-related loci (TMEM18, FTO) concerning their association with educational level as well as income: the MONICA/KORA study. *J Epidemiol Community Health.* 2011 ;65(2):174-6. Epub 2010 Jul 13
- Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 2007;32:71–7.
- Hotta K, Nakamura M, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Kamohara S, et al. Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2,

- BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population. *J Hum Genet.* 2009;54(12):727-31
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest.* 2011;121(6):2133-41. doi: 10.1172/JCI46043.
 - <http://www.escardio.org/>
 - Hulver M.W., J.R. Berggren, M.J. Carper, M. Miyazaki, J.M. Ntambi, E.P. Hoffman, J.P. et al. Muoio. Elevated stearyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans, *Cell Metab.* 2 (2005) 251-261.
 - Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, et al. Elevated stearyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab.* 2005;2:251– 61
 - Hyun YJ, Jang Y, Chae JS, et al. Association of apolipoprotein A5 concentration with serum insulin and triglyceride levels and coronary artery disease in Korean men. *Atherosclerosis* 2009;205(2):568-73.
 - Imadome, K., Iwakawa, M., Nojiri, K., Tamaki, T., Sakai, M., Nakawatari, M., Moritake, T., Yanagisawa, M., Nakamura, E., Tsujii, H., and Imai, T. (2008) Upregulation of stress-response genes with cell cycle arrest induced by carbon ion irradiation in multiple murine tumors models. *Cancer Biol. Ther.* 7, 208–217
 - International obesity task force, 2003
 - Intranuovo LR, Powers AS. The perceived bitterness of beer and 6-n-propylthiouracil (PROP) taste sensitivity. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;855:813-5.
 - Ishihara M, Kujiraoka T, Iwasaki T, et al. A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human plasma apolipoprotein A-V concentration. *J Lipid Res* 2005;46(9):2015-22.
 - J.M. Ntambi, M. Miyazaki, J.P. Stoehr, H. Lan, C.M. Kendziorski, B.S. Yandell, et al., Loss of stearyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity, *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 99 (2002) 11,482–11,486.
 - Jakicic JM, Otto AD. Physical activity considerations for the treatment and prevention of obesity. *Am J Clin Nutr* 2005; 82 (suppl), ps: 226S-95.
 - James WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 2008;263:336-52.
 - Jang Y, Paik JK, Hyun YJ, et al. The apolipoprotein A5 -1131T>C promoter polymorphism in Koreans: association with plasma APOA5 and serum triglyceride concentrations, LDL particle size and coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2009;402(1-2):83-7
 - Jansen S, Lopez-Miranda J, Salas J, Ordovas JM, Castro P, Marin C, Ostos MA, Lopez-Segura F, Jimenez-Pereperez JA, Blanco A, Perez-Jimenez F. Effect of 347-serine mutation in apoprotein A-IV on plasma LDL cholesterol response to dietary fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 Aug;17(8):1532-8.
 - Jiang G., Z. Li, F. Liu, K. Ellsworth, Q. Dallas-Yang, M. Wu, J. Ronan, C. Esau, C. Murphy, D. Szalkowski, R. Bergeron, T. Doebber, B.B. Zhang, Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearyl-CoA desaturase-1, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1030-1038.

- Jones-Smith JC, Gordon-Larsen P, Siddiqi A, Popkin BM. Is the burden of overweight shifting to the poor across the globe? Time trends among women in 39 low- and middle-income countries (1991-2008). *Int J Obes (Lond)*. 2011 Sep 13. doi: 10.1038/ijo.2011.179. [Epub ahead of print].
- Jordi Salas-Salvadó, Miguel A. Rubio, Monserrat Barbany, Basilio Moreno y Grupo Colaborativo de la SEEDO. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica.. *MedClin (Barc)* 2007; 128 (5): 184-196
- Julve J, Escolà-Gil JC, Rotllan N, Fiévet C, Vallez E, de la Torre C, Ribas V, Sloan JH, Blanco-Vaca F. Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Feb;30(2):232-8.
- Kaestner, K. H.; Ntambi, J. M.; Kelly, T. J. Jr.; Lane, M. D.; Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. A second differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 14755-14761
- 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. *Am Coll Cardiol*. 2011;57(11):1299-313.
- 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. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1299-313
- Katan MB, Beynen AC, de Vries JH, Nobels A. Existence of consistent hypo- and hyperresponders to dietary cholesterol in man. *Am J Epidemiol*. 1986;123(2):221-34.
- Keller KL, Reid A, MacDougall MC, Cassano H, Song JL, Deng L, et al. R. Sex differences in the effects of inherited bitter thiourea sensitivity on body weight in 4-6-year-old children. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(6):1194-200
- Keller KL, Tepper BJ. Inherited taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil in diet and body weight in children. *Obes Res*. 2004;12(6):904-12
- Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7
- Khataa NH, Stewart L, Brenner DM, Cornelis MC, El-Sohehy A. TAS2R38 genotypes and phenylthiocarbamide bitter taste perception in a population of young adults. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2009;2(4-5):251-6.
- 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 Feb;13(1):7-19
- Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D. Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*. 2003;299(5610):1221-5
- Kinnamon SC. A plethora of taste receptors *Neuron*. 2000;25(3):507-10.

- Kondo K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *Biofactors*. 2004;22(1-4):303-10
- Konstantinidou V, Covas MI, Muñoz-Aguayo D, Khymenets O, de la Torre R, Saez G, Tormos Mdel C, et al. In vivo nutrigenomic effects of virgin olive oil polyphenols within the frame of the Mediterranean diet: a randomized controlled trial. *FASEB J*. 2010;24(7):2546-57
- Konstantinidou V, Khymenets O, Fito M, De La Torre R, Anglada R, Dopazo A, Covas MI. Characterization of human gene expression changes after olive oil ingestion: an exploratory approach. *Folia Biol (Praha)*. 2009;55(3):85-91
- Koppes LL, Twisk JW, Van Mechelen W, Snel J, Kemper HC. Cross-sectional and longitudinal relationships between alcohol consumption and lipids, blood pressure and body weight indices. *J Stud Alcohol*. 2005;66(6):713-21.
- Kostrzewa G, Broda G, Kurjata P, Piotrowski W, Ploski R. Effect of protein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 46L gene polymorphism on LDL cholesterol concentration in a Polish adult population. *Mol Genet Metab* 2008;94:259–62.
- Krebs JR. The gourmet ape: evolution and human food preferences. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(3):707S-711S.
- Kunkel, T. A., Pavlov, Y. I., and Bebenek, K. (2003) Functions of human DNA polymerases α , β and γ suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates. *DNA Repair (Amst.)* 2, 135–149
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al: Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006, 127(6):1109-1122.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al: Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell* 2006, 127(6):1109-1122.
- Lahoz C, Vicente I, Criado A, Laguna F, Torrecilla E, Mostaza JM. Clinical factors associated with inappropriate prescription of statins. *Med Clin (Barc)*. 2007;129(3):86-90.
- Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2537–43.
- Lara-Castro C, Hunter GR, Lovejoy JC, Gower BA, Fernandez JR. Apolipoprotein A-II polymorphism and visceral adiposity in African-American and white women. *Obesity* 2005; 13: 507–512.
- Larsen TM, Dalskov SM, van Baak M, Jebb SA, Papadaki A, Pfeiffer AF, et al. Diet, Obesity, and Genes (Diogenes) Project. Diets with high or low protein content and glycemic index for weight-loss maintenance. *N Engl J Med*. 2010;363(22):2102-13
- Lawlor, DA., Hopker, SW. The effectiveness of exercise as an intervention in the management of depression: systematic review and meta-regression analysis of randomised controlled trials. *British Medical Journal*, 2001; 322, 1-8.
- Lee CD, Folsom AR, Blair SN. Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke*. 2003;34(10):2475-81.

- Leon AS, Gaskill SE, Rice T, Bergeron J, Gagnon J, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C. Variability in the response of HDL cholesterol to exercise training in the HERITAGE Family Study. *Int J Sports Med.* 2002;23(1):1-9.
- Leon AS, Sanchez OA. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(6 Suppl):S502-15; discussion S528-9
- Leone A, Landini L, Leone A. What is tobacco smoke? Sociocultural dimensions of the association with cardiovascular risk. *Curr Pharm Des.* 2010;16(23):2510-7
- León-Muñoz LM, Guallar-Castillón P, López-García E, Banegas JR, Gutiérrez-Fisac JL, Rodríguez-Artalejo F. Sociodemographic factors and lifestyle habits associated with weight change in the elderly in Spain. *Med Clin (Barc).* 2005;125(14):525-8.
- Leuzzi C, Sangiorgi GM, Modena MG. Gender-specific aspects in the clinical presentation of cardiovascular disease. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24(6):711-7.
- Li S, Zhao JH, Luan J, Luben RN, Rodwell SA, Khaw KT, Ong KK, Wareham NJ, Loos RJCumulative effects and predictive value of common obesity-susceptibility variants identified by genome-wide association studies *Am J Clin Nutr.* 2010;91(1):184-90.
- Li Z, Song R, Nguyen C, Zerlin A, Karp H, Naowamondhol K, Thames G, Gao K, Li L, Tseng CH, Henning SM, Heber D. Pistachio nuts reduce triglycerides and body weight by comparison to refined carbohydrate snack in obese subjects on a 12-week weight loss program. *J Am Coll Nutr.* 2010;29(3):198-203.
- Liew CF, Groves CJ, Wiltshire S et al. Analysis of the contribution to type 2 diabetes susceptibility of sequence variation in the gene encoding stearoyl-CoA desaturase, a key regulator of lipid and carbohydrate metabolism. *Diabetologia.* 2004;47:2168-2175.
- Liu G Recent advances in stearoyl-CoA desaturase 1 inhibitors for dyslipidemia and obesity. *Curr Top Med Chem.* 2010 Mar;10(4):419-33.
- Llorente-Cortés V, Estruch R, Mena MP, Ros E, González MA, Fitó M, Lamuela-Raventós RM, Badimon L Effect of Mediterranean diet on the expression of pro-atherogenic genes in a population at high cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 2010;208(2):442-50
- Loktionov A. Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases (review). *J Nutr Biochem.* 2003;14(8):426-51. Review. Erratum in: *J Nutr Biochem.*
- Loos RJ, Bouchard C. Obesity--is it a genetic disorder? *J Intern Med.* 2003;254(5):401-25.
- Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 2008;40(6):768-75.
- Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Mata P, Lichtenstein AH, Clevidence B, Judd JT, Schaefer EJ. Effect of apolipoprotein E phenotype on diet-induced lowering of plasma low density lipoprotein cholesterol. *J Lipid Res.* 1994;35(11):1965-75.

- Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPARgamma locus. *Diabetes*. 2001;50(3):686-9.
- Lucchina LA, Curtis OF 5th, Putnam P, Drewnowski A, Prutkin JM, Bartoshuk LM. Psychophysical measurement of 6-n-propylthiouracil (PROP) taste perception. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;855:816-9.
- Lukasiewicz E, Mennen LI, Bertrais S, Arnault N, Preziosi P, Galan P, Hercberg S. Alcohol intake in relation to body mass index and waist-to-hip ratio: the importance of type of alcoholic beverage. *Public Health Nutr*. 2005;8(3):315-20.
- Machowetz A., Poulsen, H. E., Gruendel, S., Weimann, A., Fito, M., Marrugat, J., de la Torre, R., et al. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in northern and southern Europeans. *FASEB J*. (2007) **21**, 45–52
- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet*. 1997;27(4):325-51
- Mahfouz MM, Valicenti AJ, Holman RT. Desaturation of isomeric trans-octadecenoic acids by rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*. 1980;618(1):1-12.
- Mainland JD, Matsunami H. Taste perception: how sweet it is (to be transcribed by you). *Curr Biol*. 2009;19(15):R655-6.
- Mangravite LM, Dawson K, Davis RR, Gregg JP, Krauss RM. Fatty acid desaturase regulation in adipose tissue by dietary composition is independent of weight loss and is correlated with the plasma triacylglycerol response. *Am J Clin Nutr*. 2007 Sep;86(3):759-67
- Mar-Heyming, R.; Miyazaki, M.; Weissglas-Volkov, D.; Kolaitis, N. A.; Sadaat, N.; Plaisier, C.; et al. Association of stearoyl-CoA desaturase 1 activity with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2008, **28**, 1193-1199.
- Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Hebebrand J, Martínez JA. Genes, lifestyles and obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Nov;28 Suppl 3:S29-36
- Martín-Campos JM, Escola-Gil JC, Ribas V, Blanco-Vaca F. Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility. *Curr Opin Lipidol* 2004; **15**: 247–253.
- Martínez-González MA, Bes-Rastrollo M. Nut consumption, weight gain and obesity: Epidemiological evidence. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2011 Jun;21 Suppl 1:S40-5.
- Marzal-Casacuberta A, Blanco-Vaca F, Ishida BY, Julve-Gil J, Shen J, Calvet-Marquez S, et al. Functional lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Biol Chem*. 1996;271:6720- 6728.
- Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2003;77(5):1098-1111.
- Mauvoisin D, Mounier C. Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie*. 2011;93(1):78-86.
- Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, De Vivo I, Willett WC, Hunter DJ. Interaction between a peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene

- polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Hum Mol Genet.* 2003 Nov 15;12(22):2923-9.
- Mendez MA, Popkin BM, Jakszyn P, Berenguer A, Tormo MJ, Sanchez MJ, et al. Adherence to a Mediterranean diet is associated with reduced 3-year incidence of obesity. *J Nutr* 2006; 136: 2934–2938.
 - Mennella JA, Pepino MY, Duke FF, Reed DR. Age modifies the genotype-phenotype relationship for the bitter receptor TAS2R38. *BMC Genet.* 2010;11:60.
 - Mennella JA, Pepino MY, Reed DR. Genetic and environmental determinants of bitter perception and sweet preferences. *Pediatrics.* 2005;115(2):e216-22.
 - Merkel M, Loeffler B, Kluger M, et al. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 2005;280:21553–60.
 - Mertens IL, Van Gaal LF. Overweight, obesity, and blood pressure: the effects of modest weight reduction *Obes Res.* 2000;8(3):270-8.
 - Meyre D, Delplanque J, Chèvre JC, Lecoœur C, Lobbens S, Gallina S, et al. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet.* 2009;41(2):157-9.
 - Michalsen A, Lehmann N, Pithan C, Knoblauch NT, Moebus S, Kannenberg F, et al. Mediterranean diet has no effect on markers of inflammation and metabolic risk factors in patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Nutr.* 2006;60(4):478-85.
 - Miller GJ, Bauer KA, Barzegar S, Cooper JA, Rosenberg RD (1996) Increased activation of the haemostatic system in men at high risk of fatal coronary heart disease. *Thromb Haemost* 75:767–771
 - Miller IJ Jr, Reedy FE Jr. Variations in human taste bud density and taste intensity perception. *Physiol Behav.* 1990;47(6):1213-9
 - Miller SA, Dykes DD, Polesky HFA simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;11;16(3):1215
 - Miyazaki, M.; Ntambi, J. M. Role of stearoyl-coenzyme a desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 2003, 68, 113-121
 - Molenaar, E.A., Massaro, J.M., Jacques, P.F., et al., 2009. Association of lifestyle factors with abdominal subcutaneous and visceral adiposity: the Framingham Heart Study. *Diabetes Care* 32 (3), 505–510.
 - Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* 1997 Jun 26;387(6636):903-8
 - Moynihan KA, Grimm AA, Plueger MM, Bernal-Mizrachi E, Ford E, Cras-Meneur C, Permutt MA, Imai S: Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2005; 2: 105– 117
 - Mullis, K.B. and Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987, 155:335-350.
 - Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, Macera CA, Castaneda-Sceppa C; American College of Sports Medicine; American Heart Association. Physical activity and public health in older adults: recommendation

- from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*. 2007;116(9):1094-105.
- Niculescu LS, Vlădică M, Sima AV. Association of APOA5 and APOC3 gene polymorphisms with plasma apolipoprotein A5 level in patients with metabolic syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):587-91
 - Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res*. 2004; 43:91–104
 - Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res*. 1999 ;40(9):1549-58.
 - Nuñez-Cordoba JM, Alonso A, Beunza JJ, Palma S, Gomez-Gracia E, Martinez-Gonzalez MA. Role of vegetables and fruits in Mediterranean diets to prevent hypertension. *Eur J Clin Nutr*. 2009;63(5):605-12.
 - Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol*. 2010;138(1):3-8.
 - Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA*. 2006 ;295(13):1549-55.
 - OMS/WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2000;894:i-xii, 1-253.
 - OMS/WHO. Obesity: preventing and managing the Global Epidemic. WHO: Geneva, 1998
 - Ooi SX, Lee PL, Law HY, Say YH. Bitter receptor gene (TAS2R38) P49A genotypes and their associations with aversion to vegetables and sweet/fat foods in Malaysian subjects. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2010;19(4):491-8.
 - O'Rahilly S, Farooqi IS, Yeo GS, Challis BG. Minireview: human obesity-lessons from monogenic disorders. *Endocrinology*. 2003;144(9):3757-64.
 - Ordovas JM, Corella D, Demissie S, Cupples LA, Couture P, Coltell O, et al. Dietary fat intake determines the effect of a common polymorphism in the hepatic lipase gene promoter on high-density lipoprotein metabolism: evidence of a strong dose effect in this gene-nutrient interaction in the Framingham Study. *Circulation*. 2002;106(18):2315-21.
 - Ordovas JM, Corella D. Nutritional genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:71-118.
 - Ordovas JM, Kaput J, Corella D Nutrition in the genomics era: cardiovascular disease risk and the Mediterranean diet. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(10):1293-9.
 - Ortiz-Moncada R, Alvarez-Dardet C, Miralles-Bueno JJ, Ruíz-Cantero MT, Dal Re-Saavedra MA, Villar-Villalba C, Pérez-Farinós N, Serra-Majem L. Social determinants of overweight and obesity in Spain 2006. *Med Clin (Barc)*. 2011 Jul 11. [Epub ahead of print] Spanish.
 - Owen RW, Giacosa A, Hull WE, et al. Oliveoil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol* 2000;1:107-112
 - Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Stefanadis C. Association between the prevalence of obesity and adherence to the Mediterranean diet: the ATTICA study. *Nutrition* 2006; 22: 449–456.

- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas Y, Stefanadis C. The association between food patterns and the metabolic syndrome using principal components analysis: The ATTICA Study. *J Am Diet Assoc* 2007;107(6):979-87; quiz 997 (D)
- Panagiotakos DB, Pitsavos C, Stefanadis C. Dietary patterns: a Mediterranean diet score and its relation to clinical and biological markers of cardiovascular disease risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16(8):559-68.
- Panagiotakos DB, Polystiopi A, Papairakleous N, Polychronopoulos E. Long-term adoption of a Mediterranean diet is associated with a better health status in elderly people; a cross-sectional survey in Cyprus. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007; 16: 331–337 (A)
- Panagiotakos DB, Tzima N, Pitsavos C, Chrysohoou C, Zampelas A, Toussoulis D, et al. The association between adherence to the Mediterranean diet and fasting indices of glucose homeostasis: the ATTICA Study. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(1):32-8.
- Panagiotakos DB, Zeimbekis A, Boutziouka V, Economou M, Kourlaba G, Toutouzias et al. Long-term fish intake is associated with better lipid profile, arterial blood pressure, and blood glucose levels in elderly people from Mediterranean islands (MEDIS epidemiological study). *Med Sci Monit* 2007;13(7):CR307-12. (C)
- Pate RR, Pratt M, Blair SN, et al. Physical activity and public health: a recommendation from the Centers for Disease and Prevention and the American College of Sports Medicine. *JAMA* 1995; 273, ps: 402-7.
- Pavón de Paz, I, Alameda C, Olivar J. Obesidad y menopausia. *Nutr Hosp* 2006;21(6):633-7.
- Peeters AV, Beckers S, Verrijken A, Mertens I, Roevens P, Peeters PJ, Van Hul W, Van Gaal LF: Association of SIRT1 gene variation with visceral obesity. *Hum Genet* 2008; 124: 431– 436
- Pepino MY, Finkbeiner S, Beauchamp GK, Mennella JA. Obese women have lower monosodium glutamate taste sensitivity and prefer higher concentrations than do normal-weight women. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(5):959-65.
- 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. *Mol Nutr Food Res*. 2007;51(10):1199-208
- Perez-Martinez P, Corella D, Shen J et al. Association between glucokinase regulatory protein (GCKR) and apolipoprotein A5 (APOA5) gene polymorphisms and triacylglycerol concentrations in fasting, postprandial, and fenofibrate-treated states. *Am J Clin Nutr* (2009) 89, 391-9.
- Pérez-Martínez P, López-Miranda J, Ordovás JM, Bellido C, Marín C, Gómez P, Paniagua JA, Moreno JA, Fuentes F, Pérez-Jiménez F. Postprandial lipemia is modified by the presence of the polymorphism present in the exon 1 variant at the SR-BI gene locus. *J Mol Endocrinol*. 2004;32(1):237-45.
- Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH: Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105(28):9793-9798. In skeletal muscle of obese

- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L: Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 2004; 429: 771– 776
- Pitsavos C, Panagiotakos D, Trichopoulou A, Chrysohoou C, Dedoussis G, Chloptsios Y, Choumerianou D, Stefanadis C. Interaction between Mediterranean diet and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation on oxidized low density lipoprotein concentrations: the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2006;16(2):91-9.
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Lentzas Y, Chrysohoou C, Das UN, et al. Diet, exercise, and C-reactive protein levels in people with abdominal obesity: the ATTICA epidemiological study. *Angiology.* 2007;58(2):225-33.
- Polychronopoulos E, Panagiotakos DB, Polystipioti. A. Diet, lifestyle factors and hypercholesterolemia in elderly men and women from Cyprus. *Lipids Health Dis.* 2005;6;4:17
- Pronin AN, Xu H, Tang H, Zhang L, Li Q, Li X. Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol.* 2007;17(16):1403-8.
- Pronin AN, Xu H, Tang H, Zhang L, Li Q, Li X. Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol.* 2007;17(16):1403-8.
- Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(4):1012-8.
- Rajaram S, Sabaté J. Nuts, body weight and insulin resistance. *Br J Nutr.* 2006;96 Suppl 2:S79-86
- Rankinen T, Bouchard C. Genetics of food intake and eating behavior phenotypes in humans. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:413-34.
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring).* 2006 Apr;14(4):529-644.
- Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Fernández-Crehuet J, Martí A. A 3-year intervention with a Mediterranean diet modified the association between the rs9939609 gene variant in FTO and body weight changes. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(2):266-72. (A)
- Razquin C, Martinez JA, Martinez-Gonzalez MA, Fernández-Crehuet J, Santos JM, Martí A. A Mediterranean diet rich in virgin olive oil may reverse the effects of the -174G/C IL6 gene variant on 3-year body weight change. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54 Suppl 1:S75-82. (B)
- Regidor E, Banegas JR, Gutiérrez-Fisac JL, Domínguez V, Rodríguez-Artalejo F. Influence of childhood socioeconomic circumstances, height, and obesity on pulse pressure and systolic and diastolic blood pressure in older people. *J Hum Hypertens.* 2006;20(1):73-82
- Renström F, Payne F, Nordström A, Brito EC, Rolandsson O, Hallmans G, Barroso I, Nordström P, Franks PW; GIANT Consortium. Replication and extension of

- genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet.* 2009;18(8):1489-96.
- Rexrode KM, Carey VJ, Hennekens CH, Walters EE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Manson JE. Abdominal adiposity and coronary heart disease in women. *JAMA.* 1998;280(21):1843-8.
 - Richard C, Couture P, Desroches S, Charest A, Lamarche B. Effect of the Mediterranean diet with and without weight loss on cardiovascular risk factors in men with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010 May 27.
 - Robinson S, Syddall H, Jameson K, Batelaan S, Martin H, Dennison EM, Cooper C, Sayer AA; Hertfordshire Study Group. Current patterns of diet in community-dwelling older men and women: results from the Hertfordshire Cohort Study. *Age Ageing* 2009;38(5):594-9.
 - Robitaille J, Pérusse L, Bouchard C, Vohl MC. Genes, fat intake, and cardiovascular disease risk factors in the Quebec Family Study. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15(9):2336-47.
 - Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P: Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 2005; 434: 113– 118
 - Romaguera D, Norat T, Mouw T, May AM, Bamia C, Slimani N, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with lower abdominal adiposity in European men and women. *J Nutr.* 2009;139(9):1728-37
 - Romaguera D, Norat T, Vergnaud AC, Mouw T, May AM, Agudo A, Buckland G, Slimani N, et al. Mediterranean dietary patterns and prospective weight change in participants of the EPIC-PANACEA project. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(4):912-21.
 - Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation.* 2004;109(13):1609-14.
 - Roselli della Rovere G, Lapolla A, Sartore G, Rossetti C, Zambon S, Minicuci N, Crepaldi G, Fedele D, Manzato E. Plasma lipoproteins, apoproteins and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients: a nine-year follow-up study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2003;13:46–51.
 - Rosmond R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology.* 2005;30(1):1-10.
 - Ross AW, Johnson CE, Bell LM, Reilly L, Duncan JS, Barrett P, et al. Divergent regulation of hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein by photoperiod in F344 rats with differential food intake and growth *J Neuroendocrinol.* 2009;21:610-9.
 - Ross R, Dagnone D, Jones PJH, Smith H, Paddags A, Hudson R, Janssen I. Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. *Ann Intern Med* 2000; 133,ps: 92-103.
 - Rough, J., Engdahl, R., Opperman, K., Yerrum, S., Monroy, M. A., and Daly, J. M. (2009) α 2 Adrenoreceptor blockade attenuates the hyperinflammatory response induced by traumatic injury. *Surgery* 145, 235–242

- Rubio MA, Gómez de la Cámara A, Del Campo J, Jurado C, García JD, Gómez - Gerique J. Prevalencia de obesidad en España tras 14 años de seguimiento de la cohorte DRECE. *Endocr Nutr* 2006; 56(Supl 1):86
- S.M. Rahman, A. Dobrzyn, P. Dobrzyn, S.H. Lee, M. Miyazaki, J.M. Ntambi, Stearoyl-CoA desaturase 1 deficiency elevates insulin-signaling components and down-regulates protein-tyrosine phosphatase 1B in muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 11,110–11,115.
- Sabaté J, Oda K, Ros E. Nut consumption and blood lipid levels: a pooled analysis of 25 intervention trials. *Arch Intern Med.* 2010;170(9):821-7.
- Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, McManus K, Champagne CM, Bishop LM, Laranjo N, Leboff MS, Rood JC, de Jonge L, Greenway FL, Loria CM, Obarzanek E, Williamson DA. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med.* 2009 ;360(9):859-73
- 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. *Eur J Clin Nutr.* 2008, 62(5):651-9
- Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B; Grupo Colaborativo de la SEEDO. SEEDO 2007 Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria. *Med Clin* 2007;128:184-96.
- Sampath H., M. Miyazaki, A. Dobrzyn, J.M. Ntambi, Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 2483-2493.
- Saris WHM. The role of exercise in the dietary treatment of obesity. *Int J Obes* 1993; 17 (suppl), ps: S17-21.
- Sattelmair JR, Pertman JH, Forman DE. Effects of physical activity on cardiovascular and noncardiovascular outcomes in older adults. *Clin Geriatr Med.* 2009;25(4):677-702, viii-ix.
- Sayon-Orea C, Bes-Rastrollo M, Nuñez-Cordoba JM, Basterra-Gortari FJ, Beunza JJ, Martinez-Gonzalez MA Type of alcoholic beverage and incidence of overweight/obesity in a Mediterranean cohort: The SUN project. *Nutrition.* 2011;27(7-8):802-8.
- Scalera G, Tarozzi G. Somatostatin administration modifies food intake, body weight, and gut motility in rat. *Scalera G, Tarozzi G. Peptides.* 1998;19:991-7.
- Scalera G. Peptides that regulate food intake: somatostatin alters intake of amino acid-imbalanced diets and taste buds of tongue in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284:1389-98.
- Schaap FG, Nierman MC, Berbée JF, et al. Evidence for a complex relationship between apoA-V and apoC-III in patients with severe hypertriglyceridemia. *J Lipid Res* 2006;47(10):2333-9
- Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, et al. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem* 2004;279:27941–7.

