



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Ensayo clínico aleatorizado para determinar la eficacia de un
nutracéutico a base de frutas, bayas y verduras frente a la
peroxidación lipídica

Autor:

D. Raúl Arcusa Saura

Directores:

Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero

Dr. D. Javier Marhuenda Hernández

Murcia, septiembre de 2022



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Ensayo clínico aleatorizado para determinar la eficacia de un
nutracéutico a base de frutas, bayas y verduras frente a la
peroxidación lipídica

Autor:

D. Raúl Arcusa Saura

Directores:

Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero

Dr. D. Javier Marhuenda Hernández

Murcia, septiembre de 2022



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero y el Dr. D. Javier Marhuenda Hernández como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Ensayo clínico aleatorizado para determinar la eficacia de un nutracéutico a base de frutas, bayas y verduras frente a la peroxidación lipídica” realizada por D. Raúl Arcusa Saura en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero en Murcia a 06 de septiembre de 2022.

A blue ink signature, appearing to be 'P. Zafrilla', written over a light blue grid background.

A black ink signature, appearing to be 'J. Marhuenda', written over a light blue grid background.

UCAM



EIDUCAM
Escuela Internacional
de Doctorado

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por:

- El programa de potenciación de recursos humanos, y la convocatoria propia de contratos predoctorales de la UCAM para la formación de personal investigador.

CAPÍTULOS DE LIBRO DERIVADOS DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

1. Arcusa R, Zafrilla P, Marhuenda J. Sports nutrition and performance. *Nutr Heal Dis Challenges Now Forthcom Time*. 2019;
2. Zafrilla P, Mulero J, Cerdá B, Arcusa R, Marhuenda J. Compuestos bioactivos presentes en la dieta mediterránea y sus efectos en la prevención de enfermedades neurodegenerativas. In: *Alternativas de comunicación S.L., editor. Química Agrícola*. 1ª edición. Murcia; 2021. p. 341–62.
3. Arcusa R, Marhuenda J, García-Viguera C, Villaño D. Approaching Actual Strategies and New Perspectives for the Prevention and Treatment of Diabetes. *Diabetes A Multidiscip Approach*. 2022;192.
4. Ballester P, Zafrilla P, Arcusa R, Galindo A, Cerdá B, Marhuenda J. Food as a Dietary Source of Melatonin and Its Role in Human Health: Present and Future Perspectives. In: *Functional Food*. IntechOpen; 2022.
5. Cerdá B, Marhuenda J, Arcusa R, Villaño D, Ballester P, Zafrilla P. Ginger in the Prevention of Cardiovascular Diseases. In: *Functional Food*. IntechOpen; 2022.

ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA DURANTE EL PERIODO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

1. Marhuenda Hernández J, Arcusa Saura R, Serna Oñate A, Montesinos DV, Sánchez Macarro M, Abellán Ruiz MS, et al. La calidad de las pastas frente al arroz es determinante en el control del hambre y el apetito: estudio comparativo de pasta y arroz. *Rev Española Nutr Humana y Dietética*. 2020;24(3):268–77.

2. Marhuenda J, Perez-Pinero S, Arcusa R, Victoria-Montesinos D, Canovas F, Sanchez-Macarro M, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to determine the effectiveness of a polyphenolic extract (Hibiscus sabdariffa and Lippia citriodora) for reducing blood pressure in prehypertensive and type 1 hypertensive subjects. *Molecules*. 2021;26(6):1783.
3. Carrillo JÁ, Arcusa R, Zafrilla MP, Marhuenda J. Effects of Fruit and Vegetable-Based Nutraceutical on Cognitive Function in a Healthy Population: Placebo-Controlled, Double-Blind, and Randomized Clinical Trial. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021 Jan;10(1).
4. Marhuenda J, Villaño D, Arcusa R, Zafrilla P. Melatonin in Wine and Beer: Beneficial Effects. *Molecules*. 2021;26(2):343.
5. Victoria-Montesinos D, Arcusa R, Garcia-Munoz AM, Perez-Pinero S, Sanchez-Macarro M, Avellaneda A, et al. Effects of the Consumption of Low-Fat Cooked Ham with Reduced Salt Enriched with Antioxidants on the Improvement of Cardiovascular Health: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients*. 2021;13(5):1480.
6. Arcusa R, Carrillo JÁ, Xandri-Martínez R, Cerdá B, Villaño D, Marhuenda J, et al. Effects of a Fruit and Vegetable-Based Nutraceutical on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Status in the Plasma of a Healthy Population: A Placebo-Controlled, Double-Blind, and Randomized Clinical Trial. *Molecules*. 2021 Jun;26(12).
7. Serna A, Marhuenda J, Arcusa R, Pérez-Piñero S, Sánchez-Macarro M, García-Muñoz AM, et al. Effectiveness of a polyphenolic extract (Lippia citriodora and Hibiscus sabdariffa) on appetite regulation in overweight and obese grade I population: An 8-week randomized, double-blind, cross-over, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr*. 2022;61(2):825–41.
8. Arcusa R, Villaño D, Marhuenda J, Cano M, Cerdà B, Zafrilla P. Potential Role of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in the Prevention of Neurodegenerative Diseases. *Front Nutr*. 2022;9:809621.
9. Arcusa R, Carrillo JÁ, Cerdá B, Durand T, Gil-Izquierdo Á, Medina S, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Capacity of a Fruit and Vegetable-Based Nutraceutical Measured by Urinary Oxylipin Concentration in a Healthy Population: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Antioxidants*. 2022;11(7):1342.

RESUMEN

TÍTULO: Ensayo clínico aleatorizado para determinar la eficacia de un nutracéutico a base de frutas, bayas y verduras frente a la peroxidación lipídica

Introducción: La literatura científica ha documentado ampliamente el rol que juegan diversos factores modificables, como la dieta y el estilo de vida en la salud y en la prevención de enfermedades no transmisibles. En el caso de la dieta, es especialmente a través del consumo de frutas y verduras por su alto contenido en compuestos bioactivos, donde destacan los polifenoles. Sin embargo, la población no alcanza las recomendaciones diarias de frutas y verduras recomendadas por las autoridades sanitarias. En cuanto a los polifenoles, son metabolitos secundarios de las plantas que se sintetizan como mecanismo de defensa, y solo pueden ingerirse a través de productos vegetales. Poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras entre otras, ejerciendo un efecto neutralizante de radicales libres y especies reactivas mediante transferencia de electrones desapareados, haciendo frente al estrés oxidativo y peroxidación lipídica.

A diferencia de las vitaminas, los polifenoles necesitan un consumo a largo plazo para presentar efectividad. En este contexto, el mercado ofrece cada vez un mayor número de productos, como es el caso de nutracéuticos con alto contenido en polifenoles, para facilitar el consumo de sustancias bioactivas al consumidor.

Objetivo: El objetivo de la presente investigación fue evaluar la eficacia del consumo a largo plazo de un nutracéutico con alto contenido en polifenoles, frente a marcadores de peroxidación lipídica en orina y marcadores de inflamación en plasma.

Materiales y métodos: Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, cruzado, con dos ramas, controlado con placebo, estratificado por sexo y unicéntrico.

Resultados: Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la evolución entre grupos al final de la intervención en el contenido total de oxilipinas ($p < 0.001$) y en el contenido total de isoprostanos ($p < 0.001$). Así como en la evolución de diferentes prostanoïdes, observándose reducciones en los de carácter proinflamatorio como 15-keto-PGF_{2α}, 11-β-PGF_{2α} y 2,3-dinor-

11 β -PGF_{2 α} ($p < 0.05$), e incrementos en la PGE₂ ($p < 0.05$) de carácter antiinflamatoria. Respecto a la peroxidación lipídica del sistema nervioso central, también se observaron mejoras significativas en cuanto al 4-F_{4t}-Neurprostano ($p < 0.05$) y F_{2t}-dihomo-isoprostano ($p < 0.001$). En cuanto a biomarcadores plasmáticos, también se observaron mejoras con reducciones significativas en la LDL oxidada, sTNFR₁ ($p < 0.05$) e incrementos en la HDL colesterol ($p < 0.05$).

Conclusiones: El consumo de un nutracéutico con alto contenido polifenólico durante un periodo prolongado de 16 semanas, produce mejoras en la peroxidación lipídica sistémica, así como del sistema nervioso central y en marcadores de inflamación.

Palabras clave: Polifenoles, estrés oxidativo, oxilipinas, inflamación.

ABSTRACT

TITLE: Randomized clinical trial to determine the efficacy of a fruit, berry and vegetable-based nutraceutical against lipid peroxidation.

Introduction: Scientific literature has widely documented the role played by various modifiable factors such as diet and lifestyle in health and in the prevention of non-communicable diseases. In the case of diet, it is especially through the consumption of fruits and vegetables due to their high content of bioactive compounds, where polyphenols stand out. However, the population does not reach the daily recommendations of fruits and vegetables recommended by the health authorities. Polyphenols are secondary metabolites of plants, synthesized as defense mechanisms and can only be ingested through vegetable products. They have antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties, among others, exerting a neutralizing effect on free radicals and reactive species through the transfer of unpaired electrons, thus combating oxidative stress and lipid peroxidation.

Unlike vitamins, polyphenols require long-term consumption to be effective. In this context, the market offers an increasing number of products such as nutraceuticals with a high polyphenol content to facilitate the consumption of bioactive substances by the consumer.

Objective: The objective of the present investigation was to evaluate the efficacy of long-term consumption of a nutraceutical with high polyphenol content against markers of lipid peroxidation in urine and markers of inflammation in plasma.

Methodology: Randomized, double-blind, crossover, two-branch, placebo-controlled, sex-stratified, single-center clinical trial.

Results: Statistically significant differences were observed when comparing the evolution between groups at the end of the intervention in the total content of oxylipins ($p < 0.001$) and in the total content of isoprostanes ($p < 0.001$). As well as in the evolution of different prostanoids, reductions were observed in those of a proinflammatory nature such as 15-keto-PGF_{2α}, 11-β-PGF_{2α} and 2,3-dinor-11β-PGF_{2α} ($p < 0.05$) and increases in PGE₂ ($p < 0.05$) of an anti-inflammatory nature.

Regarding central nervous system lipid peroxidation significant improvements were also observed for 4-F_{4t}-Neurprostane ($p < 0.05$) and F_{2t}-dihomo-isoprostanes ($p < 0.001$). In terms of plasma biomarkers, improvements were also observed with significant reductions in OxLDL, sTNFR₁ ($p < 0.05$) and increases in HDL cholesterol ($p < 0.05$).

Conclusions: The consumption of a nutraceutical with high polyphenolic content for a prolonged period of 16 weeks in healthy population reduces systemic and central nervous system lipid peroxidation, and inflammation biomarkers.

Keywords: Polyphenols, oxidative stress, oxylipins, inflammation.

AGRADECIMIENTOS

Parece que puede ser complejo escribir esta parte de la tesis y más para alguien introvertido como yo que no suele mostrar sus emociones, pero cuando uno sabe de dónde viene y de quien se rodea las palabras salen solas. Además, como dice un buen amigo mío, es de buen nacido ser agradecido.

En primer lugar, a mis padres, que siempre están ahí y que gracias a su educación y valores han forjado mi personalidad y quienes desde pequeño me inculcaron una frase “el que algo quiere algo le cuesta”.

En primer lugar, también, a mis directos de tesis, Pilar y Javi ya que gracias a ellos puedo decir que “si he logrado ver más lejos ha sido porque he subido a hombros de gigantes” y eso es lo que sois vosotros dos gigantes. Mil gracias por todo lo aprendido de vosotros estos 4 años a nivel académico, de investigación, pero sobre todo por el trato personal y de confianza desde el primer día, en alguien que no conocíais ni le habíais dado clase. A veces es clave estar en lugar correcto en el momento adecuado y considero que es la suerte que tuve cuando acabé el master y surgió la opción de una beca predoctoral con vosotros.

A todo el equipo de farmacia que me ha hecho sentir como uno más, aunque yo al principio tuviera ese respeto de estar en el departamento con los que habían sido mis profesores, pero los chistes de Alfonso ayudaban. Gracias a Begoña, Alejandro, Victoria, Alfonso, Ignacio, Cristina, Marien y especialmente Débora que, aunque ya no esté de forma presencial siempre está cuando se le necesita y es de las personas que más he aprendido y a Pura que llegó más tarde y sin su ayuda no sé cómo me las habría arreglado para impartir mis primeras prácticas de bioquímica.

A Juan Ángel, sin tu idea y trabajo nada de esto hubiera sido posible y ahora mismo no estaría escribiendo estas palabras. Todavía recuerdo las horas rotulando eppendorfs.

A la catedra de fisiología, gracias a vosotros empecé a introducirme en el mundo de la investigación como alumno interno y a día de hoy seguimos colaborando en proyectos juntos. Y al departamento de Nutrición Humana y Dietética donde en cierto modo empezó todo y tengo grandes compañeros.

A José Manuel y Gabi que siempre están para lo que necesite cuando tengo prácticas en los laboratorios, trabajo en la sombra que no se ve. Así como Antonio Martínez en fisiología. A Desi y Ana por el apoyo (si no venís ayer no consigo poner el formato a las páginas). A todos voluntarios en los estudios de intervención como al personal de enfermería especialmente Maysa.

Al personal del CEBAS especialmente a Sonia, Raúl, Ángel y mis dos amigos y compañeros Adrián y Federico (*Coffee?, Yes of course*)

A Marta por partida doble, la primera recomendarme a Javi y después ayudarnos durante todo el periodo de intervención. Sin ti tampoco hubiera sido posible. La semana que viene empezamos con tu tesis y conseguiremos esa beca.

A mis compañeros del HiTech que me hubiera gustado conocer mucho antes ya que estos últimos meses han sido un gran apoyo, aprendizaje y momentos de desconexión a la vez. Dennis, Noelia, Cindy, María Clara, Iván, Camilo, Rubén², Pepa, Silvia y especial mención a la reciente doctora Begoña y mi gran amigo Ramiro que va a ser el mejor de todos si es que no lo es ya.

A mi amigo y compañero de fatigas Antonio T.G. que también le queda poco para ser doctor y es un pozo de sabiduría a la vez que una caja de sorpresas.

A mi amigo Royo (doctor en historia), aún me acuerdo el día que nos vimos de casualidad en la UJI, le comenté que me planteaba irme a Murcia un par de años y me dijo vete sin dudar, bueno pues ya van 7 años, eso sí, deja de mandarme WhatsApp todos días a ver si he depositado ya.