- Schmidhuber J, Traill WB. The changing structure of diets in the European Union in relation to healthy eating guidelines. *Public Health Nutr* 2006;9, 584–595.
- Schrauwen P. Physical activity and diabetes: current considerations. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(3):535-6.
- Schröder H, Marrugat J, Vila J, Covas MI, Elosua R. Adherence to the traditional mediterranean diet is inversely associated with body mass index and obesity in a spanish population. *J Nutr*. 2004;134(12):3355-61.
- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J, Najjar S, Nagaraja R, Orrú M, Usala G, Dei M, Lai S, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Ehret GB, Fink AA, Weder AB, Cooper RS, Galan P, Chakravarti A, Schlessinger D, Cao A, Lakatta E, Abecasis GR. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet*. 2007;3(7):e115.
- Seeler JS, Marchio A, Sitterlin D, Transy C, Dejean A. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7316-21
- Serrano-Martínez M, Martínez-González MA. Effects of Mediterranean diets on plasma biomarkers of inflammation. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(8):1035-6
- Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, et al. Dietary Intervention Randomized Controlled Trial (DIRECT) Group Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008;359(3):229-41
- Shen H, Pollin TI, Damcott CM, et al. Glucokinase regulatory protein gene polymorphism affects postprandial lipemic response in a dietary intervention study. *Hum Genet* 126(2009), 567-74
- Sherafat-Kazemzadeh R, Egtesadi S, Mirmiran P, Gohari M, Farahani SJ, Esfahani FH, et al. Dietary patterns by reduced rank regression predicting changes in obesity indices in a cohort study: Tehran lipid and glucose study. *Asia Pac J Clin Nutr* 2010;19(1):22-32.
- Slentz CA, Duscha MS, Jonson JL, et al. Effects of the amount of exercise on body weight, body composition, and measures of central obesity. STRIDDE: a randomized controlled study. *Arch Int Med* 2004; 164, ps: 31-39.
- Smith CE, Arnett DK, Corella D, Tsai MY, Lai CQ, Parnell LD, Lee YC, Ordovás JM. Perilipin polymorphism interacts with saturated fat and carbohydrates to modulate insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010 Dec 28. [Epub ahead of print]
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A, Trichopoulou A, Bamia C. Identification of change-points in the relationship between food groups in the mediterranean diet and overall mortality: an 'a posteriori' approach *Eur J Nutr*. 2011 May 4 (Epub ahead of print)
- Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*. 2008;337:a1344

- Solá R, Fitó M, Estruch R, Salas-Salvadó J, Corella D, de La Torre R, et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on apolipoproteins B, A-I, and their ratio: A randomized, controlled trial. *Atherosclerosis*. 2011 May 6 (Epub ahead)
- Sotos-Prieto M, Carrasco P, Sorlí JV, Guillén M, Guillém-Sáiz P, Quiles L, Corella D. [Coffee and tea consumption in a high cardiovascular risk Mediterranean population]. *Nutr Hosp*. 2010;25(3):388-93.
- Sotos-Prieto M, Francés F, Corella D. [Impact of apolipoprotein A5 on cardiovascular risk. Genetic and environmental modulation]. *Rev Med Chil*. 2010;138(7):868-80
- Sotos-Prieto M, Guillén M, Guillem-Sáiz P, Portolés O, Corella D. The rs1466113 polymorphism in the somatostatin receptor 2 gene is associated with obesity and food intake in a Mediterranean population. *Ann Nutr Metab*. 2010;57(2):124-31
- Sotos Prieto M, Guillen M, Sorlí JV, Asensio EM, Gillem Sáiz P, González JI, Corella D. [Meat and fish consumption in a high cardiovascular risk Spanish Mediterranean population]. *Nutr Hosp*. 2011;26(5):1033-40
- Sotos-Prieto M, Zulet MA, Corella D. [Scientific evidence of the mediterranean diet effects in determining intermediate and final cardiovascular disease phenotypes]. *Med Clin (Barc)*. 2010;134(1):22-9.
- Sriwijitkamol A, Christ-Roberts C, Berria R, Eagan P, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Mandarino LJ, Musi N Reduced skeletal muscle inhibitor of β content is associated with insulin resistance in subjects with type 2 diabetes: reversal by exercise training. *Diabetes* 2006, 55:760–767
- Stefan N, A. Peter, A. Cegan, H. Staiger, J. Machann, F. Schick, C.D. Claussen, A. Fritsche, H.U. Haring, E. Schleicher, Low hepatic stearyl-CoA desaturase 1 activity is associated with fatty liver and insulin resistance in obese humans, *Diabetologia* 51 (2008) 648-656
- Stepanyan Z, Kocharyan A, Behrens M, Koebnick C, Pyrski M, Meyerhof W. Somatostatin, a negative-regulator of central leptin action in the rat hypothalamus. *J Neurochem*. 2007;100:468-78.
- Stephens JW, Hurel SJ, Cooper JA, Acharya J, Miller GJ, Humphries SE. A common functional variant in the interleukin-6 gene is associated with increased body mass index in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Mol Genet Metab* 2004;82:180–186.
- Sternsdorf T, Jensen K, Reich B, Will H. The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem*. 1999 30;274(18):12555-66
- Stunkard AJ, Harris JR, Pedersen NL, McClearn GE. The body-mass index of twins who have been reared apart. *N Engl J Med*. 1990;322(21):1483-7
- Suárez C, del Arco C, Sáez T, Blanco F, Ruiz JM, Alonso M, Gabriel R. Ambulatory blood pressure monitoring in the aged. The EPICARDIAN study. The EPICARDIAN Work Group. *Rev Esp Cardiol*. 1998;51(12):965-71.
- Swain DP, Franklin BA. Comparison of cardioprotective benefits of vigorous versus moderate intensity aerobic exercise. *Am J Cardiol*. 2006;97(1):141-7

- Szostecki, C.; Guldner, H. H.; Netter, H. J.; Will, H. Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. *J. Immun.* 145: 4338-4347, 1990.
- Tachibana T, Cline MA, Sugahara K, Ueda H, Hiramatsu K. Central administration of somatostatin stimulates feeding behavior in chicks. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;161:354-9.
- Tai ES, Collins D, Robins SJ, O'Connor JJ Jr, Bloomfield HE, Ordovas JM, Schaefer EJ, Brousseau ME. The L162V polymorphism at the peroxisome proliferator activated receptor alpha locus modulates the risk of cardiovascular events associated with insulin resistance and diabetes mellitus: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial (VA-HIT). *Atherosclerosis.* 2006;187(1):153-60.
- Talmud PJ, Cooper JA, Hattori H, Miller IP, Miller GJ, Humphries SE. The apolipoprotein A-V genotype and plasma apolipoprotein A-V and triglyceride levels: prospective risk of type 2 diabetes. Results from the Northwick Park Heart Study II. *Diabetologia* 2006;49(10):2337-40.
- Talmud PJ, Palmen J, Putt W, Lins L, Humphries SE. Determination of the functionality of common APOA5 polymorphisms. *J Biol Chem* 2005;280(31):28215-20.
- Tauriainen E, Luostarinen M, Martonen E, Finckenberg P, Kovalainen M, Huotari A, Herzig KH, Lecklin A, Mervaala E. Distinct effects of calorie restriction and resveratrol on diet-induced obesity and Fatty liver formation. *J Nutr Metab.*;2011:525094.
- Tepper BJ, Christensen CM, Cao J. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiol Behav.* 2001;73(4):571-7.
- Tepper BJ, Koelliker Y, Zhao L, Ullrich NV, Lanzara C, d'Adamo P, Ferrara A, Ulivi S, Esposito L, Gasparini P. Variation in the bitter-taste receptor gene TAS2R38, and adiposity in a genetically isolated population in Southern Italy. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(10):2289-95 (B)
- Tepper BJ, White EA, Koelliker Y, Lanzara C, d'Adamo P, Gasparini P. Genetic variation in taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil and its relationship to taste perception and food selection. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1170:126-39.
- Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature.* 2010;466(7307):707-13.
- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, et al. Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet.* 2009;41(1):18-24
- Timpson NJ, Christensen M, Lawlor DA, Gaunt TR, Day IN, Ebrahim S, Davey Smith G. TAS2R38 (phenylthiocarbamide) haplotypes, coronary heart disease traits, and eating behavior in the British Women's Heart and Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(5):1005-11.
- Torrisani J, Bouisson M, Puente E, Capellà G, Laurent-Puig P, Berger A, et al. Transcription of SST2 somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology.* 2001;120:200-9.

- Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Kawano S, Shigemoto R, Toyoshima K. Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae. *Cell Tissue Res.* 2003;313(1):29-35.
- Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* 2003;348(26):2599-608
- Tsuji M, Nakamura K, Tamai Y, Wada K, Sahashi Y, Watanabe K, Ohtsuchi S, Ando K, Nagata C. Relationship of intake of plant-based foods with 6-n-propylthiouracil sensitivity and food neophobia in Japanese preschool children. *Eur J Clin Nutr.* 2011 (Eupub ahead of print)
- 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 Health Dis.* 2007;6:22.
- US Department of Health and Human Services (PHS). (1996). Physical activity and health. A report of the Surgeon General (Executive Summary). Pittsburgh, PA: Superintendent of Documents.
- Vague P, Vague J, Jubelin J, Barré A. Forms of obesity and metabolic disorders. *Verh Dtsch Ges Inn Med.* 1987;93:448-62
- Van 't Hooft FM, Ruotolo G, Boquist S, de Faire U, Eggertsen G, Hamsten A. Human evidence that the apolipoprotein A-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Circulation* 2001; 104: 1223–1228.
- Van Dam RM. New approaches to the study of dietary patterns. *Br J Nutr* 2005;93(5):573-4.
- Van den Berg SW, Dollé ME, Imholz S et al. Genetic variations in regulatory pathways of fatty acid and glucose metabolism are associated with obesity phenotypes: a population-based cohort study. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:1143–1152.
- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature.* 2006;444(7121):875-80.
- Varela-Moreiras G, Avila JM, Cuadrado C, del Pozo S, Ruiz E, Moreiras O. Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr.* 2010;64 Suppl 3:S37-43.
- Varo JJ, Martínez-González MA, Martínez JA. Obesity prevalence in Europe. *An Sist Sanit Navar.* 2002;25 Suppl 1:103-8.
- Vernay M, Malon A, Oleko A, Salanave B, Roudier C, Szego E, Deschamps V, Hercberg S, Castetbon K. Association of socioeconomic status with overall overweight and central obesity in men and women: the French Nutrition and Health Survey 2006. *BMC Public Health.* 2009;9:215.
- Veses Alcobendas AM, Marcos A. Grupo de Inmunonutrición. Asociación entre el consumo moderado de cerveza tradicional y sin alcohol y la composición corporal. 2010. Departamento de Metabolismo y Nutrición. Instituto del Frío, CSIC. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina y Odontología (UPV/EHU).

- Vincent-Baudry S, Defoort C, Gerber M, Bernard MC, Verger P, Helal O, et al. The Medi-RIVAGE study: reduction of cardiovascular disease risk factors after a 3-mo intervention with a Mediterranean-type diet or a low-fat diet. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(5):964-71
- Vioque J, Quiles J (dirs.). Encuesta de nutrición y salud de la Comunidad. Historia de la Ciencia y Ginecología, Universidad Miguel Hernández; 2003.
- Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, et al. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride level, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem* 2003;278:17982-5.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. Physical activity and mortality in older men with diagnosed coronary heart disease. *Circulation* 2000, 19;102(12):1358-63.
- Warensjö E, Ingelsson E, Lundmark P et al. Polymorphisms in the SCD1 gene: associations with body fat distribution and insulin sensitivity. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15:1732-1740.
- Welch AA, Lund E, Amiano P, Dorronsoro M, Brustad M, Kumle M, et al. Variability of fish consumption within the 10 European countries participating in the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Public Health Nutr* 2002;5(6B):1273-85.
- Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93: 14788-14794.
- Wessel TR, Arant CB, Olson MB, Johnson BD, Reis SE, Sharaf BL, Shaw LJ, Handberg E, Sopko G, Kelsey SF, Pepine CJ, Merz NB Relationship of physical fitness vs body mass index with coronary artery disease and cardiovascular events in women. *JAMA*. 2004;292(10):1179-87.
- Weyrich P, Machicao F, Reinhardt J, Machann J, Schick F, Tschrutter O, Stefan N, Fritsche A, Haring HU: SIRT1 genetic variants associate with the metabolic response of Caucasians to a controlled lifestyle intervention: the TULIP study. *BMC Med Genet* 2008; 9: 100
- Widén E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med*. 1995;333(6):348-51.
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, et al. Genetic Investigation of ANthropometric Traits Consortium. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet*. 2009n;41(1):25-34.
- Wunderlich, F.T., Luedde, T., Singer, S., Schmidt-Supprian, M., Baumgartl, J., Schirmacher, P., Pasparakis, M., and Bruning, J.C. Hepatic NF-kappa B essential modulator deficiency prevents obesity-induced insulin resistance but synergizes with high-fat feeding in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 1297-1302
- Yeomans MR, Prescott J, Gould NJ. Acquired hedonic and sensory characteristics of odours: influence of sweet liker and propylthiouracil taster status. *Q J Exp Psychol (Colchester)*. 2009;62(8):1648-64

- Yeomans MR, Tepper BJ, Rietzschel J, Prescott J. Human hedonic responses to sweetness: role of taste genetics and anatomy. *Physiol Behav.* 2007;91(2-3):264-73
- Yu W, Fu YC, Chen CJ, Wang X, Wang W. SIRT1: a novel target to prevent atherosclerosis. *J Cell Biochem.* 2009;108(1):10-3.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L; INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364(9438):937-52
- Zazpe I, Estruch R, Toledo E, Sánchez-Taínta A, Corella D, Bulló M, Fiol M, Iglesias P, Gómez-Gracia E, Arós F, Ros E, Schröder H, Serra-Majem L, Pintó X, Lamuela-Raventós R, Ruiz-Gutiérrez V, Martínez-González MA. Predictors of adherence to a Mediterranean-type diet in the PREDIMED trial. *Eur J Nutr.* 2010;49(2):91-9
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1;372(6505):425-32.
- Zhao L, Kirkmeyer SV, Tepper BJ. A paper screening test to assess genetic taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil *Physiol Behav.* 2003;78(4-5):625-33.
- Zhao SP, Hu S, Li J, et al. Association of human serum apolipoprotein A5 with lipid profiles affected by gender. *Clin Chim Acta* 2007;376(1-2):68-71.
- Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, Amin N, Hofman A, Oostra BA, Sijbrands EJ, Witteman JC, Pols HA, van Duijn CM, Uitterlinden AG. SIRT1 genetic variation is related to BMI and risk of obesity. *Diabetes.* 2009;58(12):2828-34
- Zillikens MC, van Meurs JB, Rivadeneira F, Hofman A, Oostra BA, Sijbrands EJ, et al. Interactions between dietary vitamin E intake and SIRT1 genetic variation influence body mass index. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1387-93

Figura 1.1 Porcentaje de obesidad global en el mundo (Kelly et al. Int J Obes 2008).....	35
Figura 1.2 Tendencia de la obesidad en adultos según NHANES (Flegal et al. Int J Obes 1998. Ogden et al. JAMA 2006. Ogden et al. JAMA 2010).	36
Figura 1.3 Tasas de obesidad en adultos en Europa, 2008. Fuente: OECD datos de salud 2010, Eurostat statistics database, WHO global infobase.	37
Figura 1.4 Incremento exponencial de riesgo de mortalidad por exceso de peso. Índice de Masa Corporal versus mortalidad. (Adams KF et al., 2006 NEJM).	38
Figura 1.5 Distribucion de la prevalencia de la obesidad por áreas geográficas y sexo. Estudio DORICA (Aranceta et al, 2004).....	39
Figura 1.6 Porcentaje de causas de muerte en Europa en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) (Fuente: Steven et al, European Cardiovascular Disease Statistics, 2008).	40
Figura 1.7 Porcentaje de muertes debidas a ECV y por sexo en España según el informe de la SEC, 2009.....	41
Figura 1.8 Representación esquemática de cómo la obesidad en fumadores afecta a las ECV (Van Gaal LF et al, 2006, Nature).....	45
Figura 1.9 Tanto el exceso de grasa visceral como la insulino resistencia (IR) contribuyen a la ECV en la obesidad. La grasa visceral contribuye a la disfunción endotelial con un efecto directo en las adipokinas, las cuales son secretadas por el tejido adiposo. La IR inducida por las citokinas (IL-6, TNF-alfa, y adiponectina), los AGL y la RBP-4 inducen el estrés oxidativo y la subsecuente disfunción endotelial (PAI-1 y ICAM-1). Esto conlleva una disfunción endotelial y prematuro proceso aterosclerótico (Van Gaal LF et al, 2006, Nature)	46

Figura 1.10 Metabolismo de las lipoproteínas como papel principal de la aterogénesis. (Hegele RA. Nature Genetics, 2009).....	49
Figura 1.11 Metabolismo de las lipoproteínas (Mesa García et al, 2006)	51
Figura 1.12 Tamaño del efecto para el riesgo de obesidad en el descubrimiento de los loci de susceptibilidad genética para la obesidad para los estudios de asociación genética para el IMC y el riesgo de obesidad extrema. El tamaño del efecto se representa por el incremento de la odds ratio de obesidad para cada alelo de riesgo adicional. (Frayling et al, 2007; Loos et al, 2008; Willer et al, 2009; Thorleifsson et al, 2009; Meyre et al, 2009).	62
Figura 1.13 Función del SCD-1 en el metabolismo de lípidos en el hígado.....	64
Figura 1.14 Función de la SIRT1 en condiciones de restricción calórica.....	66
Figura 1.15 Genes identificados mediante GWAs asociados con las concentraciones de TG. (Willer CJ et al, 2008).....	69
Figura 1.16 Metabolismo lipídico (Corella y Ordovas, 2005).....	71
Figura 1.17 Estructura del gen de la <i>APOA5</i> y constitución de los principales haplotipos. (Tomado de Pennacchio et al, 2002).....	74
Figura 1.18 Control de la actividad de la glucocinasa por la proteína reguladora de glucocinasa y por metabolitos (www.icp.ucl.ac.be/grm/Images/glucoquinase.jpg).....	76
Figura 1.19 Diagrama esquemático de las acciones del PAI-1 como molécula fibrogénica (tomado de Hertig A et al, 2004).....	78
Figura 1.20 Nutrición Personalizada. El término de genómica nutricional se refiere a la nutrigenómica y nutrigenética. La aplicación de la nueva tecnología para la búsqueda del conocimiento de la secuencia del genoma humano ha conducido al estudio de las nuevas “ómicas” para entender las bases moleculares de la enfermedad. Estas disciplinas son la transcriptómica, proteómica y metabolómica que permiten obtener información acerca de fenotipos característicos. Toda esta información contribuirá a crear dietas personalizadas (Tomada del libro: Sustainable Agriculture and New Biotechnologies (ISBN: 9781439825044) capítulo Sustainable Agriculture and New Biotechnologies).	84
Figura 1.21 Localización de los receptores de los diferentes sabores en la lengua y distribución de las papilas gustativas en la lengua (http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/073/htm/sec_10.htm).....	93