A mi otro amigo Pedro otro gran doctor e investigador que defendió la tesis hace escasos meses, persona de gran ayuda desde que hice el TFG en su día y al que da gusto contarle tus proyectos.

Como no a Josu y Paco, dos grandes amigos que te da la vida y dos grandes enfermeros. Costó, pero después de 3 años conseguimos que Paco hiciese el TFG.

Y para acabar a mi familia, es duro estar a casi 400 km, no poder ir los fines de semana, pasar una pandemia y estar casi un año sin ir. Afortunadamente siempre estáis ahí, orgulloso de vosotros y de mis raíces.

"El secreto de mi éxito fue rodearme de personas mejores que yo". Andrew Carnegie (1835-1919).

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

SIGLAS Y ABREVIATURAS	23
I - INTRODUCCIÓN	33
1.1 ALIMENTACIÓN Y SALUD.....	33
1.1.1 Concepto de salud.....	33
1.1.2 Estilo de vida y salud.....	33
1.1.3 Dieta mediterránea.....	34
1.2 POLIFENOLES	36
1.2.1 Definición	36
1.2.2 Clasificación de polifenoles	37
1.2.3 Ingesta de polifenoles	39
1.3 ESTRÉS OXIDATIVO	41
1.3.1 Definición de estrés oxidativo	41
1.3.2 Radicales libres	41
1.3.3 Actividad antioxidante y polifenoles	44
1.3.4 Sistemas antioxidantes	44
1.4 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	45
1.4.1 Prostanoides y leucotrienos	47
1.4.2 Isoprostanos	50
1.4.3 Neuroprostanos y F _{2t} -dihomo-Isoprostanos.....	54
1.5 BIOMARCADORES PLASMÁTICOS	56
1.5.1 Marcadores proinflamatorios	57
1.5.2 Marcadores de riesgo lipídico	59
1.5.3 Marcadores asociados a riesgo cardiovascular	59
1.5.4 Vitaminas.....	60
1.5.5 Catecolaminas y cortisol.....	61
1.5.6 Función tiroidea.....	62
II - JUSTIFICACIÓN	65
III - OBJETIVOS.....	69
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	69
3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	69
IV - MATERIAL Y MÉTODO	73
4.1 PRODUCTO EN INVESTIGACIÓN	73

4.2 DISEÑO EL ESTUDIO.....	75
4.2.1 Fases previas a la intervención.....	75
4.2.2 Desarrollo del estudio.....	77
4.3 TOMA DE MUESTRAS DE PLASMA Y ORINA.....	80
4.4 VARIABLES A ESTUDIO	81
4.4.1 Variable principal.....	81
4.4.2 Variables secundarias	85
4.5 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE OXILIPINAS, NEUROPROSTANOS Y F ₂ -DIHOMO- ISOPROSTANOS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS	87
4.6 ANALISIS DE OXILIPINAS MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS	88
4.7 ANALISIS DE NEUROPROSTANOS Y F _{2t} -DIHOMO-ISOPROSTANOS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QqQ-MS/MS.....	88
4.8 ESTADÍSTICA	89
4.9 CONFIDENCIALIDAD.....	90
V - RESULTADOS.....	93
5.1 POBLACIÓN A ESTUDIO.....	93
5.2 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA GENERALIZADA ..	95
5.2.1 Prostanoides.....	95
5.2.2 Isoprostanos	100
5.2.3 Oxilipinas totales.....	103
5.3 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPIDICA ESPECÍFICOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	105
5.3.1 F _{2t} -dihomo-IsoProstanos	106
5.3.2 Neuroprostanos	108
5.4 BIOMARCADORES EN PLASMA	108
5.4.1 Biomarcadores relacionados con inflamación.....	110
5.4.2 Biomarcadores de riesgo cardiovascular	113
5.4.3 Perfil lipídico.....	114
5.4.4 Vitaminas.....	115
5.4.5 Catecolaminas.....	115
5.4.6 Función tiroidea.....	117
5.4.7 Parámetros de seguridad	119
VI - DISCUSIÓN.....	123
6.1 Vías enzimáticas	125
6.1.1 COX	125
6.2 Vías no enzimáticas.....	127
6.2.1 Isoprostanos	127
6.2.2 Neuroprostanos y F ₂ -dihomo-Isoprostanos	128

6.2.3	Contenido total de Oxilipinas.....	131
6.3	Biomarcadores plasmáticos	132
VII	CONCLUSIONES.....	141
VIII	-LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	145
IX	- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AdA	Ácido adrénico
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido alfa-linolénico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxigenasa
CYP	Citocromo p450
DGLA	Ácido dihomo-gamma-linoleico;
DHA	Ácido docosahexaenoico
ECV	Enfermedad cardiovascular
EFSA	<i>European Food Safety Agency</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EXT	Producto en investigación
FDA	<i>Food Drug Administration</i>
GPCR	Receptores acoplados a proteína G
GPx	Glutatión peroxidasa
GSH	Glutatión
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IBMM	<i>Institut des Biomolecules Max Mosseron</i>
IMC	Índice de masa corporal
IsoPs	Isoprostanos
IL	Interleucina
LKs	Leucotrienos
LOX	Lipoxigenasa

MDA	Malondialdehído
Nrf2	factor 2 relacionado con el factor nuclear E2
OMS	Organización Mundial de la Salud
OxLDL	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
PCR	Proteína C reactiva
PGs	Prostaglandinas
PLA	Placebo
PLA ₂	Fosfolipasa A2
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
Prx	Peroxirredoxina
RAE	Real Academia Española
RL	Radicales Libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
MRM	Monitorización de reacciones múltiples
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear E2
SD	Desviación estándar
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
SPE	Extracción en fase sólida
sTNFR ₁	Receptor soluble del factor de necrosis tumoral 1
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral Alpha
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
TXs	Tromboxanos
UCAM	Universidad Católica San Antonio de Murcia
XO	Xantina oxidasa

ÍNDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del fenol. Adaptado de Mc Murry y cols (40).....	37
Figura 2. Esqueleto básico de un flavonoide. Extraída de Del Río y cols (23).....	37
Figura 3. Estructura de (a) aglicona de quercetina (b) glucósido de quercetina. Adaptada de Del Rio y cols (23).....	38
Figura 4. Donación de electrón de un antioxidante al radical libre para estabilizarlo. Elaboración propia	45
Figura 5. Metabolismo del ácido araquidónico. Elaboración propia.....	47
Figura 6. Formación y relación metabólica de las familias de prostanoïdes y leucotrienos. Adaptada de Libia y cols (83).	48
Figura 7. Biosíntesis de isoprostanos de tipo A, D, E, F y J, y de epoxi-isómeros. Elaboración propia.....	51
Figura 8. Ruta de síntesis neuroprostanos y F2-dihomo-Isoprostanos. Elaboración propia.....	55
Figura 9. Representación gráfica del estudio. V significa visita.....	79
Figura 10. Resumen de las rutas de oxilipinas cuantificadas en el presente estudio. Las oxilipinas cuantificadas están resaltadas en color negro. Elaboración propia.	84
Figura 11. Diagrama de flujo del estudio.	94
Figura 12. Evolución de PG derivadas de la ruta D durante la intervención.....	97
Figura 13. Evolución de la PGE ₂ durante la intervención.....	97
Figura 14. Evolución de la 15-keto-PGF _{2α} durante la intervención.....	98
Figura 15. Evolución de la suma de prostanoïdes totales durante la intervención.	99
Figura 16. Evolución 2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15F _{2t} durante la intervención.	101
Figura 17. Evolución 2,3-dinor-15F _{2t} durante la intervención.	101
Figura 18. Evolución de la ent-PGF _{2α} durante la intervención.	102
Figura 19. Evolución del total de Isoprostanos durante la intervención.	103
Figura 20. Evolución de la suma de oxilipinas totales durante la intervención...	104
Figura 21. Evolución de 17- <i>epi</i> -17-F _{2t} -dihomo durante la intervención.....	106
Figura 22. Evolución de 17-F _{2t} -dihomo durante la intervención.....	107
Figura 23. Evolución de <i>ent</i> -7(RS)-7-F _{2t} -dihomo durante la intervención.....	107
Figura 24. Evolución de 4-F _{4t} -Neurop durante la intervención.....	108

Figura 25. Evolución de la LDL-Oxidada durante la intervención.....	111
Figura 26. Evolución de la PCR durante la intervención.	111
Figura 27. Evolución de sTNFR1 durante la intervención.....	112
Figura 28. Evolución de TNF- α durante la intervención.....	113
Figura 29. Evolución de Homocisteína durante la intervención.....	113
Figura 30. Evolución del colesterol HDL durante la intervención.....	114
Figura 31. Evolución de la noradrenalina durante la intervención	116
Figura 32. Evolución de dopamina durante la intervención.	117
Figura 33. Evolución de T3 durante la intervención.	118
Figura 34. Evolución de T4 durante la intervención.	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de vegetarianos. Adaptada de Argüelles 2016 (8).	34
Tabla 2. Clasificación de flavonoides más comunes. Adaptada de Kumar y cols (41).	38
Tabla 3. Clasificación de especies reactivas más comunes. Adaptada de Sies y colaboradores (63).	43
Tabla 4. Cronograma de visitas realizadas durante el estudio.	79
Tabla 5. Isoprostanos analizados en la presente investigación y ruta metabólica.	82
Tabla 6. Prostanoides analizados en la presente investigación y ruta metabólica.	83
Tabla 7. Neuroprostanos y F _{2t} -dihomo-Isoprostanos analizados en la presente investigación.	85
Tabla 8. Características demográficas de la población que finalizó la intervención.	93
Tabla 9. Evolución de los diferentes prostanoides en orina medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.	95
Tabla 10. Evolución de los diferentes isoprostanos en orina medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.	100
Tabla 11. Evolución de las oxilipinas totales en orina medidas durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.	104
Tabla 12. Evolución de neuroprostanos en orina medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.	105
Tabla 13. Evolución de los diferentes biomarcadores en plasma medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo (basal) y final de la intervención.	109

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado	185
ANEXO 2. Encuesta de alimentación y actividad física.....	187

I - INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1.1 ALIMENTACIÓN Y SALUD

1.1.1 Concepto de salud

La salud se puede considerar como un concepto abstracto, cuya definición ha ido sufriendo numerosas modificaciones durante la historia, en función del momento cultural de la época. Si bien, de acuerdo con la definición acuñada por la organización mundial de la salud (OMS), la salud se define como “estado de completo bienestar físico, mental y social, y no solamente la ausencia de afecciones o enfermedades”, definición que no se ha modificado desde el año 1948 (1,2).

1.1.2 Estilo de vida y salud

Es conocido cómo el estilo de vida afecta de forma directa a la salud, siendo la actividad física y la nutrición dos de los principales factores modificables que pueden contribuir a una mejora o deterioro de esta. Factores relacionados como el tabaquismo, ingesta excesiva de alcohol, inactividad física y dietas poco saludables, están estrechamente relacionadas con enfermedades crónicas (3). Desafortunadamente, en los últimos años el ser humano se ha adaptado a un estilo de vida cada vez más sedentario, junto a un entorno con fácil acceso a alimentos hipercalóricos y poco saludables (4). Lo cual ha desencadenado que las enfermedades no transmisibles, como las cardiovasculares, hayan superado a la enfermedades transmisibles a nivel mundial (5). No obstante, la modificación de ciertos hábitos alimentarios y del estilo de vida, podrían reducir considerablemente la prevalencia de las primeras (6).

1.1.3 Dieta mediterránea

De forma errónea, se suele utilizar el término dieta a un periodo de restricción calórica, o a seguir un tipo de alimentación que incluye o excluye ciertos alimentos concretos. Sin embargo, de acuerdo a su etimología, dicha palabra deriva del latín *diaeta*, y este del griego *δίαιτα*, cuyo significado es “régimen de vida” (7). Atendiendo a la primera acepción del término dieta de la Real Academia Española (RAE), en el presente contexto parece más adecuado emplear su segunda definición; “conjunto de sustancias que regularmente se ingieren como alimento”.

En caso de querer clasificar un tipo de dietas u otro, en primera instancia se podría realizar una distinción entre dietas vegetarianas y dietas omnívoras, que a su vez se verán subclasificadas en función de diversos factores.

En el caso de dietas vegetarianas, según la *International Vegetarian Union* “el vegetarianismo se define como una dieta compuesta por alimentos de origen vegetal con o sin productos lácteos, huevos y/o miel” (8). En la tabla 1, se muestra una categorización de diferentes tipos de dietas vegetarianas, donde se emplea el término vegetariano cuando la alimentación es exclusivamente vegetal, mientras que si se consumen lácteos, huevos o miel se debe especificar con el prefijo que corresponda. En el caso de los veganos, además de alimentación exclusivamente vegetal, se evitan todos productos que puedan derivar de animales (ropa, cosméticos, etc.) (8,9).

Tabla 1. Clasificación de vegetarianos. Adaptada de Argüelles 2016 (8).

	Huevos	Lácteos	Miel	Carne	Pescado y marisco	Lana, cuero
Ovolacto-vegetarianos	SI	SI	¿?	NO	NO	¿?
Lacto-vegetarianos	NO	SI	¿?	NO	NO	¿?
Ovo-vegetarianos	SI	NO	¿?	NO	NO	¿?
Vegetarianos estrictos	NO	NO	NO	NO	NO	¿?
Veganos	NO	NO	NO	NO	NO	NO

Respecto a las dietas omnívoras, también se pueden clasificar en diferentes grupos, atendiendo a diversos motivos como restricción de algún tipo de alimento, restringir franjas horarias, periodización de macronutrientes, etc. (10–14). Entre los diferentes tipos destacan;

- Ayuno intermitente.
- Dieta paleo.
- Dieta baja en hidratos de carbono.
- Dieta cetogénica.
- Dieta mediterránea.

La dieta mediterránea, término acuñado por Ancel Keys tras realizar el afamado estudio epidemiológico de los 7 países (15), se define como modelo o patrón alimentario seguido en áreas de cultivos de olivos en países de la vertiente mediterránea (16). Dicho estilo de dieta está basado en un alto consumo de verduras, frutas frescas, frutos secos, legumbres y cereales integrales. Respecto a alimentos con alto contenido en proteínas, además de las legumbres, destaca principalmente el aporte de pescado, así como un menor consumo de huevos, lácteos enteros y carne. Entre sus peculiaridades, se encuentra el aceite de oliva como grasa de elección para cocinar, así como un consumo moderado de vino (17). Dado que el término “moderado” es muy ambiguo, y que el consumo de alcohol está directamente relacionado con diversos tipos de cáncer (18), se podría concluir que la dieta mediterránea, excluyendo el consumo de vino (19), es una de las dietas omnívoras más completas y saludables, dado que su patrón alimentario se basa en un alto consumo de alimentos de origen vegetal, que proporciona nutrientes, vitaminas, minerales y fitoquímicos con actividades biológicas importantes.