Figura 1.22 Receptores del sabor dulce (TAS1R2 y TAS1R3) (A). Cambios en la región promotora de CC a TT reducen la transcripción de la subunidad TAS1R3. Sujetos con el alelo TT tienen reducida la sensibilidad a la sacarosa en comparación con los CC (Mainland JD y Matsunami H, 2009).....	97
Figura 1.23. Cualidades del sabor, receptores y detección del sabor así como ejemplos de los estímulos naturales. Dulce, ácido, amargo, salado y umami son detectados por las papilas gustativas. (Chaudhari N y Roper SD, JCell Biol, 2010).	100
Figura 3. 1. Identificador de los participantes incluido en cada cuestionario	108
Figura 3.2. Cuestionario de adherencia a la DM de 14 puntos (validado por Schröder H et al, 2011)	111
Figura 3.3 Recogida de muestras biológicas y protocolo de fraccionamiento de alícuotas y almacenamiento.	115
Figura 3.4 a) Diseño del estudio INDIMED.	117
Figura 3.5 Cronograma del estudio INDIMED	124
Figura 3.6 Tanita BC-420-S portable.....	128
Figura 3.7 Imagen ilustrativa de los tres posibles genotipos obtenidos en un ensayo típico con sondas SimpleProbe tomadas del software Ligh typer (Roche inc.).....	141
Figura 3.8 Imagen del mecanismo de funcionamiento del sistema Taqman. Tomado de Taqman Genotyping Systems product bulletin. Applied Biosystems Inc.	143
Figura 3.9. Determinación de los genotipos a punto final, discriminación alélica de fluorescencia (software SDS 2.3, Applied Biosystems).	145
Figura 3.10 Tubo de extracción de ARN sanguíneo (PAXgene™ Preanalytix) y procedimiento de extracción de la sangre.	146
Figura 3.11 Maxwell® 16 Instrument (AS2000).....	148
Figura 3.12 Nanofotómetro (NanoPhotometer™, a la izquierda) y Bioanalizador Agilent 2100 junto con los chips.	149
Figura 3.13. Resultados obtenidos del electroferograma con el Bioanalizador Agilent 2100 para medir la calidad del ARN en una muestra del estudio INDIMED.	149

Figura 3.14 Diagrama de flujo para la obtención del c-DNA.....	151
Figura 3.15 PCR cuantitativa, expresión génica del control endógeno y gen de estudio (software SDS 3.2, RQ Manager, Applied Biosystems).....	153
Figura 3.16 Esquema del protocolo para la realización del ensayo de expresión génica.....	154
Figura 3.17 ELISA Sandwich (http://www.i-detect.eu/en_produ.php)	156
Figura 3.18. Disoluciones utilizadas para el sabor amargo.....	157
Figura 3.19 Panel de sabores amargos.....	158
Figura 3.20 Disoluciones utilizadas para el sabor dulce (sacarosa), salado, ácido y umami (glutamato)	159
Figura 3.21 Escala de evaluación de la percepción del sabor.	161
Figura 4.1 Porcentaje de individuos por sexo según adición al tabaco en la muestra estudiada.....	176
Figura 4.2 Porcentaje de individuos que han obtenido cada una de las puntuaciones posibles con el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos. División por cuartiles.....	189
Figura 4.3 Asociación del polimorfismo rs7561317 del gen <i>TMEM18</i> con valores de cintura según sexo.....	205
Figura 4.4 A) Porcentaje de individuos con hipertrigliceridemia según genotipo en hombres. B) Porcentaje de individuos con hipercolesterolemia según genotipo en hombres.	228
Figura 4.5 Medias estimadas de triglicéridos según el genotipo para el polimorfismo S19W del gen <i>APOA5</i>	230
Figura 4.6 Asociación entre el S19W y -1131T>C y las concentraciones de APOA5 (ng/ml). Los datos son expresados como media±DT. P valor para el log de las concentraciones de APOA5.	233
Figura 4.7 Asociación del polimorfismo -30G>A en el gen <i>GCK</i> con concentraciones de triglicéridos según sexo.	235
Figura 4.8 Concentraciones medias de triglicéridos (mg/dL) por sexo según el genotipo (rs1260326 (P446L) del gen <i>GCKR</i>	239
Figura 4.9 Porcentaje de hipertrigliceridemia en mujeres según genotipo.	240

- Figura 4.10** Interacción rs7138803 del gen *FAIM2**tabaco ajustado por edad, sexo, actividad física..... 244
- Figura 4.11** Interacción rs7138803 del gen *FAIM2**actividad física (AF) ajustado por edad, sexo..... 244
- Figura 4.12** Valores del índice de masa corporal (A) y circunferencia de la cintura (B) en función de la adherencia a la dieta mediterránea (ADM) y el consumo de frutos secos (FS) respectivamente según el polimorfismo rs7561317 del gen *TMEM18* Valores de P ajustados por sexo, edad, actividad física y tabaco..... 245
- Figura 4.13** Valores del índice de masa corporal en función de la actividad física según el polimorfismo rs2568958 del gen *NEGR1*. Valores de P ajustados por sexo, edad, diabetes y tabaco..... 246
- Figura 4.14** Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo rs2167444 del gen *SCD1*. Valores de P ajustados por sexo, edad, tratamiento hipolipemiente e IMC..... 247
- Figura 4.15** Interacción entre el polimorfismo rs5082 en el gen *APOA2* y la ingesta de ácidos grasos saturados (AGS) para el IMC. Las medias fueron ajustadas por sexo, edad, tabaco, consumo de alcohol, diabetes, tratamiento hipolipemiente e ingesta de energía. (Corella et al, 2011)..... 248
- Figura 4.16** Valores de las medias estimadas de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo -1131T>C-adherencia a la dieta mediterránea (ADM). Valores de P estimada para la variable log TG, ajustados por sexo, edad, obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta. TG: triglicéridos..... 250
- Figura 4.17** Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo -1131T>C-hábito tabáquico. Valores de P ajustados por sexo, edad, IMC y tratamiento hipolipemiente en la comparación de los genotipos en función del hábito tabáquico..... 252
- Figura 4.18** Valores de las medias estimadas de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo S19W-actividad física (AF). Valores de P estimados para log TG ajustados por sexo, edad, IMC, tratamiento hipolipemiente en la comparación de los genotipos en función de la actividad física. TG: triglicéridos..... 253

Figura 4.19 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de glucosa para el modelo de interacción del polimorfismo rs1799884 del gen <i>GCK</i> -adherencia a la dieta mediterránea (ADM). Valores de P estimados para glucosa en ayunas ajustados por sexo, edad y obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta.....	254
Figura 4.20 Valores de las medias estimadas de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo del rs1260326 (P446L) del gen <i>GCKR</i> -adherencia a la dieta mediterránea. Valores de P ajustados por sexo, edad, obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta.....	255
Figura 4.21 Concentraciones de TG de acuerdo con los efectos conjuntos del consumo de AOV (en cucharadas (cuch), <4cuch y ≥4 cuch) y el modelo genético dominante (PP vs PL+LL). Los análisis fueron ajustados por edad, sexo, IMC, Tabaco, diabetes y tratamiento hupolipemiente. (Artículo enviado para publicar, Sotos-Prieto M et al, BJN 2011).....	258
Figura 4.22 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de la concentración de triglicéridos para el modelo de interacción del polimorfismo rs6950982 del gen de la <i>SERPINE1</i> -adherencia a la dieta mediterránea. Valores de P estimados para logTG ajustados por sexo, edad y obesidad en la comparación de los genotipos en función de los cuartiles de dieta. (Q1+Q2+Q3: Grupo 1,2,3 de adherencia a la dieta mediterránea; Q4: grupo 4 grupo mas alto de adherencia a la dieta mediterránea).....	259
Figura 4.23 Origen geográfico según la comunidad autónoma de nacimiento en la población INDIMED.....	262
Figura 4.24 Situación civil según sexo en la población INDIMED.....	262
Figura 4.25 Razones por las cuales aumentaron de peso.....	268
Figura 4.26 Desayuna todos los días según sexo.....	270
Figura 4.27 Almuerza todos los días según sexo.....	271
Figura 4.28 Merienda todos los días según sexo.....	271
Figura 4.29 Cena todos los días según sexo.....	272
Figura 4.30 Comida más abundante según sexo.....	272
Figura 4.31 Momento en el que pica entre comidas según sexo.....	273

Figura 4.32 Frecuencia del tipo de actividad practicada por sexo para la ACTIVIDAD1.	274
Figura 4.33 Frecuencia del tipo de actividad practicada por sexo para la ACTIVIDAD2.	274
Figura 4.34 Frecuencia del tipo de actividad practicada por sexo para la ACTIVIDAD3.	275
Figura 4.35 Porcentaje de fumadores en la actualidad, no fumadores y exfumadores. (INDIMED).	277
Figura 4.36 Porcentaje de individuos que han obtenido cada una las puntuaciones posibles con el cuestionario de adherencia a la Dieta Mediterránea de 14 puntos. División por cuartiles.	293
Figura 4.37 Consumo de bebidas amargas (tónica/bitter, vino tinto, cerveza) en veces por semana en la población general.	309
Figura 4.38 Consumo de grupo de carnes y sardinas en veces por semana en la población general en función de la percepción del sabor salado a distintas concentraciones (100mM y 200mM).	314
Figura 4. 39 Diferencias de colesterol (mg/dL) en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en función del grupo de intervención en el estudio INDIMED.	325
Figura 4. 40 Diferencias de IMC (mg/dL) en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en función del grupo de intervención en el estudio INDIMED.	326
Figura 4.41 Diferencias de TAS (tensión arterial sistólica) (mmHg) en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en función del grupo de intervención en el estudio INDIMED.	326
Figura 4.42 Cambios en la adherencia a la dieta mediterránea tras el periodo de intervención en el estudio INDIMED. ADM: Adherencia a la dieta mediterránea.	331
Figura 4.43 Asociación del polimorfismo rs5082 en el gen de la <i>APOA2</i> y variables antropométricas en mujeres en el estudio INDIMED. A) Asociación con el IMC. B) Asociación con la circunferencia de la cintura. C) Asociación con la circunferencia de la cadera.	336
Figura 4.44 A. Concentraciones medias de triglicéridos (mg/dL) por grupos de edad según el genotipo (rs1260326 P446L) del gen <i>GCKR</i> . B. Concentraciones medias de apolipoproteína B (mg/dL) por	