En cuanto a los principales mecanismos que podrían favorecer la salud y longevidad gracias a la dieta mediterránea destacan (20):

- Efecto hipolipemiante.
- Modificación de hormonas y factores de crecimiento involucrados en la patogénesis del cáncer.
- Producción de metabolitos a través de la microbiota intestinal.
- Protección frente a estrés oxidativo, inflamación y agregación plaquetaria.

Los compuestos fenólicos procedentes de la dieta mediterránea parecen ser los responsables de todos los efectos beneficiosos mencionados anteriormente (21).

1.2 POLIFENOLES

1.2.1 Definición

Los polifenoles son metabolitos secundarios de plantas, que surgen como mecanismo de defensa ante diversos tipos de agresión como depredadores, contaminación, infecciones microbianas, condiciones climáticas adversas, así como atracción de polinizadores (22,23). La mayoría se encuentran en los alimentos de origen vegetal, siendo los responsables del color, sabor amargo, astringencia, olor y estabilidad oxidativa de los alimentos (24). En la actualidad, se han logrado identificar más de 10.000 compuestos de polifenoles en diferentes plantas (25), procedentes todos ellos de un intermediario común, la fenilalanina o del ácido shikímico, que es un precursor cercano (24).

El contenido polifenólico de los alimentos fluctúa considerablemente en función de diversos factores, como son la climatología, las condiciones de almacenamiento, grado de madurez, grado de procesamiento de los alimentos, momento de la cosecha, el genotipo y el tipo de cultivo (26–30). A modo orientativo, por cada 100 gramos de peso fresco de frutas como cerezas, bayas, peras, manzanas y uvas se pueden encontrar de 200 a 300 mg de polifenoles, y en una taza de café, té o copa de vino alrededor de 100 mg de polifenoles (31).

La literatura científica ha descrito ampliamente el rol que juegan los polifenoles en la salud, otorgándoles propiedades de protección cardiovascular, anticancerígenas, inmunomoduladoras, y antioxidantes (32–35). Además, a diferencia de lo que ocurre con las vitaminas, parece que el consumo de polifenoles presenta efectividad cuando su consumo es a largo plazo (23), pudiendo también mejorar la función cognitiva (36).

1.2.2 Clasificación de polifenoles

Existen más de 8000 variantes estructurales de polifenoles, los cuales se caracterizan por la presencia de, al menos, un anillo aromático también denominado fenólico, con uno o más grupos hidroxilo (-OH) como el mostrado en la figura 1 (22). En función de su estructura química se pueden clasificar en flavonoides y no flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos) (37–39).

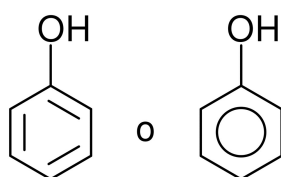


Figura 1. Estructura química del fenol. Adaptado de Mc Murry y cols (40).

- **Flavonoides**

Compuestos polifenólicos de mayor abundancia en las plantas, cuya estructura comprende 15 carbonos con dos anillos aromáticos de benceno (A y B) conectados por un puente de 3 carbonos mediante un anillo pirano heterocíclico (C), como se observa en la figura 2 (41), encontrándose la mayoría de ellos de forma natural como glucósidos en lugar de agliconas (estructura básica, figura 3). Las principales subclases son; flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles, flavanonas y antocianidinas (tabla 2). Otros compuestos flavonoides que se encuentran de forma minoritaria en los alimentos son chalconas, dihidrochalconas, cumarinas, auronas, flavan-3,4-dioles y dihidroflavonoles (23). Los flavonoides poseen la capacidad de inhibir diversas enzimas como lipoxigenasa (LOX), ciclooxigenasa (COX) y xantina oxidasa (XO), haciendo frente al estrés oxidativo. Todos ellos se hallan principalmente en verduras, frutas, cacao, té y vino (42).

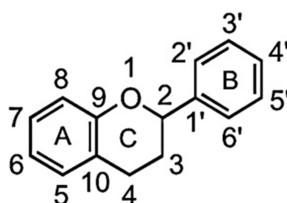


Figura 2. Esqueleto básico de un flavonoide. Extraída de Del Río y cols (23).

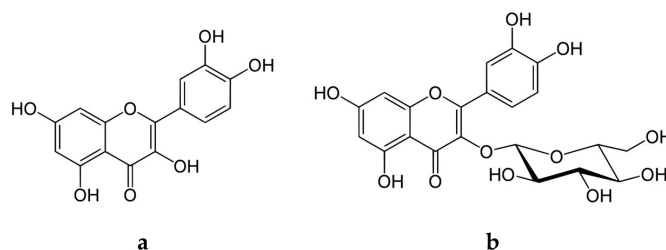


Figura 3. Estructura de (a) aglicona de quercetina (b) glucósido de quercetina. Adaptada de Del Rio y cols (23).

Tabla 2. Clasificación de flavonoides más comunes. Adaptada de Kumar y cols (41).

Subclase	Más comunes	Fuentes dietéticas	Estructura
Flavonoles	- Quercetina - Kaempferol - Isorhamnetina - Miricetina	Cebollas, col rizada, lechuga, tomates, manzanas uvas y bayas, té, vino tinto	
Flavonas	- Apigenina - Luteolina - Tangeritina - Wogonina - Baicaleína	Apio, perejil, pimientos rojos, manzanilla, menta y ginkgo biloba	
Isoflavonas	- Daidzeína - Genisteína	Leguminosas y soja	
Flavan-3-oles	- Catequina - Epicatequina - Epigallocatequina - Proantocianidinas	Té verde, plátano, manzana, arándanos, melocotones, peras	
Flavanonas	- Naringenina - Hesperetina - Eriodictiol	Naranjas, limones, uvas Cantidades altas en corteza de cítricos	
Antocianidinas	- Pelargonidina - Cianidina - Definidina - Peonidina - Petunidina - Malvidina	Arándanos, fresas, grosellas negras, uvas rojas, moras frambuesas,	

- **No flavonoides**

Entre los no flavonoides destacan los ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos.

- Ácidos fenólicos:

Se dividen principalmente en dos clases: derivados del ácido cinámico y del ácido benzoico. Los más comunes son los ácidos hidroxicinámicos, que se subdividen en ácido cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico (24). La combinación de ciertos ácidos como el cafeico y quínico dan lugar al ácido clorogénico, que es el principal compuesto fenólico del café y también se encuentra presente en el cacao (31). En el caso de hidroxibenzoicos, su contenido en plantas comestibles suele ser muy bajo, excepto en cebolla, rábano negro y frutas rojas (43).

El ácido gálico es el más común, encontrándose como ésteres de azúcar, y considerados como componentes dietéticos menores. Los elagitaninos, derivados del ácido elágico, se encuentran en diferentes alimentos como fresas, moras, frambuesas, granada, caqui, avellanas y vinos viejos (44).

- Estilbenos

Son fitoalexinas producidas por las plantas como respuesta a estrés, lesiones y enfermedades (45). Su presencia en la alimentación humana es bastante escasa. Uno de los más estudiados es el resveratrol, que se encuentra principalmente en las uvas, y por consiguiente en el vino (24,46).

- Lignanos

Se trata de compuestos difenólicos, formados por dimerización de dos residuos de ácido cinámico. Diversos lignanos se consideran fitoestrógenos (24). La fuente dietética principal es la linaza (47).

1.2.3 Ingesta de polifenoles

Aunque resulte contradictorio, un estudio transversal mostró que los países de la vertiente mediterránea (Italia, Grecia, sur de Francia y España) realizaban una ingesta más baja de polifenoles (1011 mg/día) en comparación con países no mediterráneos (1284 mg/día) y Reino Unido (1521 mg/día) (48). Dicho estudio se basó en un recordatorio de 24 h con una muestra de 36.026 adultos y se utilizó la base de datos *Phenol-Explorer* para cuantificar la cantidad de estos.

Se estima que la ingesta dietética de polifenoles procedentes de alimentos oscila en 1 g/día, dosis 10 veces superior a la de vitamina C, y 100 veces superior a

carotenoides y vitamina E (31). No obstante, se debe tener en cuenta que dicha estimación se basa en cuestionarios de frecuencia de alimentos, donde los sujetos tienden a sobrestimar el consumo de alimentos saludables (49). En la actualidad se disponen de bases de datos apropiadas para cuantificar el consumo de polifenoles. Sin embargo se debe tener en cuenta que el contenido de polifenoles de los alimentos puede variar de forma significativa en función de diversos factores, como el grado de madurez (a mayor grado de madurez, menor contenido de ácidos fenólicos y por el contrario mayor de antocianidinas), sistemas de cultivo, variedad de la planta, condiciones ambientales, almacenamiento o cocción entre otros (50).

Se debe tener en cuenta que la forma en que los compuestos llegan al sistema circulatorio y a los tejidos, difiere de las presentes en su forma nativa. Las agliconas sí parecen ser absorbidas a través del intestino delgado, pero la mayoría de polifenoles se encuentran en los alimentos en forma de ésteres, glucósidos o polímeros, que son incapaces de ser absorbidos por el enterocito en su forma nativa (51). Además, los polifenoles más consumidos y presentes en la dieta no son los que muestran una mayor concentración de metabolitos activos en tejidos diana (37). La mayoría de polifenoles, ingresan en el intestino grueso y son metabolizados por acción de la microbiota colónica. Dado que permanecen periodos más prolongados en comparación con el intestino delgado, logran modular el microbioma e impactan directamente en la salud del colon y la microbiota (52). Además, en función del tipo de microbioma intestinal del individuo y de su metabotipo, tendrán una mayor o menor metabolización, dependiendo de su naturaleza (53).

Entre las bioactividades atribuidas a los polifenoles naturales destacan (25,54):

- Actividad antioxidante.
- Protección frente al cáncer.
- Efecto anti-microbial.
- Efecto neuroprotector.
- Actividad cardioprotectora.
- Actividad antiinflamatoria.
- Actividad antienvjecimiento.
- Protección frente a radiación ultravioleta.

Cabe destacar que los grupos fenólicos poseen la capacidad de aceptar o captar un electrón, originando radicales fenoxilo que son relativamente estables, interrumpiendo de esta forma la reacción de oxidación en cadena de los componentes celulares (55).

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

1.3.1 Definición de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, que afecta al equilibrio redox y función fisiológica del organismo (56), pudiendo ocasionar daño en lípidos, proteínas y ADN, entre otros (57). Tal desequilibrio puede ser ocasionado por una escasa ingesta de antioxidantes, agotamiento de antioxidantes endógenos o por el incremento de especies reactivas (31).

En condiciones fisiológicas, el organismo sintetiza especies reactivas de oxígeno (ROS) en pequeñas cantidades que es capaz de neutralizar. Las ROS participan en procesos vitales del organismo humano como homeostasis celular, expresión génica, activación de receptores y transducción de señales, es decir, funciones esenciales para el organismo (54). Las ROS se sintetizan en las células durante el metabolismo oxidativo mitocondrial, mientras que en condiciones de hipoxia se producen también especies reactivas de nitrógeno (NOS). Una producción excesiva de ROS y NOS durante un periodo considerablemente prolongado, es capaz de originar daños en la estructura y funciones celulares, pudiendo ocasionar daños irreparables (54). De hecho, la peroxidación lipídica de los lípidos de membrana, puede ocasionar un deterioro en la función de la misma, inactivación de receptores y enzimas de membrana, incremento de permeabilidad a iones, disminución de su fluidez y, en última instancia, ruptura (58).

1.3.2 Radicales libres

Los radicales libres (RL) son moléculas altamente inestables debido a la presencia de uno o más electrones desapareados en sus orbitales (59), y pueden proceder del oxígeno, nitrógeno, cloro o azufre entre otras. Su vida media es muy

corta, oscilando entre milisegundos a nanosegundos, y para estabilizarse buscan el emparejamiento con electrones de moléculas biológicas contiguas, siendo el origen del estrés oxidativo (60).

El comienzo de la peroxidación lipídica tiene su origen en el ataque de cualquier especie reactiva con capacidad de abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. Un átomo de hidrógeno es, en primera instancia, un RL con un electrón no apareado, y su eliminación deja un electrón no apareado en el átomo de carbono al que estaba asociado. El radical formado sufre una reordenación molecular para estabilizarse, originando un radical peroxilo tras reaccionar con el oxígeno, que captará un átomo de hidrógeno de un ácido graso adyacente, formando un hidroperóxido lipídico. Cuando los radicales peroxilo reaccionan con hidrógeno, los nuevos radicales pueden reaccionar con oxígeno formando otro radical peroxilo, propagando el daño oxidativo (61).

Dado que los electrones presentan mayor estabilidad cuando se encuentran apareados en los orbitales, los RL son especies reactivas frente a otras moléculas y para estabilizarse donan o atrapan electrones de moléculas cercanas, convirtiéndolas en RL que, para estabilizarse, atacarán a otra molécula y así sucesivamente originando reacciones en cadena y daño celular (59). Dicha capacidad de poder donar o aceptar electrones, hace que puedan comportarse como oxidantes o reductores (62).

Comúnmente y de forma errónea, se suele utilizar el término ROS cuando se habla de estrés oxidativo o de RL. No obstante, parece más adecuado que se emplee el nombre de la especie química específica siempre que sea posible, dado que, tal como se muestra en la tabla 3, existen diferentes especies reactivas en función de su origen, siendo unas radicales (un electrón libre) y otras no radicales (producto de reducción de dos electrones) (63).

Tabla 3. Clasificación de especies reactivas más comunes. Adaptada de Sies y colaboradores (63).

Radicales libres	No radicales
Especies Reactivas de Oxígeno	
Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Radical Hidroxilo (OH^{\cdot})	Oxígeno Singlete (O_2^1)
Radical Peroxilo (ROO^{\cdot})	
Especies Reactivas de Nitrógeno	
Óxido nítrico (NO^{\cdot})	Peroxinitrito ($ONOO^-$)
Dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot})	
Especies Reactivas de Cloro	
	Hipoclorito (OCl^-)
	Cloraminas ($RNHCl$)

Uno de los problemas a la hora de medir el estrés oxidativo, es encontrar biomarcadores validados (64), entendiéndose como biomarcador según la OMS a “cualquier sustancia, estructura o proceso que pueda medirse en el cuerpo o sus productos e influir o predecir la incidencia de un resultado o una enfermedad” (65). Además para ser útil debe tener ciertas particularidades (56):

- Mostrar especificidad para una enfermedad determinada.
- Tener valor pronóstico.
- Correlacionarse con la actividad de la enfermedad.
- Ser razonablemente estable.
- Estar presente en tejido de fácil acceso.
- Rentable para medir a gran escala.

En numerosas ocasiones, se ha empleado de forma errónea la capacidad antioxidante total en el plasma sanguíneo de los sujetos. Sin embargo, dicho parámetro debe desaconsejarse dado que no aporta información de utilidad sobre el estado del organismo (66). Es conocido como numerosos fitoquímicos se metabolizan fugazmente en moléculas con propiedades biológicas alteradas (66), además, de acuerdo con la literatura científica, resulta de mayor interés evaluar la

actividad de las enzimas antioxidantes del organismo (67), que son las que soportan la principal carga de defensa antioxidante del organismo (68).

Recientemente, han sido utilizados y examinados exhaustivamente multitud de biomarcadores para evaluar el estrés oxidativo (56,69), siendo algunos de los más trascendentes los grupos carbonilos, los productos finales de glicación avanzada (AGEs), la 8-oxoguanina, el malondialdehído (MDA), las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (OxLDL) o F₂-Isoprostanos (63). Precisamente, estos últimos compuestos fueron variables analizadas en la presente investigación.

1.3.3 Actividad antioxidante y polifenoles

Existen diferentes vías implicadas que explican la capacidad antioxidante de los polifenoles, destacando la eliminación de ROS, la atenuación en la síntesis de estos radicales mediante la inhibición de enzimas involucradas en su producción y el incremento de las defensas antioxidantes endógenas (70). Además, gracias a su estructura y la presencia de grupos hidroxilos unidos al anillo aromático, son capaces de ejercer actividad antioxidante para neutralizar los electrones no apareados de los RL, donar hidrógenos y quelar iones metálicos (71).

En el caso de los flavonoides, el hidroxilo del anillo B parece ser el responsable de la eliminación de ROS y NOS, mediante la donación de hidrógeno y un electrón a los radicales hidroxilo, peroxilo y peroxinitrito, a los cuales estabiliza dando lugar a radicales de flavonoides estables (41,72).

1.3.4 Sistemas antioxidantes

Los antioxidantes se pueden producir de forma endógena o introducir al organismo de forma exógena (73). Son moléculas suficientemente estables, que presentan la capacidad de donar un electrón a un RL, neutralizarlo y reducir su daño potencial (62) como se representa en la figura 4. Con objeto de mantener unos niveles adecuados de ROS y NOS para contribuir al equilibrio redox, el organismo pone en acción mecanismos antioxidantes que pueden ser enzimáticos y no enzimáticos (59).

Dentro de los enzimáticos, denominados de alto peso molecular, se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), principal enzima antioxidante que cataliza el anión superóxido en oxígeno y H_2O_2 . La SOD interactúa a su vez con diversas enzimas que ayudan a neutralizar las especies reactivas. La catalasa (CAT), que cataliza el H_2O_2 en agua y oxígeno en presencia de NADPH, la glutatión peroxidasa (GPx) que reduce H_2O_2 y peróxidos orgánicos a agua o alcohol siempre en presencia de selenio, y la peroxiredoxina (Prx) que presenta menor eficiencia en la metabolización de H_2O_2 (59,62,74).

Los no enzimáticos se consideran de bajo peso molecular, e incluyen vitamina E, vitamina C, bilirrubina, ácido úrico, glutatión y flavonoides. En el caso de los flavonoides, estos contribuyen al equilibrio redox mediante la donación de átomos de hidrógeno a los radicales, deteniendo la oxidación de lípidos y originando radicales fenoxilo relativamente estables, que no pueden continuar la reacción radical en cadena (59).

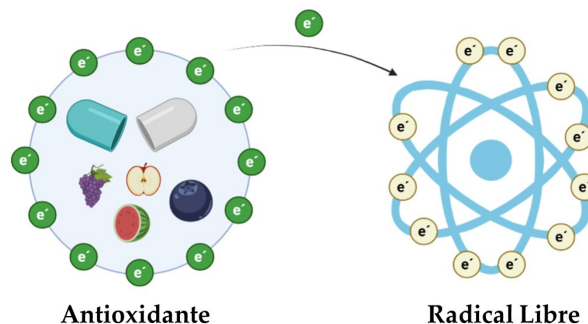


Figura 4. Donación de electrón de un antioxidante al radical libre para estabilizarlo.
Elaboración propia.

1.4 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Las oxilipinas son lípidos bioactivos oxigenados (75), sintetizados como metabolitos procedentes de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Se les atribuyen múltiples funciones biológicas, que desempeñan un papel importante en la inmunidad, inflamación y funciones vasculares. Actualmente, se ha logrado identificar más de 100 tipos de oxilipinas con roles superpuestos e interconectados entre sí (76). La literatura científica describe cómo una

señalización alterada de oxilipinas, se relaciona con diferentes tipos de enfermedad cardiovascular (ECV) como por ejemplo diabetes, hipertensión arterial, hemostasia, trombosis e hiperlipidemia (77).

Las oxilipinas se originan tras un daño o estímulo, y debido a su corto periodo de vida no se almacenan, sino que se sintetizan *de novo* de forma estrictamente regulada (78). Una vez producido el estímulo, los AGPI en la posición sn-2 de los glicerofosfolípidos de las membranas celulares, son liberados por acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) (79), y serán oxigenados por una de las diferentes familias de enzimas COX, LOX, citocromo P450 (CYP) o por acción de ROS (80). El tipo de oxilipina sintetizada variará principalmente por distintos factores: por el tipo de AGPI (omega 6 u omega 3) que predomine en la dieta y se oxide de la membrana celular; por el tipo de oxigenasa que lo oxide (76); y por la afinidad de la enzima por el sustrato AGPI específico (81). Una vez sintetizadas, las oxilipinas irán a su destino, pudiendo ejercer acciones tanto autocrinas como paracrinas. Podrán activar receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), activar los factores de transcripción activos por ligandos o difundir a través de las membranas plasmáticas y unirse a receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (82,83).

Los principales AGPI precursores de oxilipinas derivan del ácido linoleico (AL) precursor de la familia omega 6 y del ácido alfa-linolénico (ALA) precursor de la familia omega 3. En la ruta del metabolismo del AL, se sintetizan el ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA) y el ácido araquidónico (AA) mientras que en la del ALA se obtienen el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (76,80). Concentraciones más altas en la dieta de un tipo de AGPI se podrían asociar a mayor concentración de oxilipinas derivadas de su ruta. Sin embargo, cabe destacar que las concentraciones elevadas de AGPI no son el único factor que determinan un incremento de las oxilipinas, sino que existen otros como la cantidad de AGPI que compiten para incorporarse a fosfolípidos (81).

En cuanto a los diferentes tipos de oxilipinas, las más conocidas son los eicosanoides (compuestos de 20 carbonos) derivados del AA (75). Los eicosanoides actúan como mediadores lipídicos regulando un amplia variedad de respuestas inflamatorias, fisiológicas y fisiopatológicas (84). Se pueden clasificar en familias que incluyen isoprostanos (IsoPs), prostaglandinas (PGs), leucotrienos

(LKs) y tromboxanos (TXs), todos ellos marcadores lipídicos relacionados en la fisiopatología de células, órganos y tejidos (78,85,86). A modo de resumen, el AA se metaboliza por acción de las ROS por una vía no enzimática independiente de la COX a IsoPs (87), en el caso de los prostanoides (PGs y TXs) se metabolizan a través de la vía enzimática de la COX (88) y los LK a través de la vía enzimática de la LOX (89) (figura 5).

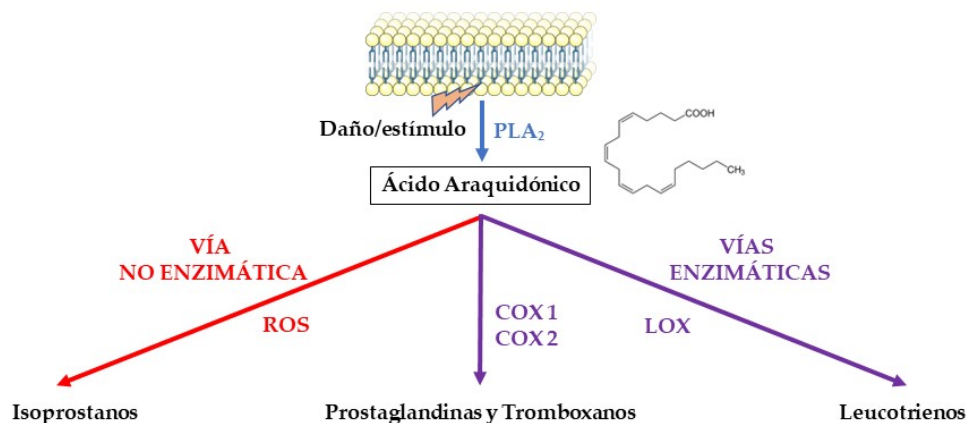


Figura 5. Metabolismo del ácido araquidónico. Elaboración propia.

1.4.1 Prostanoides y leucotrienos

Los prostanoides incluyen tanto al grupo de PGs como de TXs. La COX sintetiza en el retículo endoplasmático prostanoides de las series 1, 2, 3 y dihomo-2 (81). Los prostanoides son derivados del AA, y sus funciones fisiológicas primarias se pueden clasificar en PGs que están involucradas en procesos proinflamatorios, TXs relacionados con vasoconstricción y agregación plaquetaria y prostaciclina involucrada en la resolución de la inflamación (90).

A través de la vía enzimática de la COX, el AA produce oxilipinas de la serie 2. Una vez liberado el AA de la membrana, es captado por las COX 1 y COX 2, que ejercen en primera instancia función de ciclooxigenasa, metabolizando el AA en PGG₂, para inmediatamente después ejercer función como peroxidasa que reduce el peróxido en un alcohol, produciendo PGH₂ (91). Tanto PGG₂ como PGH₂ son moléculas efímeras, siendo la PGH₂ la PG precursora de las 4 PGs primarias (PGD₂, PGE₂, PGI₂, PGF_{2α}) que otorgan el nombre de las vías D, E, I y F

respectivamente y de TXs (TXA₂ y TXB₂) (92) que posteriormente se metabolizarán en numerosos metabolitos bioactivos (90) (figura 6).

En el caso de los LKs, se originan en células inflamatorias, como macrófagos, mastocitos o leucocitos polimorfonucleares, siendo la 5-LOX la principal enzima en la síntesis de LKs (93). Los LKs procedentes de la vía 5-LOX, presentan actividad proinflamatoria, mientras que los procedente de las vías 12-LOX Y 15-LOX presentan actividad antiinflamatoria, mediante la inhibición de la secreción de Interleucina (IL)-6 inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (94). LKs derivados de la 5-LOX como LTB₄, LTC₄, y LTE₄, poseen actividad quimioatrayentes, y se les atribuyen actividades de broncoconstricción, aumento de permeabilidad vascular, contracción del musculo liso y mediadores importantes de la hipersensibilidad inmediata (95).

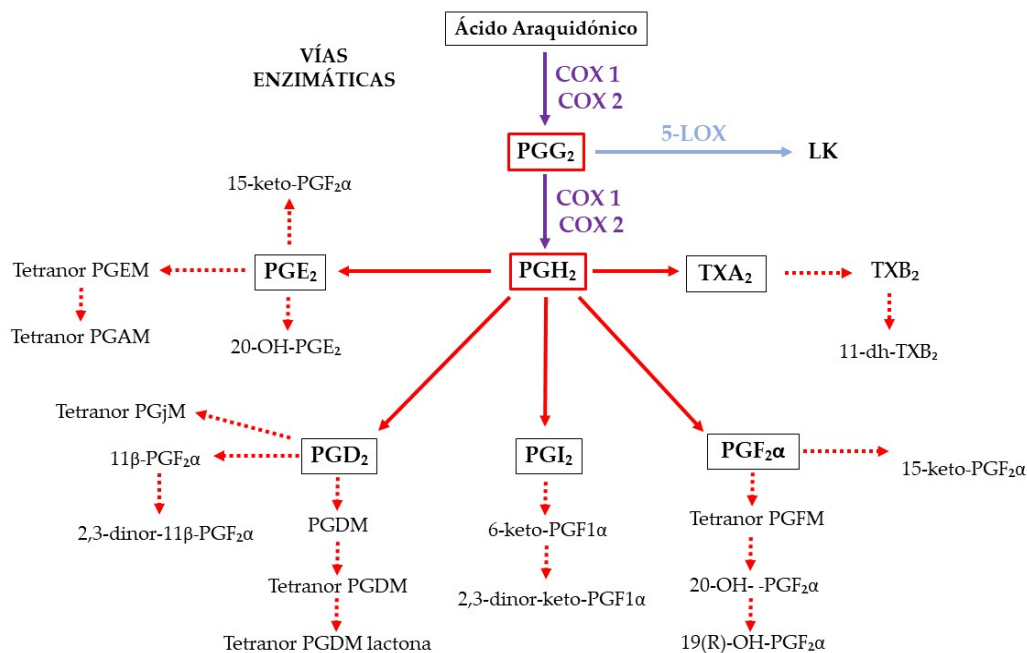


Figura 6. Formación y relación metabólica de las familias de prostanoideos y leucotrienos. Adaptada de Libia y cols (85).

La mayoría de PGs poseen efectos proinflamatorios, como la PGF₂α y el TXA₂, que inducen vasoconstricción, agregación plaquetaria y disfunción cardiaca (75). No obstante, la PGE₂, una de las prostaglandinas con mayor abundancia en

el organismo, además de sus efectos proinflamatorios (78) también posee actividad antiinflamatoria, dado que induce la secreción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10 y regula al alza el adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (96). El AMPC puede ser considerado como uno de los principales reguladores a la baja de la función inflamatoria de los macrófagos (97). Interfiere en la formación de ROS, inhibe la activación de NF- κ B e incrementa la generación de citoquinas de carácter antiinflamatorias como la IL-10 (94). Todos estos datos, sugieren el papel protector de la PGE₂, favoreciendo la resolución de la inflamación mediante la elevación de AMPC en macrófagos (96).