- grupos de edad según el genotipo (rs1260326 (P446L) del gen *GCKR* en el estudio INDIMED. 340
- Figura 4.45** Índice de masa Corporal (A) y circunferencia de la cintura (B) según la adherencia a la dieta mediterránea (más de la puntuación media de la muestra estudiada o menos de la media al inicio del estudio) y el polimorfismo rs5082 del gen *APOA2* en el estudio INDIMED. P valor ajustado por edad y sexo. Los valores son representados como media y barras de error para el error estandar. 341
- Figura 4.46** Concentración media de triglicéridos según la adherencia a la dieta mediterránea (más de la puntuación media de la muestra estudiada o menos de la media al inicio del estudio) en el estudio INDIMED. Los valores de p son los obtenidos las diferencias de medias del logaritmo de la concentración de TG ajustados por edad, sexo y IMC basal. Los valores son representados como media y barras de error para el error estandar. 343
- Figura 4.47** Diferencias en el consumo de energía total basal (kcal) en función del haplotipo AVI/PAV en el estudio INDIMED. 347
- Figura 4.48** Cambio en el número de veces de la expresión de *POLK* según los grupos de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=18), aceite de oliva virgen (AOV, n=18), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=18). 350
- Figura 4.49** Cambios en la expresión relativa de *POLK* desde el estado basal hasta después de los tres meses de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=18), aceite de oliva virgen (AOV, n=18), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=18). 350
- Figura 4.50** Cambio en el número de veces de la expresión de *SIRT1* según los grupos de intervención. . Grupo control (n=16), aceite de oliva virgen (AOV, n=27), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=20). 351
- Figura 4.51** Cambios en la expresión relativa de *SIRT1* desde el estado basal hasta después de los tres meses de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=16), aceite de oliva virgen (AOV, n=27), Frutos secos (FS, n=14), Dieta Mediterránea (DM, n=20). 352
- Figura 4.52** Cambio en el número de veces de la expresión de *SIRT1* según los grupos de intervención en el estudio INDIMED. Grupo control (n=16), aceite de oliva virgen (AOV, n=27)+ Frutos secos (FS, n=14)+Dieta Mediterránea (DM, n=20). 352

Tabla 1. 1 Clasificación del IMC según los criterios de SEEDO-2007 en adultos. (consenso SEEDO, 2007).....	43
Tabla 1.2 Circunferencia de la cintura según los criterios de la ATP III y la IDF para definir obesidad central.....	43
Tabla 1.3 Estudios nutrigenéticos (interacción gen-dieta) de intervención nutricional u observacionales llevados a cabo para el estudio la obesidad, metabolismo de lípidos y parámetros relacionados.	87
Tabla 1.4 Estudios nutrigenómicos relacionados.....	89
Tabla 1.5 Genes y polimorfismos más comúnmente estudiados en relación al sabor amargo (Feeney E et al, 2011).....	96
Tabla 1.6. Genes y polimorfismos más comúnmente estudiados en relación al sabor dulce (Eny KM et al, 2010).	98
Tabla 1.7 Genes y polimorfismos más comúnmente estudiados en relación al sabor umami.	99
Tabla 3.1 Relación de los genes y polimorfismos de estudio, localización, posición y cambio de base.	135
Tabla 3.2 Relación de componentes del mix de reacción de PCR para cada uno de los fragmentos amplificados.....	137
Tabla 3.3 Primers y enzimas utilizadas para cada polimorfismo así como la temperatura de anillamiento, de incubación y el tamaño de los fragmentos.....	139
Tabla 3.4 Primers utilizados para el genotipado por LightTyper, temperatura de anillamiento y el tamaño del amplicón.	140
Tabla 3.5 Temperatura de pérdida de fluorescencia de la sonda	141
Tabla 3.6 Composición de la mezcla de reacción para la PCR a tiempo real.....	144
Tabla 3.7 Criterios de calidad en el análisis de expresión génica.....	150

Tabla 4.1	Características sociodemográficas, antropométricas, clínicas y bioquímicas de la muestra estudiada.....	172
Tabla 4.2	Prevalencias de las variables clínicas de la población estudiada.	173
Tabla 4.3	Concentraciones de triglicéridos, parámetros relacionados y medidas antropométricas en función de la actividad física.	175
Tabla 4.4	Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del hábito tabáquico.	177
Tabla 4.5	Valores de frecuencia y porcentaje de individuos agrupados en función a su nivel de estudios, en la muestra estudiada.....	177
Tabla 4.6	Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del nivel de estudios de la muestra estudiada	178
Tabla 4.7	Valores de frecuencia y porcentaje de individuos agrupados en función de su situación laboral, en la muestra estudiada.	179
Tabla 4. 8	Caracterización general de la dieta en la población general de estudio.	180
Tabla 4.9	Consumo expresado en veces por semana de lácteos en la población.	181
Tabla 4.10	Consumo expresado en veces por semana de cereales y legumbres en la población.	182
Tabla 4. 11	Consumo expresado en veces por semana de carnes y pescados en la población.	183
Tabla 4. 12	Consumo expresado en veces por semana de verduras y frutas en la población.	184
Tabla 4. 13	Consumo expresado en veces por semana de aceites y grasas en la población.	185
Tabla 4.14	Frecuencia de consumo de alimentos semanal entre los individuos de edad inferior a 67,3 o mayor o igual a 67,3 años.	187
Tabla 4.15	Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas entre semana por sexo en la población PREDIMED.	188
Tabla 4.16	Porcentaje de individuos que se adhieren más o menos a la dieta mediterránea teniendo en cuenta la condición de obesidad o diabetes.	190
Tabla 4.17	Correlaciones entre el consumo de alimentos en veces por semana y las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la población general.	191

Tabla 4.18 Comparación de la frecuencia de consumo (veces/semana) de alimentos en una muestra que presenta o no obesidad.....	192
Tabla 4.19 Comparación de la frecuencia de consumo de alimentos (veces/semana) en una muestra que presenta o no diabetes.....	193
Tabla 4.20 Correlaciones entre el consumo de bebidas en veces por semana y fenotipos intermedios de riesgo cardiovascular en la población general.....	193
Tabla 4.21 Frecuencia genotípica de los polimorfismos en genes implicados en parámetros antropométricos y relacionados.....	194
Tabla 4.22 Frecuencia genotípica de los polimorfismos en genes implicados en el metabolismo lipídico.....	196
Tabla 4.23 Frecuencia alélica en los polimorfismos de genes implicados en parámetros antropométricos en la población de PREDIMED.	197
Tabla 4.24 Frecuencia alélica en los polimorfismos de genes implicados en el metabolismo lipídico en la población de PREDIMED	198
Tabla 4.25 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs1466113 del gen <i>SSRT2</i>	200
Tabla 4.26 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.....	201
Tabla 4.27 Riesgo de obesidad asociado con el polimorfismo rs1466113 en el gen <i>SSTR2</i> . Estimaciones en crudo y ajustadas para hombres y mujeres.....	201
Tabla 4.28 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs7138803 del gen <i>FAIM2</i>	202
Tabla 4.29 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.....	203
Tabla 4.30 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs7561317 del gen <i>TMEM18</i>	204
Tabla 4.31 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo.	206
Tabla 4.32 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs2568958 del gen <i>NEGR1</i>	207
Tabla 4.33 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo.....	208

Tabla 4.34 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs2167444 del gen <i>SCD1</i>	209
Tabla 4.35 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo.	210
Tabla 4.36 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs508384 del gen <i>SCD1</i>	211
Tabla 4.37 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo.	212
Tabla 4.38 Riesgo de obesidad asociado con el polimorfismo rs508384 en el gen <i>SCD1</i> . Estimaciones en crudo y ajustadas para hombres y mujeres.	212
Tabla 4.39 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs3818292 del gen <i>SIRT1</i>	213
Tabla 4.40 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.	214
Tabla 4.41 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs7069102 del gen <i>SIRT1</i>	215
Tabla 4.42 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.	216
Tabla 4.43 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs5082 del gen <i>APOA2</i>	217
Tabla 4.44 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.	218
Tabla 4.45 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs17020112 del gen <i>IKKE</i>	219
Tabla 4.46 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.	220
Tabla 4.47 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs10863430 del gen <i>IKKE</i>	221
Tabla 4.48 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.	222
Tabla 4.49 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs3748022 del gen <i>IKKE</i>	223

Tabla 4.50 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.....	224
Tabla 4.51 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs10863389 del gen <i>IKKE</i>	225
Tabla 4.52 Porcentaje de individuos que muestran obesidad y sobrepeso según su genotipo.....	226
Tabla 4.53 Valores de las variables lipídicas de la población según los diferentes genotipos.....	227
Tabla 4.54 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo en la población general.....	228
Tabla 4.55 Valores de las variables lipídicas de la población según los diferentes genotipos.....	229
Tabla 4.56 Datos de asociación del polimorfismo S19W del gen <i>APOA5</i> para la concentración de triglicéridos entre hombres y mujeres.....	231
Tabla 4.57 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo.....	231
Tabla 4.58 Concentraciones de APOA5 (ng/ml) de acuerdo con las variants - 1131T>C y S19W en el gen <i>APOA5</i> en hombres y mujeres.....	233
Tabla 4.59 Valores de las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados según los diferentes genotipos.....	234
Tabla 4.60 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo en la población general.....	236
Tabla 4.61 Riesgo de hipertrigliceridemia y diabetes asociado al polimorfismo - 30G>A del gen <i>GCK</i> . Estimación cruda y ajustada.....	237
Tabla 4.62 Valores de las variables lipídicas de la población general según los diferentes genotipos del rs1260326 (P446L) del gen <i>GCKR</i>	238
Tabla 4.63 Porcentaje de individuos que muestran ciertos factores de riesgo cardiovascular según su genotipo.....	239
Tabla 4.64 Riesgo de hipertrigliceridemia asociado al polimorfismo P446L del gen <i>GCKR</i> . Estimación cruda y ajustada.....	240
Tabla 4.65 Datos de asociación para el polimorfismo rs695098 del gen <i>SERPINE1</i> en población general.....	241