Además, la PGE₂ juega un rol principal en los signos clásicos de la inflamación, como son enrojecimiento, hinchazón y dolor, de forma que se incrementa el flujo sanguíneo al tejido inflamado mediante la dilatación arterial mediada por este tipo de prostaglandinas (78). De forma análoga, la PGD₂ posee efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios (92). La PGD₂ se puede sintetizar en el cerebro para mediar funciones neurofisiológicas, y en los mastocitos iniciando respuestas alérgicas de forma aguda (89,98). Por el contrario, su metabolización puede inhibir la señalización de factor nuclear kappa B (NF- κ B) y activación de PPAR γ , induciendo efectos antiinflamatorios (99).

Los prostanoides poseen efectos ampliamente conocidos en el músculo liso y plaquetas, así como otros sistemas que incluyen sistema cardiovascular, renal, reproductivo, respiratorio y sistema nervioso central (SNC).

Ciertas PGs presentan la capacidad de actuar en el músculo liso vascular de forma opuesta. Así pues, PGE₂ y PGI₂ inducen vasodilatación, mientras que PGF_{2 α} y TXA₂ inducen vasoconstricción. De forma paralela, afectan al sistema respiratorio, siendo PGE₂ y PGI₂ las responsables de producir una broncodilatación o relajación de las vías respiratorias; mientras que PGF_{2 α} y TXA₂ son capaces de generar una broncoconstricción (100). Respecto a la agregación plaquetaria la PGI₂ es vasodilatadora y antiagregante, y por el contrario, el TXA₂ vasoconstrictor y agregante plaquetario (101).

En el SNC, la PGE₂ es la PG más común, sintetizándose a nivel neuronal y teniendo un papel notable en la generación de fiebre e hiperalgesia, así como en la adquisición de la memoria (102). Esta prostaglandina está relacionada también con el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (103,104).

Respecto a la función cardíaca, el papel de los prostanoïdes ha sido un tema candente y de interés desde hace décadas. Pese a existir cierta controversia, parece que los prostanoïdes podrían ser útiles terapéuticamente en diferentes enfermedades cardiovasculares, que incluyen arritmias, anginas de pecho, infarto de miocardio y aterosclerosis. PGs como PGE₁, PGE₂, PGD₂, y PGI₂ se consideran beneficiosas, induciendo vasodilatación coronaria e inhibiendo la propagación del trombo, mientras que TXA₂ y PGF_{2α} se consideran perjudiciales por su actividad vasoconstrictora (105,106).

Diversas PGs también poseen funciones dentro del sistema reproductivo de forma general, y de forma particular en el útero. Se ha observado como la PGF_{2α} juega un papel vital en procesos como luteolisis, ovulación, menstruación e inicio del parto, mientras que PGE₂ y PGI₂ lo hacen en menor medida. En el caso del sistema reproductivo masculino, es la PGE₂ la que juega un papel importante en la erección, eyaculación y transporte de espermatozoides (107). A nivel renal, la PGE₂ también es la responsable de inducir diuresis y natriuresis (108).

Los efectos de las PGs se deben a la activación de 7 receptores acoplados a GPCR, subdividiéndose en diferentes receptores de prostanoïdes (EP) con diferentes subtipos de receptores de PGE; (EP1,EP2,EP3 y EP4), receptor de PGD (DP1), receptor de PGI (IP) y receptor de TX (TP) entre otros (109).

1.4.2 Isoprostanos

Los IsoPs fueron descubiertos por Morrow y colaboradores en los años 90 (110). Son eicosanoides similares a las prostaglandinas, sintetizados por una vía no enzimática independiente de la COX mediante la peroxidación del AA inducida por RL o ROS (111,112). Dichos compuestos fueron denominados en primera instancia F₂-IsoPs porque eran isómeros de la PGF_{2α} (113) pese que en este trabajo se denominarán IsoPs, para no confundir con la familia F de los isoprostanos. La diferencia de los IsoPs frente a las prostaglandinas, reside en la orientación de las cadenas laterales con el anillo prostano. Las prostaglandinas poseen exclusivamente posición *trans* mientras que en los IsoPs predomina la orientación *cis* (114).

Los IsoPs se metabolizan y excretan en orina fugazmente, y su cuantificación resulta de gran utilidad para evaluar el estado oxidativo en un momento concreto (86,113,115).

En el caso de IsoPs, el AA se metaboliza en G₂-IsoPs para posteriormente reducirse en H₂-IsoP que, en función las condiciones reductoras, puede sintetizar diferentes familias (A, D, E, F, J). Cuando se reduce completamente, se produce la familia F₂-IsoPs, y cuando se reduce parcialmente, se formará la D₂-IsoPs y E₂-IsoPs. Bajo ciertas condiciones fisiológicas, los dos últimos pueden sufrir una deshidratación y metabolizarse en J₂-IsoPs y A₂-IsoPs, respectivamente. A partir del G₂-IsoPs también se pueden generar los epoxy-isoprotranos mediante reducción parcial y posteriores deshidrataciones (116). Los E₂-IsoPs y los D₂-IsoPs compiten con los F₂-IsoPs en su síntesis, observándose como el agotamiento de agentes reductores celulares como α -tocoferol y glutatión (GSH) favorece la síntesis de E₂/D₂-IsoPs en detrimento de la de F₂-IsoPs (117). La figura 7 muestra la ruta de síntesis de los diferentes tipos de IsoPs.

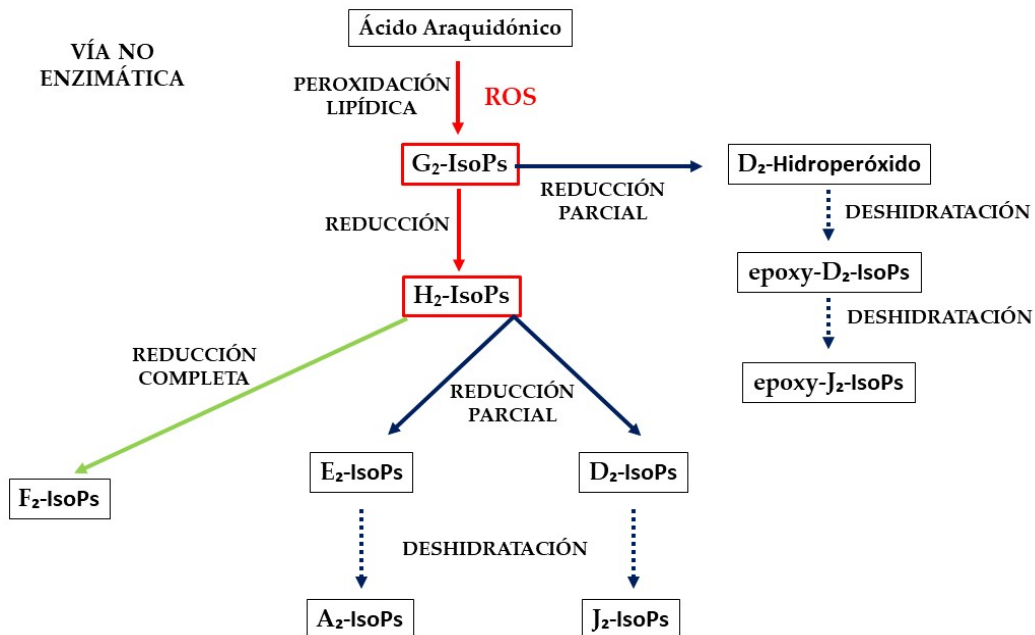


Figura 7. Biosíntesis de isoprostanos de tipo A, D, E, F y J, y de epoxy-isómeros. Elaboración propia.

Una vez metabolizado el AA, se pueden originar 4 tipo regiosómeros; los de la serie 5, 8, 12 y 15. Dado que los de las series 8 y 12 se oxidan con facilidad, los regiosómeros de las series 5 y 15 se forman/encuentran en cantidades más elevadas (112,118).

Así como las PGs se sintetizan a partir del AA libre, los IsoPs lo hacen a partir del AA *in situ* sobre los lípidos, siendo liberados posteriormente por fosfolipasas (119,120). Los IsoPs libres que circulan en el plasma, aparecen en la orina tras ser filtrados por el riñón. Se ha observado que los dos más abundantes derivan del 15F_{2t}-IsoP, también denominado 8-iso-PGF_{2α}, siendo el 2-3, dinor-15-F_{2t}-Isop y el 2,3-dinor-5,6-dihidro-15-F_{2t}-Isop (112).

La forma libre de IsoPs tan solo representa un parte del total, debido a que se excretan conjugados como glucuronidos. Por este motivo es adecuado y necesario realizar una hidrólisis previa con β-glucorinodasa, para incrementar de forma considerable los niveles urinarios de estos (18).

Los IsoPs son considerados como el método *gold standard* para evaluar la peroxidación lipídica y, por lo tanto, el estado redox del organismo (122,123). Son biomarcadores fiables de peroxidación lipídica endógena, al estar ampliamente presentes en el organismo y ser químicamente estables en fluidos biológicos cuando son almacenados en condiciones adecuadas (se deben almacenar a -80°C en lugar de a -20°C inmediatamente tras la recolección dado que a -20°C puede producirse autooxidación, así como evitar ciclos de congelación descongelación) (112,116). Además, cuando se miden en plasma se recomienda utilizar tubos que contengan EDTA y antioxidantes GSH e hidroxitolueno butilado para minimizar la elevación artificial de IsoPs (112,124). Temperaturas de -80°C garantizan una estabilidad a largo plazo (6 meses en plasma y años en orina) (116). Se pueden medir en diferentes fluidos, siendo el plasma y la orina los métodos de elección, dado que su recolección es menos invasiva. Las técnicas de cromatografía de masas se consideran como los métodos más fiables y precisos para su detección (112), siendo la cromatografía de gases/ionización química de iones negativos (GC/NICI-MS) la de mayor sensibilidad respecto a otros métodos (125). Otros métodos de detección como los inmunoensayos, podrían dar resultados no concluyentes y confusos, debido a las similitudes estructurales de las moléculas, como PGs e IsoPs (126).

Respecto a la relación entre los IsoPs y el estado de salud, se han visto valores elevados de estos marcadores en personas con obesidad (127) existiendo correlación positiva con el índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura, área de grasa visceral y porcentaje de grasa corporal, así como tras procesos de isquemia/reperfusión (128,129) (lo cual puede ser un efecto deletéreo a la hora de hablar de complicaciones en operaciones de trasplante de órganos). Es interesante conocer este dato, debido a que, tal y como observaron Berg y colaboradores, la administración de aspirina (160 mg/día) desde 1 semana previa a intervención reducía los valores IsoPs al comienzo y durante la cirugía (130), lo cual podría ser interesante para evitar complicaciones durante la intervención, así como mejorar la recuperación. También se han observado valores elevados especialmente en el líquido cefalorraquídeo en procesos neurodegenerativos crónicos como la enfermedad de Alzheimer (131), la de Parkinson (132), o la esclerosis lateral amiotrófica (133), que podrían deberse a la mayor presencia de AGPI en el cerebro. De hecho, se han hallado valores elevados de IsoPs en tejidos y fluidos corporales humanos en diferentes trastornos como diabetes (134), tabaquismo (135), enfermedades degenerativas (136), obesidad (137) y aterosclerosis (138).

Respecto al cáncer, existe cierta controversia, ya que en algunos estudios han descrito un incremento de IsoPs respecto al grupo control, mientras que en estudios prospectivos de casos controles anidados no se han reportado resultados similares (112). Igualmente, existe cierta incertidumbre en relación con la influencia del cáncer en el estrés oxidativo y viceversa. No obstante, sí se encuentran valores elevados en diferentes tipos de cáncer tales como como adenoma colorrectal, estómago, próstata o mama (112). En cuanto al cáncer de mama, se observó que mayores niveles de IsoPs se correlacionaba de forma positiva con el IMC de las mujeres (139,140).

En cuanto a los compuestos fenólicos, como el caso de antocianinas presentes en frutas rojas como cerezas, fresas, moras, arándanos, y grosellas se ha visto que tienen la capacidad de reducir de forma significativa los valores de IsoPs (141–144). También se ha observado que el simple hecho de realizar cambios en los hábitos de alimentación influye en el nivel de IsoPs, donde la simple restricción calórica es capaz de reducir la concentración de estos (112).

Si se alude a efectos de IsoPs en el sistema cardiovascular, el 15-F_{2t}-Isop es un poderoso vasoconstrictor en diversos lechos vasculares, corazón, cerebro, hígado, pulmones y riñones entre otros (145,146); modula la actividad plaquetaria, inhibe la angiogénesis; y promueve la aterosclerosis estimulando la adhesión de monocitos y neutrófilos endoteliales, actividades biológicas asociadas a la interacción con el receptor de tromboxano (TP) (147). De la misma forma que 15-F_{2t}-Isop, el 15-E_{2t}-Isop puede mediar sus funciones biológicas en función del tipo de receptor al que se acople, como el receptor de PGE₂ (EP) o de PGF_{2α} (FP), y ejercer funciones opuestas (147).

Parece que, mientras los IsoPs o F₂-IsoPs derivados de AA inducen vasoconstricción, agregación plaquetaria e incremento de la presión arterial; los F₃-IsoPs derivados de EPA no inducen agregación plaquetaria ni incremento de la presión arterial, y poseen un efecto vasoconstrictor menos potente (148,149).

Puesto que los F₂-IsoPs se pueden excretar en orina de forma directa o metabolizarse en sus diferentes metabolitos, parece que sería más efectivo medir los IsoPs totales (esterificados y no esterificados), tal y como hicieron Halliwell y colaboradores (150).

1.4.3 Neuroprostanos y F_{2t}-dihomo-Isoprostanos

Tanto el cerebro como el SNC son proclives a las ROS, careciendo además de la presencia de un adecuado sistema antioxidante, lo que puede originar un incremento constante en los niveles de ROS y NOS (151). El elevado consumo de oxígeno por parte del cerebro da lugar a una producción excesiva de ROS, debido a que las membranas neuronales son ricas en AGPI, los ácidos grasos más vulnerables al ataque de RL por la presencia de un mayor número de dobles enlaces (152).

La medición de IsoPs en plasma y orina es eficaz para evaluar el estado oxidativo del organismo, pero no revela en que órgano o tejido, excepto cuando la determinación se realiza en el líquido cefalorraquídeo (153). No obstante, recientemente se han descubierto compuestos similares que podrían evaluar la peroxidación lipídica del SNC. En este sentido, se distinguen los neuroprostanos (NeuroPs) que pueden originarse del EPA y/o DHA (produciendo F₃-IsoPs y F₄-

IsoPs, respectivamente) y los F_{2i}-dihomo-IsoPs, derivados del ácido adrénico (AdA) (154–156) ilustrados en la figura 8.

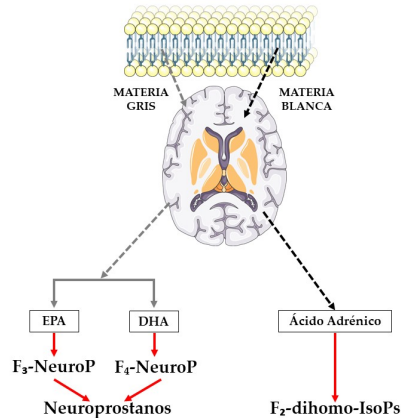


Figura 8. Ruta de síntesis neuroprostanos y F₂-dihomo-Isoprostanos. Elaboración propia.

El AA se halla distribuido de forma uniforme en el cerebro, presentando concentraciones similares en la materia gris y en la blanca, así como en el interior de glías y neuronas (157). La evaluación de NeuroPs y F_{2i}-dihomo-IsoP en el tejido cerebral podría ser un indicador adicional e incluso más fiable de daño oxidativo neuronal y de las vainas de mielina respectivamente, debido a que el DHA abunda en la materia gris del cerebro y el AdA en la materia blanca (87,125).

- **Neuroprostanos**

Al igual que del AA, a partir del EPA y DHA se sintetizan otras formas de IsoPs con interesantes acciones fisiológicas de las series 3 y 4 como son los F₃-IsoPs y F₄-IsoPs, respectivamente (158), a los que se denomina NeuroPs (158).

Los NeuroPs se originan por la misma vía independiente de la COX que los IsoPs, mediante la oxigenación no enzimática del EPA y DHA. Tanto su metabolismo, excreción y papel como mediadores lipídicos, es un campo emergente que no está tan ampliamente estudiado como el de los IsoPs (116).

En la materia gris del cerebro predominan metabolitos procedentes del DHA, especialmente en las membranas neuronales, motivo por el que recibieron el nombre de NeuroPs (159,160) siendo las series 4 y 20 las más abundantes de las 8 posibles (161). El daño oxidativo en el tejido cerebral provoca un incremento en la producción de F₄-NeuroPs. Al evaluar las diferentes series se observó que la F_{4i}-NeuroPs rara vez se encuentra en orina, sin embargo, la 10-F₄-NeuroPs sí que se

encuentra en mayor medida. Parece que los F4-NeuroPs son biomarcadores más adecuados para evaluar lesiones cerebrales como el accidente cerebrovascular isquémico, síndrome de Rett, así como procesos neurodegenerativos frente a los IsoPs (116).

El 4(RS)4-F4-NeuroP ha mostrado propiedades antiarrítmicas cardíacas mediante la protección del receptor de rianodina (162); ejerce protección frente a daños por isquemia reperfusión regulando a la baja la liberación del citocromo c y actividad de caspasa 3 (163) y ejerce efectos antiproliferativos en cáncer de mama (164).

- **F2t-dihomo-IsoPs**

Los F2-dihomo-IsoPs son marcadores específicos de AdA por acción de RL, y se conocen como poderosos marcadores de daño oxidativo en la vaina de mielina cerebral por acción de RL (165). El AdA se encuentra de forma predominante en la materia blanca del cerebro, hallándose también en concentraciones menores en las glándulas suprarrenales y riñón (155,165). Dicho ácido graso está siendo cada vez más investigado debido a sus posibles efectos beneficiosos para la salud. A sus metabolitos se los denominó como dihomo-IsoPs. De las 4 series que se pueden sintetizar por medio del AdA, la serie 7 y la 17 son las que más abundan en el organismo (165).

Así como los IsoPs elevados no pueden vincularse con todas enfermedades que estén relacionadas con estrés oxidativo, sí parece que cuando se habla de enfermedades cardiovasculares los resultados son más sólidos que en los trastornos neurológicos (116). Por el contrario, los dihomo-IsoPs sí parecen ser potentes biomarcadores de enfermedad asociada con la materia blanca del cerebro, hecho que se ha podido observar en estudios realizados en pacientes con ciertos trastornos neurológicos, como pacientes con epilepsia o con síndrome de Rett (166,167).

1.5 BIOMARCADORES PLASMÁTICOS

De acuerdo con los indicadores de salud establecidos por la “*European Food Safety Agency*” (EFSA), se decidió analizar numerosos marcadores biológicos plasmáticos para determinar la salud cardiovascular y el daño oxidativo (168,169).

1.5.1 Marcadores proinflamatorios

El NF- κ B juega un rol fundamental en las respuestas inflamatorias, de estrés celular e inmunitarias (170), cuya activación induce la secreción de moléculas de señalización proinflamatorias como citocinas, quimiocinas y proteínas de fase aguda (171). Si bien, la regulación de NF- κ B se considera esencial para una respuesta fisiológica normal, una regulación excesiva se asocia con ECV y diversos tipos de cáncer (172).

Los alimentos ricos en polifenoles parecen ser eficaces en cuanto a reducción de la concentración plasmática de mediadores inflamatorios asociados a la activación de NF- κ B (173,174). A las antocianinas se les ha atribuido efectos antiinflamatorios, debido a que se han asociado a la disminución de la secreción de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y moléculas de adhesión, pudiendo producir así una inhibición en la activación de NF- κ B (173).

En pacientes con elevado riesgo cardiovascular, o enfermedades inflamatorias crónicas, se ha observado como los valores de ciertos biomarcadores como el TNF- α , el receptor soluble del factor de necrosis tumoral 1 (sTNFR₁) y la proteína C-Reactiva (PCR) se encuentran elevados (172,175).

La PCR es una proteína de fase aguda sintetizada por el hígado como respuesta a la señalización de citocinas proinflamatorias reguladas al alza, especialmente la IL-1 y la IL-6 (176). Además, existe una sólida evidencia científica que respalda que, independientemente de otros factores, la IL-6 y la PCR son predictivos de ECV en sujetos aparentemente sanos (177,178).

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria expresada de forma significativa en el tejido adiposo, en leucocitos, células endoteliales y células musculares (179), participa en la desregulación endotelial, estimula la migración de monocitos y macrófagos e induce la expresión de adhesión de moléculas (180). El TNF- α podría promover la inflamación mediante la expresión de moléculas de adhesión, como la E-selectina, la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión de células intercelulares-1 (ICAM-1) (181). Compuestos fenólicos como la quercetina parecen tener capacidad de combatir la inflamación mediante la inhibición de TNF- α , a través de la disrupción de la vía de señalización NF- κ B (182).

Los niveles séricos del sTNFR₁ están asociados con la actividad inflamatoria sistémica del TNF- α (183–185), siendo un receptor de proteína de membrana celular que se desprende de esta tras unirse con el TNF- α (185). Estos niveles séricos son, por ello, un poderoso predictor de mortalidad de insuficiencia cardiaca, tanto a corto como a largo plazo, en pacientes con infarto agudo de miocardio (183).

La aterosclerosis es un tipo de enfermedad inflamatoria, causada por la acumulación de placa de ateroma en las arterias, en las que predominan las denominadas células espumosas. Dicha enfermedad puede conducir a ECV de diversa índole (186), siendo el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y el acúmulo de OxLDL, los mayores factores de riesgo relacionados con aterosclerosis (187–189).

Las OxLDL se han asociado al inicio y progresión de aterogénesis, la cual se caracteriza por inflamación crónica, acumulación de lípidos y células espumosas en el endotelio arterial (190). Las OxLDL promueven la adhesión de los monocitos a células endoteliales mediante un mecanismo independiente de la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 (191), originando células espumosas, hecho que no tiene lugar con las LDL nativas (192).

El incremento de LDL en plasma se suele asociar con procesos aterogénicos (193). En condiciones de estrés oxidativo se produce una peroxidación lipídica de las LDL nativas por acción de las ROS, convirtiéndose en OxLDL (194). En dicho proceso las LDL del torrente sanguíneo penetran a la túnica íntima a través del endotelio dañado. Las células endoteliales dañadas, al verse comprometidas, expresan diferentes moléculas de adhesión que capturan monocitos, que son lo que producen los RL que oxidan a las LDL. Una vez oxidado, la LDL atraerá a más monocitos, células inmunitarias y macrófagos que fagocitarán las partículas de OxLDL, convirtiéndose en células espumosas que, a su vez, atraerán a más monocitos y macrófagos. Toda esta reacción en cadena produce un gran área de lesión llamada placa de ateroma (186). Resulta de interés conocer que los AGPI en las LDL son más propensos a la peroxidación lipídica (195). La mayor susceptibilidad de peroxidación de AGPI es debida a la presencia de dobles enlaces que son más fácilmente oxidables que los simples (58,78,115).

Diversos estudios muestran cómo el consumo de alimentos ricos en polifenoles como aceite de oliva, cacao o jugo de granada, presentan eficacia para

hacer frente a la oxidación de LDL (196–198). El consumo de alimentos ricos de alimentos ricos en polifenoles como aceite de oliva, cacao, o jugo de granada, presentan eficacia para hacer frente a la oxidación de LDL, especialmente por la presencia de ácido procatequídico, metabolito intermedio de polifenoles con actividades antiinflamatorias, antiapoptóticas y antiescleróticas (199).

1.5.2 Marcadores de riesgo lipídico

El colesterol total, así como las LDL se suelen asociar con el desarrollo de ECV (200). Las enfermedades relacionadas con el perfil lipídico, denominadas dislipemias, son condiciones complejas, que muestran valores alterados de lipoproteínas, incluyendo valores elevados de LDL y reducidos de lipoproteínas de baja densidad (HDL) (201). Además existe una sólida evidencia de que los valores triglicéridos (TG), las LDL y las HDL están directamente relacionados con el riesgo de ECV (202).

Los efectos beneficiosos asociados al consumo de polifenoles frente a ECV como la aterosclerosis, reside en que presentan la capacidad de atenuar el inicio y progresión de la enfermedad, disminuyendo la oxidación de LDL descrita en el apartado anterior, e incrementando la concentración de HDL en plasma, teniendo además la capacidad de inhibir la proliferación de las células del músculo liso vascular (37).

1.5.3 Marcadores asociados a riesgo cardiovascular

La homocisteína es un aminoácido que ha sido ampliamente relacionado con el estrés oxidativo y con el daño celular, asociándose fuertemente con ECV y enfermedades del SNC (203). En poblaciones sanas los niveles fisiológicos de homocisteína se encuentran relacionados principalmente por la ingesta de B12, folato y metionina (204). Estudios de laboratorio y observaciones clínicas sugieren que la homocisteína ejerce efectos tóxicos sobre el sistema de coagulación de la sangre, células endoteliales y estructura de la pared vascular (205). Las acciones que ejerce la homocisteína sobre células endoteliales vasculares induce la proliferación de células de músculo liso, promueve la oxidación de LDL, e

incrementa la síntesis de colágeno y actividad procoagulante, participando todas ellas en el desarrollo de aterosclerosis (206).

Además, existe una gran correlación entre la homocisteína, la vitamina B12 y el deterioro cognitivo, donde niveles bajos de vitamina B12 pueden conducir a una hiperhomocisteinemia, que acarreará muerte neuronal a través de un mecanismo neurotóxico relacionado con el estrés oxidativo (207,208).

1.5.4 Vitaminas

La vitamina B12, también llamada cobalamina, es una vitamina hidrosoluble de origen bacteriano. Pese a que se encuentre en los productos de origen animal, es sintetizada por bacterias y en menor medida por archeas (210). Las funciones de la vitamina B12 son esenciales, siendo necesaria para un buen funcionamiento del cerebro y sistema nervioso, para la eritropoyesis, en la síntesis de ADN, metabolismo de homocisteína y en el metabolismo de las proteínas (211). Debido a que la vitamina B12 participa en la reacción enzimática de conversión de homocisteína en metionina, un déficit de vitamina B12 se puede traducir en la acumulación de este aminoácido (212).

La deficiencia de B12 puede originar daños en la mielina causando mieloneuropatía, neuropatía óptica y periférica, reducción de sensibilidad en nervios periféricos y debilidad en extremidades inferiores, además de enfermedades hematológicas, neuropsicológicas y cardiovasculares (209).

La vitamina E o α -tocoferol es una vitamina liposoluble que se encuentra principalmente en los aceites vegetales, siendo los de soja, maíz, girasol, nuez, semilla de algodón, palma y germen de trigo los que mayor concentración poseen (en torno a 5 mg/100 g de aceite), variando las proporciones de tocoferoles en función del tipo de aceite (213,214). La vitamina E es considerada como un poderoso antioxidante con capacidad de eliminar los radicales peroxilo, deteniendo la oxidación de AGPI en las membranas, así como regular la producción de ROS y NOS (213).

Parece que concentraciones plasmáticas elevadas de vitamina E a través de la alimentación o mediante complementos nutricionales, reduce la peroxidación lipídica manifestando una menor excreción de IsoPs en orina (215) y reducción del riesgo cardiovascular (216).

1.5.5 Catecolaminas y cortisol

Las catecolaminas son un grupo de monoaminas, (moléculas pequeñas cargadas, que en condiciones normales no pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE)) (217), derivadas de la tirosina, y en ellas se incluyen los tres neurotransmisores principales; norepinefrina, epinefrina y dopamina (218). La norepinefrina, también llamada noradrenalina, regula la concentración, el estado de alerta y el sueño (219); la epinefrina, también llamada adrenalina, modula el estado de alerta, las glándulas suprarrenales, el sueño y la respuesta de huida o lucha (220); mientras que la dopamina posee funciones esenciales en la regulación de neuronas motoras (221), motivación (222), excitación (223), o sistemas de recompensa y placer entre otras (224,225).

Las catecolaminas pertenecen a la clase de moléculas denominadas neurotransmisores, que modulan la comunicación entre células en el sistema nervioso (225). Los neurotransmisores son sintetizados de forma endógena, se almacenan en vesículas terminales presinápticas y se liberan en respuesta a un potencial de acción, actuando como moléculas de señalización (225,226).

El cortisol, principal glucocorticoide humano, es esencial en múltiples procesos fisiológicos. Entre ellos se encuentra el mantenimiento normal de la presión arterial. De hecho, un exceso de este produce hipertensión (227). Es una hormona de tipo esteroideo sintetizada por la glándula suprarrenal y liberada en situaciones de estrés. Diferentes estudios han evaluado el consumo de ciertos alimentos con los niveles de cortisol, donde patrones menos saludables de alimentación se relacionan con incrementos de este (228).

Niveles elevados de cortisol de forma crónica están estrechamente relacionados con la patogénesis y progresión de ECV, incluyendo resistencia a la insulina, hiperlipidemia, hipertensión, hiperglucemia y adiposidad abdominal (227,229). Además, se ha visto que pacientes con síndrome de Cushing (enfermedad caracterizada por exceso crónico de cortisol) presentan mayor incidencia de factores de riesgo metabólico y hasta 4 veces más de riesgo de mortalidad por ECV frente a controles sanos (230).