Tabla 4.66 Valores de las medias estimadas y error típico (ET) de IMC, cintura para el modelo de interacción del polimorfismo del rs1466113 del gen del <i>SSRT2</i> -adherencia a la dieta mediterránea.	242
Tabla 4.67 Consumo de energía, nutrientes en hombres y mujeres en función del polimorfismo rs1466113 en el gen <i>SSTR2</i>	243
Tabla 4.68 Asociación entre rs10863430 del gen <i>IKKE</i> y la obesidad dependiendo de la alta o baja adherencia a la dieta mediterránea. Análisis logístico multivariante.	249
Tabla 4.69 Interacción y efecto conjunto de los principales componentes de la dieta mediterránea (14 puntos) y el polimorfismo del gen <i>GCKR</i> en las concentraciones de TG (mg/dL).	257
Tabla 4.70 Valores medios de los parámetros antropométricos y bioquímicos en la población general y por sexo.	264
Tabla 4.71 Antecedentes clínicos en la población INDIMED.	265
Tabla 4.72 Obesidad, factores relacionados y antecedentes familiares en la población INDIMED general y por sexo.	266
Tabla 4.73 Hábitos dietéticos por sexo en la población de Indimed por sexo.	270
Tabla 4.74 Parámetros antropométricos en función de la actividad física.	276
Tabla 4.75 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función de la actividad física.	276
Tabla 4.76 Parámetros antropométricos en función del hábito tabáquico.	278
Tabla 4.77 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del hábito tabáquico.	278
Tabla 4.78 Parámetros antropométricos en función del nivel de estudios de la muestra estudiada.	279
Tabla 4.79 Concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en función del nivel de estudios de la muestra estudiada.	280
Tabla 4.80 Caracterización general de la dieta en la población general de estudio.	281
Tabla 4.81 Consumo expresado en veces por semana de lácteos en la población.	282
Tabla 4.82 Consumo expresado en veces por semana de cereales y legumbres en la población.	283

Tabla 4.83 Consumo expresado en veces por semana de carnes y pescados en la población.....	284
Tabla 4.84. Consumo expresado en veces por semana de verduras y frutas en la población.....	285
Tabla 4.85 Consumo expresado en veces por semana de aceites y grasas en la población.....	286
Tabla 4.86 Consumo expresado en veces por semana de dulces y bollería en la población.....	287
Tabla 4.87 Frecuencia de consumo de alimentos semanal por grupo de alimentos.....	288
Tabla 4.88 Frecuencia de consumo de alimentos semanal entre los individuos de edades comprendidas entre 25-44 años y 45-55 años.	290
Tabla 4.89 Frecuencia de consumo de alimentos semanal entre los individuos de edades comprendidas 25-44 y 45-55 años.....	291
Tabla 4.90 Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas entre semana por sexo en la población INDIMED.....	292
Tabla 4.91 Frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas entre semana por sexo en la población INDIMED.....	292
Tabla 4.92 Porcentaje de individuos que se adhieren más o menos a la dieta mediterránea teniendo en cuenta la condición de obesidad.	294
Tabla 4.93 Comparación de la frecuencia de consumo de alimentos (veces/semana) obeso y no obesos.....	295
Tabla 4.94 Correlaciones entre el consumo de alimentos en veces por semana y parámetros antropométricos en la población general.....	296
Tabla 4.95 Correlaciones entre el consumo de bebidas alcohólicas en veces por semana y parámetros antropométricos en la población general.....	297
Tabla 4.96 Correlaciones entre el consumo de alimentos en veces por semana y concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la población general.	297
Tabla 4.97 Correlaciones entre el consumo de bebidas alcohólicas en veces por semana y las concentraciones de triglicéridos y parámetros relacionados en la población general.	298
Tabla 4.98 Prevalencia de las preferencias alimentarias en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.	299

Tabla 4.99	Prevalencia de las preferencias a los distintos sabores en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”..	300
Tabla 4.100	Prevalencia de las preferencias alimentarias en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.....	301
Tabla 4.101	Prevalencia de las preferencias a los distintos sabores en función de la respuesta “desagrado total”, “neutro”, “bueno”, “sabor favorito”.....	303
Tabla 4.102	Preferencia del consumo de leche entera y su asociación con variables antropométricas en la población.....	304
Tabla 4.103	Preferencia del consumo de frutos secos y su asociación con variables antropométricas en la población.....	304
Tabla 4.104	Preferencia del consumo de carne roja y su asociación con variables antropométricas en la población.....	305
Tabla 4.105	Preferencia del consumo de leche entera y su asociación con variables antropométricas en la población.....	305
Tabla 4.106	Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor amargo por el compuesto PTC y PROP según las distintas concentraciones testadas.....	307
Tabla 4.107	Consumo de alimentos (veces/semana) en función de no catadores, catadores medios y super catadores para el sabor amargo (PTC y el PROP en concentraciones extremas) en la población general.....	308
Tabla 4.108	Preferencia por el sabor dulce y amargo en función de no catadores, catadores medios y super catadores para el sabor amargo (PTC y el PROP en concentraciones extremas) en la población general.....	309
Tabla 4.109	Parámetros antropométricos en función de la percepción del sabor amargo PROP y PTC en la población general.....	310
Tabla 4.110	Puntuación en la percepción del sabor amargo mediante el test de sabores PTC y PROP.....	311
Tabla 4.111	Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor dulce por el compuesto sacarosa según las distintas concentraciones testadas.....	312
Tabla 4.112	Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la	

percepción del sabor umami por el compuesto glutamato monosódico según las distintas concentraciones testadas.....	313
Tabla 4.113 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor salado por el compuesto cloruro sódico según las distintas concentraciones testadas.	314
Tabla 4.114 Porcentaje de individuos (%) de la población que responden “nada, un poco, moderado, fuerte muy fuerte y extremadamente fuerte” a la percepción del sabor ácido por el compuesto ácido cítrico según las distintas concentraciones testadas.....	315
Tabla 4.115 Características basales de la población INDIMED.....	317
Tabla 4.116 Media de cambios en variables antropométricas desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED	319
Tabla 4.117 Media de cambios en la presión arterial y otras variables bioquímicas desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED.....	320
Tabla 4.118 Media de cambios en el metabolismo de lípidos desde basal hasta las 10 semanas de intervención en el estudio INDIMED.	322
Tabla 4.119 Cambios de la ingesta de energía y nutrientes tras el periodo de intervención en el estudio INDIMED.	327
Tabla 4.120 Cambios en la adherencia a la DM según los 14 puntos estudiados tras el periodo de intervención en cada uno de los grupos en el estudio INDIMED.....	329
Tabla 4.121 Cambios en la adherencia a la dieta mediterránea según sobrepeso en el estudio INDIMED.	331
Tabla 4.122 Porcentaje de participantes según variables sociodemográficas y fisiológicas que tienen que obtuvieron cambios en la adherencia a la dieta mediterránea de mas de 4 puntos o menos en el estudio INDIMED.	332
Tabla 4.123 Frecuencia genotípica de los polimorfismos estudiados en el estudio INDIMED.....	333
Tabla 4.124 Valores de las variables antropométricas de la población general según los diferentes genotipos del rs2568958 del gen <i>NEGR1</i> en el estudio INDIMED.....	334
Tabla 4.125 Porcentaje de individuos que muestran sobrepeso y obesidad según su genotipo en el estudio INDIMED.....	335

Tabla 4.126	Valores de las variables lipídicas de la población según el SNP rs5082 en el gen <i>APOA2</i> en el estudio INDIMED.....	337
Tabla 4.127	Valores de las variables lipídicas de la población según los diferentes genotipos (S19W en el gen <i>APOA5</i>) en el estudio INDIMED.	338
Tabla 4.128	Valores de las variables lipídicas de la población general según los diferentes genotipos del rs1260326 (P446L) del gen <i>GCKR</i> en el estudio INDIMED.....	339
Tabla 4.129	Cambios en la concentración de triglicéridos (mg/dL) tras el periodo de intervención según el polimorfismo S19W en el gen <i>APOA5</i> en el estudio INDIMED.....	342
Tabla 4.130	Cambios en la concentración de triglicéridos (mg/dL) tras el periodo de intervención según el polimorfismo rs1260326 (P446L) en el gen <i>GCKR</i> en el estudio INDIMED.....	342
Tabla 4.131	Distribución genotípica de los polimorfismos estudiados en el gen <i>TAS238</i> en el estudio INDIMED.	344
Tabla 4.132	Puntuación obtenida en el test de sabor amargo con PTC a diferentes concentraciones en función de los tres polimorfismos estudiados en el gen <i>TAS2R28</i> en el estudio INDIMED.....	345
Tabla 4.133	Puntuación obtenida en el test de sabor amargo con PROP a diferentes concentraciones en función de los tres polimorfismos estudiados en el gen <i>TAS2R28</i> en el estudio INDIMED.....	345
Tabla 4.134	Consumo de los principales grupos de alimentos (veces/semana) en función del haplotipo AVI/PAV en el estudio INDIMED.	347
Tabla 4.135	Porcentaje de cambio de medidas antropométricas tras la intervención en función del haplotipo AVI/PAV en el estudio INDIMED.	348
Tabla 4.136	Asociación entre las concentraciones de triglicéridos y los genotipos para los SNPS rs1260326 (P446L) <i>GCKR</i> gen y rs1799884 (-30G>A) en el gen <i>GCK</i> en la población del estudio de las Enfermeras (Nurses' Health Study).....	354
Tabla 4.137	Interacción gen*adherencia a la dieta mediterránea para la enfermedad coronaria. Dos grupos de adherencia a la dieta mediterránea fueron creados.	355