El metabolismo de las catecolaminas es una fuente importante de generación de estrés oxidativo, ya que promueve la formación de una gran cantidad de radicales superóxido que pueden causar daños en las proteínas y en

los lípidos de membrana (231,232). Compuestos como las antocianinas, presentan la capacidad de modular hormonas como el cortisol y noradrenalina, liberados en situaciones de estrés (231). Estudios con extractos ricos en polifenoles han mostrado reducción de marcadores de estrés oxidativo y en la excreción de catecolaminas en orina (233).

Ingestas bajas de frutas y verduras están estrechamente asociadas a enfermedades neurológicas como el Alzheimer, peor calidad de sueño por alteración de los ritmos circadianos (234), estados depresivos (235,236), y estrés oxidativo en deportistas (237). Las antocianinas, parecen inhibir la enzima monoaminooxidasa (MAO), enzima implicada en la oxidación de noradrenalina, que da lugar enfermedades neurológicas mediante dicha vía (238,239).

1.5.6 Función tiroidea

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) también llamada tirotrópina, es una hormona sintetizada en la hipófisis con acción estimulante de la glándula tiroidea, que promueve la secreción y liberación a sangre de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4). Dichas hormonas participan en la regulación de un gran número de funciones vitales, como metabolismo, crecimiento, o regulación de la temperatura corporal y ritmo circadiano (240).

Cómo afecta el consumo de frutas y verduras en la función tiroidea resulta algo contradictorio, en función del tipo de alimento. En el caso de ciertos flavonoides como es el caso de la rutina se observó una reducción de las concentraciones séricas de las hormonas T3 y T4 (237) sin afectar a la síntesis de TSH (241). Ciertos autores, indican que la quercetina es capaz de inhibir el crecimiento de las hormonas tiroideas, inhibiendo también la PLA₂ a través de vía LOX (242). En el estudio llevado a cabo por Parmar y colaboradores [CITA], se observó que tanto la naranja como el plátano poseen efectos antitiroideos mediante la inhibición de la peroxidasa tiroidea, enzima clave en la síntesis de hormonas tiroideas (243), mediante el incremento de dopamina tras el consumo de plátano (244). Por el contrario observaron el carácter estimulante de la tiroides de otras variedades de frutas y verduras, como el caso del melón, sandía o mango, que estimularon la secreción de T3 y T4 (245).

II - JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

La literatura científica ha documentado ampliamente el rol que juega la alimentación en cuanto a prevención de enfermedades no transmisibles, tales como enfermedades cardiovasculares, hipertensión, obesidad, o diversos tipos de cáncer, entre otras, especialmente a través de la ingesta de alimentos ricos en compuestos bioactivos, como los polifenoles (246,247). Dichos compuestos se encuentran principalmente en frutas y verduras. Por ello, la OMS junto con otros organismos relacionados con la alimentación, recomiendan ingestas de 400 g/día de frutas y verduras (248). Además, se ha demostrado que ingestas de 600 g/día reducen el riesgo de cáncer, y el consumo de 800 g/día reduce tanto el riesgo de enfermedad cardiovascular, como de muerte por todas causas (249).

Se ha visto que alimentos ricos en compuestos bioactivos, como ácidos grasos omega 3 y polifenoles, reducen la inflamación de bajo grado (250). Seguir un patrón de dieta mediterránea es eficaz a la hora de reducir riesgos cardiovasculares, a través de diferentes mecanismos como reducción de lipoproteínas aterogénicas y OxLDL (251), reducción de IL-6, PCR y homocisteína, (252,253) disminución del estrés oxidativo (254) e incremento y mejora en la funcionalidad de las HDL (255).

Desafortunadamente, la inmensa mayoría de población mundial no es capaz de alcanzar la mínima ingesta establecida por las autoridades sanitarias, que se pueden resumir en cinco raciones de fruta y verdura al día (256,257). Por este motivo y con el propósito de dotar de facilidades al consumidor, surgen en el mercado cada vez más productos que ofrecen la posibilidad de incorporar al organismo los diferentes compuestos bioactivos presentes en estos alimentos. Ello se consigue a través de ciertos suplementos o nutracéuticos, que podrían ayudar a alcanzar la recomendaciones nutricionales sanitarias y de esta forma contribuir a una mejora de la salud (258).

Es necesario mencionar que sería más adecuado seguir una estrategia en la que se llevase a cabo una educación nutricional a nivel comunitario, que conllevara un incremento de la ingesta de frutas y verduras. Sin embargo, gran parte de la población no está dispuesta a realizar dichos cambios. No obstante, pese a las declaraciones saludables de los diferentes nutracéuticos a base de polifenoles, la evidencia científica es escasa, dado que se basa comúnmente en ensayos *in vitro* y/o modelos animales, observándose resultados contradictorios en humanos (259). Por tales motivos, se ha considerado necesario evaluar el consumo del presente nutracéutico, rico en polifenoles, en población aparentemente sana que no cubre las recomendaciones diarias de frutas y verduras.

III - OBJETIVOS

III - OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Evaluar la eficacia de un extracto polifenólico a base de frutas, bayas y verduras frente a placebo, en biomarcadores de peroxidación lipídica en orina en población aparentemente sana, tras un consumo a largo plazo.

3.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Evaluar la eficacia del extracto en la peroxidación lipídica generalizada mediante el análisis del total de isoprostanos.
- Determinar la inflamación mediante la variación de las diferentes prostaglandinas tras la ingesta de extracto.
- Evaluar la evolución de biomarcadores de peroxidación lipídica del sistema nervioso central mediante análisis de F_{4t}-neuroprostanos y F₂-dihomo-Isoprostanos.
- Determinar la variación que produce el extracto en biomarcadores sanguíneos de inflamación y del perfil lipídico.
- Evaluar la variación que produce en neurotransmisores y función tiroidea.
- Determinar la seguridad del producto en investigación.

IV - MATERIAL Y MÉTODO

IV - MATERIAL Y MÉTODO

4.1 PRODUCTO EN INVESTIGACIÓN

El producto utilizado durante la intervención presentaba un formato nutracéutico y consistía en una mezcla de 36 fuentes vegetales diferentes, especialmente bayas, frutas y verduras deshidratadas en proporción variable: zumo de frutas, verduras y bayas en polvo, pulpa de manzana, naranja, piña, arándano, melocotón, cereza, acerola, remolacha, ciruela pasa, dátil, mango, zanahoria, perejil, col rizada, brócoli, col, espinacas, salvado de arroz, tomate, hojas de alcachofa, arándanos, moras, grosella negra, uva concord, bayas de saúco, extracto de semilla de uva, extracto de té verde, raíz de jengibre, frambuesas, cacao, granada, mezcla de tocoferoles naturales (γ , δ , α , β -tocóferoles, α -tocóferoles de girasol) mezcla de carotenoides naturales (luteína, β -caroteno, licopeno, astaxantina) pectina de cítricos, bioflavonoides de cítricos, cáscara de limón, carbonato de calcio, ajo en polvo, espirulina, mezcla de enzimas naturales, dióxido de silicio, estearato de magnesio de origen vegetal, tangeretina, y *Lactobacillus acidophilus*.

Sí bien, el producto comercial de la empresa consiste en tres tipos de cápsulas diferentes; 2 de mezcla de bayas, 2 de mezcla de frutas y 2 de mezcla de verduras que se comercializan en botes separados (260,261). Con objeto de cegar a los sujetos y de fabricar un producto y placebo similares, se optó por fabricar capsulas homogéneas con un contenido uniforme de los tres tipos de cápsulas comerciales (bayas, frutas y verduras) para el producto bajo investigación. El protocolo de administración fue 6 cápsulas al día; 3 en el momento previo al desayuno y 3 a media tarde, ambas ingestas acompañadas de agua.

La dosis diaria de 6 cápsulas representaba un aporte un aporte de 600 mg de polifenoles, 159 mg de vitamina C, 18,7 mg de vitamina E, 6,1 mg de luteína, 2,91 mg de caroteno 1 mg de licopeno, 0,15 mg de astaxantina y 318 μ g de folato (261).

La caracterización polifenólica del producto fue previamente realizada en 2015 por Bresciani y colaboradores (261) mediante UHPLC-QqQ-MS, mostrando

un total de 119 compuestos polifenólicos de diferentes familias fenólicas, incluyendo flavanoles como el kaempferol y la quercetina, antocianinas y flavonas. Respecto a la biodisponibilidad, presenta mayor interés el conocimiento de la cantidad biodisponible de polifenoles que la cantidad total de estos, debido a que en numerosas situaciones, los polifenoles con mayor abundancia no son los más activos en el organismo (262). En otro estudio de 2017 acerca de la biodisponibilidad del producto, Bresciani y colaboradores (260) encontraron que de las 92 moléculas monitorizadas, tan solo se pudieron identificar 20 metabolitos circulantes en plasma, siendo todos ellos compuestos conjugados con restos de sulfato, glucurónido, o glicina, apareciendo en diferentes momentos en el plasma en función del lugar de absorción en el tracto digestivo.

Los 20 metabolitos encontrados en plasma fueron;

- Ácido hipúrico
- Ácido 4-hidroxifipúrico
- Feruloilglicina
- Glucurónido de kaempferol
- Glucurónido de quercetina
- Sulfato de quercetina
- Glucurónido de miricetina
- Sulfato de diosmetina
- Sulfato de patuletina
- Sulfato de hesperetina
- Glucurónido de Naringenina
- Glucurónido de hesperetina
- Glucurónido de ácido ferúlico
- Fenil- γ -valerolactona-3'-O-sulfato,
- (4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona-3'-O-sulfato,
- (4'-hidroxifenil)- γ -valerolactona-3'-O-glucurónido,
- Sulfato de ácido hidroxifenilpropiónico
- Sulfato de ácido dihidroxibenzoico
- Sulfato de pirogalol
- Sulfato de ácido metil-trihidroxibenzoico

Con objeto de cegar a voluntarios e investigadores, tanto el producto investigado como el placebo presentaban la misma apariencia visual, siendo ambos fabricados y suministrados por la empresa The Juice Plus+ Company, Collierville, TN, Estados Unidos. La presentación era en forma de productos farmacéuticos encapsulados de color blanco. Fueron suministrados en frascos únicamente diferenciados por un código numérico correspondiente a cada lote, y con las sigas A y B. Una vez finalizada la intervención, se facilitó a los investigadores qué código pertenecía a producto y cuál a placebo.

El placebo, estaba compuesto por celulosa microcristalina, almidón de arroz, cápsula vegetal (celulosa), estearato de magnesio y colorantes artificiales (FD&C amarillo nº 6 y FD&C azul nº 1).

4.2 DISEÑO EL ESTUDIO

Ensayo clínico aleatorizado, doble ciego, cruzado, con dos ramas, controlado con placebo, estratificado por sexo y unicéntrico.

4.2.1 Fases previas a la intervención

Previo a comenzar la intervención, el protocolo fue aprobado por el Comité de Revisión Institucional de la Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM) con fecha de 24 de noviembre de 2017 y bajo el código: CE111072. Posteriormente se registró en www.clinicaltrials.gov bajo el código CFE/JU/44-17.

Para el reclutamiento de los sujetos, se realizó una difusión a través de los medios disponibles en la Universidad Católica San Antonio de Murcia, mediante colocación de carteles por las distintas facultades, así como correos electrónicos a los alumnos de la universidad, al personal docente e investigador, al personal auxiliar de servicios y a los participantes de estudios de intervención previos. Dicha fase de reclutamiento comenzó justo un mes antes del inicio de la fase experimental.

La fase de intervención tuvo lugar en el departamento de Farmacia de la UCAM y, dado el carácter voluntario de participación en el estudio, los sujetos podían abandonar el mismo sin que fuese necesario especificar ninguna razón y sin sufrir desventaja personal alguna.

A su vez, los investigadores tenían la potestad de retirar a un sujeto de la investigación según su propio criterio y siempre quedando debidamente recogido en el cuaderno de recogida de datos y en el diagrama de flujo, de acuerdo entre otras a las siguientes posibilidades:

- Observación de cualquier efecto adverso o nocivo en los sujetos.
- Violaciones del protocolo por parte de los sujetos.
- Pérdida de seguimiento de los sujetos.

4.2.1.1 Fase de selección

Los voluntarios que presentaron interés en formar parte de la investigación fueron sometidos a una fase de selección. En primer lugar y tras la explicación del proceso por parte de los investigadores, tenían que firmar un consentimiento informado (anexo 1). En dicha fase de selección, fueron entrevistados y examinados exhaustivamente para comprobar que cumplían con los criterios de inclusión y exclusión. Para ello, cumplimentaron una encuesta de hábitos alimentarios y de actividad física (anexo 2), y se les talló y pesó para comprobar el IMC. Los sujetos debían de cumplir con todos los criterios de inclusión para poder participar en el estudio, y el solo cumplimiento de uno de los criterios de exclusión era motivo para ser descartados antes de comenzar el ensayo clínico.

- Criterios de inclusión
 - Edad de 18 años o superior a la hora de firmar el consentimiento informado.
 - $IMC \geq 18,5$ y ≤ 35 Kg/m²
 - Ingesta de frutas y verduras inferior a 3 raciones/día.
 - No padecer enfermedad crónica.
 - Capacidad de comprensión del desarrollo del estudio.
 - Disposición a cumplir con los requerimientos y requisitos del estudio.
- Criterios de exclusión
 - Cambios en los hábitos de actividad física durante la intervención.
 - Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
 - Sujetos fumadores.
 - Consumo de medicamentos.

- Consumo de complementos alimenticios, nutracéuticos, multivitamínicos o similares.
- Estar a dieta para pérdida de peso, ser vegetariano o veganos.
- Consumo de más de 3 vasos de alcohol (vino, cerveza) día.
- Problemas con el sueño.
- Haber donado sangre (0,5 L) en el último mes.
- Haber sido sometido a cirugía mayor en los últimos tres meses.

4.2.1.2 *Tamaño de la muestra*

Con el objetivo de obtener una muestra representativa de 100 sujetos, y teniendo en cuenta el 20% de abandono que suele presentarse en los estudios de intervención, se consideró reclutar a un total de 120 sujetos previo a la aleatorización. Finalmente, se consiguió reclutar a 117 sujetos de ambos sexos, de los cuáles tan solo 108 cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, firmaron el consentimiento informado, se les aleatorizó en dos grupos homogéneos y comenzaron la intervención. Durante las fases de la intervención hubo una pérdida de 16 sujetos por diferentes motivos, y un total de 92 sujetos (45 hombres y 47 mujeres) finalizaron la intervención y fueron incluidos en el análisis estadístico.

4.2.1.3 *Aleatorización*

A cada uno de los sujetos que formaron parte de la intervención se les asignó un código (A y B), el cual les hizo pertenecer a un grupo del estudio (N_1 o N_2). La aleatorización fue realizada por un investigador ajeno a la investigación, a través del software Epidat 3.1, el cual otorga una codificación de números a los sujetos a estudio. De este modo, tanto los investigadores como los sujetos desconocían a qué grupo pertenecían (experimental o placebo).

4.2.2 **Desarrollo del estudio**

Incluyendo la fase reclutamiento de un mes, junto con la fase de intervención de 36 semanas (2 fases de 16 semanas separadas por un periodo de lavado de 4 semanas), la duración total del estudio desde que se contactó con el primer posible sujeto hasta la visita del último fue de 40 semanas.

4.2.2.1 Fase de intervención

Una vez realizada la fase de reclutamiento, los sujetos debían acudir al laboratorio en diversas ocasiones para realizar la fase de intervención. La primera visita que realizaron, llamada visita 0 (V0) se correspondió con la visita de selección, la cual se hizo durante el periodo de reclutamiento. En dicha V0 se realizó la comprobación de criterios de inclusión y exclusión, se realizó una encuesta dietética y de hábitos de vida/ejercicio, firma del consentimiento informado y se realizó la aleatorización de los sujetos a estudio.

Una vez realizada la aleatorización y distribuidos los participantes de forma homogénea en sus grupos correspondientes, dio comienzo la fase de intervención. Dicha fase tuvo una duración total de 36 semanas y estuvo dividida en dos periodos de 16 semanas, separados por un periodo de lavado de 4 semanas, tras el que se realizaría el cruzamiento.

En el primer periodo de 16 semanas, se proporcionó a los sujetos el producto que debían consumir de acuerdo con el grupo asignado (extracto o placebo). Seguidamente, se procedió al periodo de lavado de 4 semanas (periodo llevado a cabo para volver a estados basales). Posteriormente, en el segundo periodo de 16 semanas, se realizó el cruzamiento de modo que los sujetos que habían consumido extracto pasaron a consumir producto y viceversa.

Al comienzo de cada fase de 16 semanas (visita 1 (V1) y visita 3 (V3)) se recogieron muestras de orina y se realizaron extracciones sanguíneas para obtener muestras basales. En dichas visitas se les facilitó el producto que debían consumir, así como las pautas de consumo. Transcurridas las 16 semanas de cada periodo, los sujetos debían volver al laboratorio (visita 2 (V2) y visita 4 (V4)). En dichas visitas se volvieron a recoger muestras de orina y se volvieron a realizar extracciones sanguíneas para comprobar la evolución y posibles cambios ocasionados tras la ingesta del producto en investigación (EXT) frente al placebo (PLA).

De acuerdo con la figura 9, que es una representación gráfica del estudio, el periodo entre V1 y V2 se corresponden con el primer periodo de intervención de 16 semanas, el periodo entre la V2 y V3 con el periodo de lavado y el periodo entre V3 y V4 con el segundo periodo de 16 semanas. Además, en la tabla 4 se representa el cronograma del estudio para facilitar la comprensión.

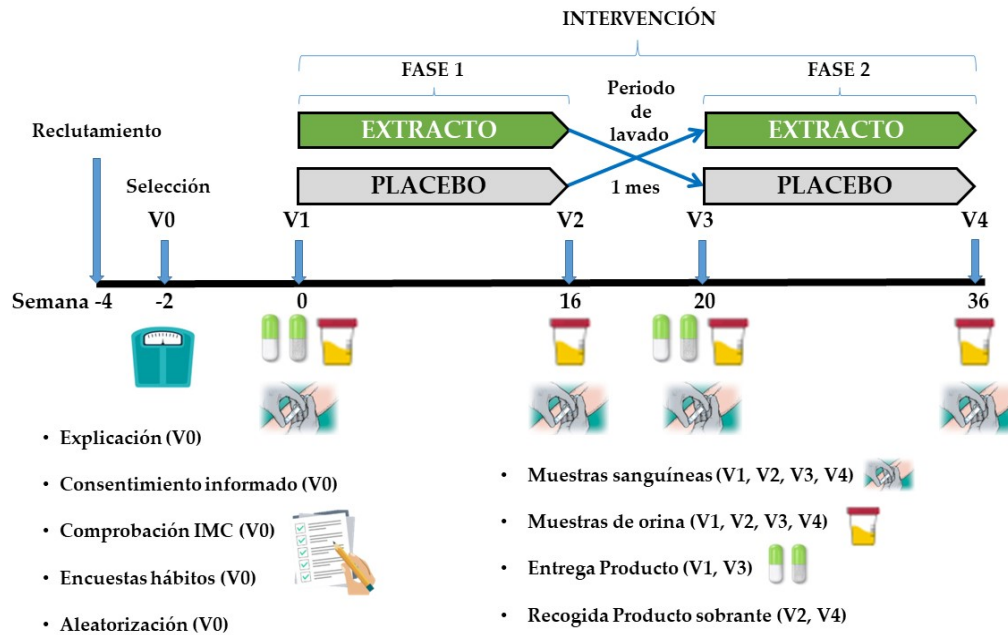


Figura 9. Representación gráfica del estudio. V significa visita.

Tabla 4. Cronograma de visitas realizadas durante el estudio.

	V0	V1	V2	V3	V4
Criterios de inclusión y exclusión	X				
Anamnesis detallada (Encuesta dietética)	X				
Firma consentimiento informado	X				
Aleatorización	X				
Entrega producto/placebo		X		X	
Recogida producto/placebo sobrante			X		X
Recogida muestras de orina		X	X	X	X
Extracción sanguínea		X	X	X	X
Adherencia a la investigación			X	X	X
Comprobación efectos adversos			X	X	X

4.3 TOMA DE MUESTRAS DE PLASMA Y ORINA

Con el objetivo de reproducir en la medida de lo posible las mismas condiciones, los sujetos fueron citados por grupos de lunes a viernes en el laboratorio, en las 4 visitas correspondiente a la intervención (V1, V2, V3 y V4) y distribuidos por turnos entre las 08:30 y las 09:30 de la mañana. Debían acudir en condiciones de ayuno de al menos 12 horas, permitiéndose solo el consumo de agua hasta 3 horas previas a la extracción sanguínea. No se permitió el consumo de ningún tipo de antiinflamatorio, así como la realización de ejercicio físico en las 24 horas previas a la visita.

La extracción sanguínea fue llevada a cabo por personal cualificado de enfermería. Se recolectó de sangre venosa de la vena antecubital en tubos de recolección de sangre Serum Gel and Clot Activator (5 mL)*3 y en un tubo de recolección de sangre k3E/D3EDTA (3 mL). Previo a su envío a laboratorio (Laboratorios MUNUERA SL Murcia, España), se centrifugaron los 3 tubos Serum Gel and Clot Activator (4500 rpm, 5 min, 4º C).

Respecto a la recogida de las muestras de orina, se instruyó a los sujetos a realizar una recogida de 24 horas desde las 24 horas previas a la visita. Para ello se entregaron contenedores con una capacidad de 2L que debían recoger desde la primera de la mañana del día previo a la visita, hasta la primera de la mañana del día de la visita al laboratorio. Una vez entregada la orina a los investigadores, estos anotaron el volumen de 24 horas, agitaron el contenido y almacenaron 4 alícuotas de 1.5 mL homogéneas a -80º C para posteriores análisis.

4.4 VARIABLES A ESTUDIO

4.4.1 Variable principal

4.4.1.1 OXILIPINAS

La variable principal del estudio consistió en la evaluación de diferentes oxilipinas en orina, la interpretación a través de sus diversas rutas metabólicas, así como el análisis del contenido total de estas.

- Químicos y reactivos

Se analizaron doce IsoPs derivadas del AA (2,3-dinor-15-*epi*-15F_{2t}, 2,3-dinor-15-F_{2t}-IsoP, 9-*epi*-15-F_{2t}-IsoP, 15-*epi*-15F_{2t}-IsoP, *ent*-15-*epi*-15F_{2t}-IsoP, 15-keto-15-F_{2t}-IsoP, 15-F_{2t}-IsoP, *ent*-PGF_{2 α} , 5-F_{2t}-IsoP, 5-*epi*-5F_{2t}-IsoP, 15-keto-15E_{2t}-IsoP, 15-*epi*-15E_{2t}-IsoP); dos IsoPs derivadas de DGLA (8-iso-PGF_{1 α} , 8-iso-PGE_{1 α}); dos IsoPs derivadas de EPA (8-F_{3t}-IsoP, 8-*epi*-8-F_{3t}-IsoP); 15 metabolitos enzimáticos derivados del AA (PGD₂, Tetranor-PGJM, 11 β -PGF_{2 α} , 2,3-dinor-11 β -PGF_{2 α} , PGDM, Tetranor-PGDM, PGE₂, 20-OH-PGE₂, Tetranor-PGEM, Tetranor-PGAM, 15-keto-PGF_{2 α} , Tetranor-PGFM, 20-OH-PGF_{2 α} , 19(R)-OH-PGF_{2 α} , 11-DH-TXB₂); dos metabolitos derivados de DGLA (PGE₁, PGF_{1 α}) y un metabolito derivado de EPA (17-*trans*-PGF_{3 α}). En las tablas 5 y 6 se muestran las diferentes oxilipinas (isoprostanos y prostanoïdes, respectivamente) categorizadas en función de su ruta de metabolización, tiempo de retención, transición del ion precursor al ion producto y su peso molecular. En la figura 10 se observa el resumen de las rutas metabólicas de las únicas oxilipinas cuantificadas.

Los estándares auténticos correspondientes a esta gama de oxilipinas se adquirieron en Cayman Chemicals (Ann Arbor, Michigan, EE.UU.). La enzima β -glucuronidasa, tipo H2 de *Helix pomatia*, y el BIS-TRIS (bis-(2hidroxietil)-amino-tris(hidroximetil)-metano) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EE.UU.). Todos los disolventes de grado LC-MS se obtuvieron de J.T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EE.UU.). Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Strata X-AW, 100 mg por 3 mL, se obtuvieron de Phenomenex (Torrance, California, EE.UU.). El agua se trató en un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, Massachusetts, EE.UU.).

Tabla 5. Isoprostanos analizados en la presente investigación y ruta metabólica.

Oxilipinas	Tiempo de retención (min)	MRM Transición (m/z)	Peso Molecular (g/mol)
Isoprostanos			
Isoprostanos derivados del AA			
F₂IsoP (15-Serie)			
2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15F _{2t} (*)	8.29	324.9 > 237.1	326.43
2,3-dinor-15-F _{2t} -IsoP (*)	8.84	325.2 > 237.1	326.4
9- <i>epi</i> -15-F _{2t} -IsoP	11.75	353.2 > 193.1	354.5
15- <i>epi</i> -15F _{2t} -IsoP (*)	11.77	353 > 193	354.5
<i>ent</i> -15- <i>epi</i> -15F _{2t} -IsoP	11.77	353.1 > 309.1	354.5
15-keto-15-F _{2t} -IsoP	11.8	351.1 > 315.1	352.5
15-F _{2t} -IsoP	12.3	353.2 > 193.1	354.5
<i>ent</i> -PGF _{2α} (*)	13.6	353.1 > 309	354.5
F₂IsoP (5-Serie)			
5-F _{2t} -IsoP	12.82	353.1 > 335.2	354.48
5- <i>epi</i> -5F _{2t} -IsoP	13.53	353.2 > 334.8	354.48
E₂IsoP (15-Serie)			
15-keto-15E _{2t} -IsoP	12.04	349 > 234.9	350.5
15- <i>epi</i> -15E _{2t} -IsoP	12.94	355.1 > 315.1	352.47
Isoprotanes derivados del EPA			
8-F _{3t} -IsoP	10.55	351.2 > 126.8	352.47
8- <i>epi</i> -8-F _{3t} -IsoP	11.23	350.6 > 127.2	352.47
Isoprotanes derivados del DGLA			
8-iso-PGF _{1α}	12.14	355.1 > 311.1	356.5
8-iso-PGE _{1α}	12.85	352.9 > 234.8	354.5

AA: Ácido araquidónico; EPA: Ácido eicosapentaenoico DGLA: ácido dihomo- γ -linolénico; MRM: *multiple reaction monitoring*; (*) Oxilipinas que se lograron cuantificar en la presente investigación.

Tabla 6. Prostanoides analizados en la presente investigación y ruta metabólica.

Oxilipinas	Tiempo de retención (min)	MRM Transición (m/z)	Peso Molecular (g/mol)
Prostanoides			
Prostaglandins derivados del AA			
Prostaglandinas ruta-D			
Tetranor-PGDM	3.17	327.1 > 108.9	328.4
PGDM	3.2	327.1 > 309.1	328.4
Tetranor-PGJM	3.6	309 > 155	310.3
2,3-dinor-11 β -PGF _{2α} (*)	10.57	325.2 > 237.1	335.5
PGD ₂ (*)	13.22	350.9 > 315	352.5
11 β -PGF _{2α} (*)	13.61	353 > 309.1	354.5
Prostaglandinas ruta-E			
Tetranor-PGEM	3.17	327 > 308.8	328.4
Tetranor-PGAM	3.58	309 > 290.9	310.3
20-OH-PGE ₂	4.66	367.1 > 349.2	368.5
PGE ₂ (*)	13.07	351.2 > 333.1	352.5
Prostaglandinas ruta-F			
Tetranor-PGFM	3.14	329.4 > 311.1	330.4
20-OH-PGF _{2α}	5.1	369.2 > 325.1	370.5
19(R)-OH-PGF _{2α}	5.15	369.2 > 325.1	370.5
15-keto-PGF _{2α} (*)	12.9	351.1 > 314.9	352.5
Tromboxano			
11-DH-TXB ₂	12.32	367 > 161.1	372.5
Prostaglandinas derivados del EPA			
17- <i>trans</i> -PGF _{3α}	12.47	350.9 > 307	352.5
Prostaglandinas derivados del DGLA			
PGE ₁	12.84	353.2 > 317.2	354.5
PGF _{1α} (*)	13.67	355.2 > 311	356.5

AA: Ácido araquidónico; EPA: Ácido eicosapentaenoico DGLA: ácido dihomo- γ -linolénico; MRM: *multiple reaction monitoring*; (*) Oxilipinas que se logaron cuantificar en la presente investigación.

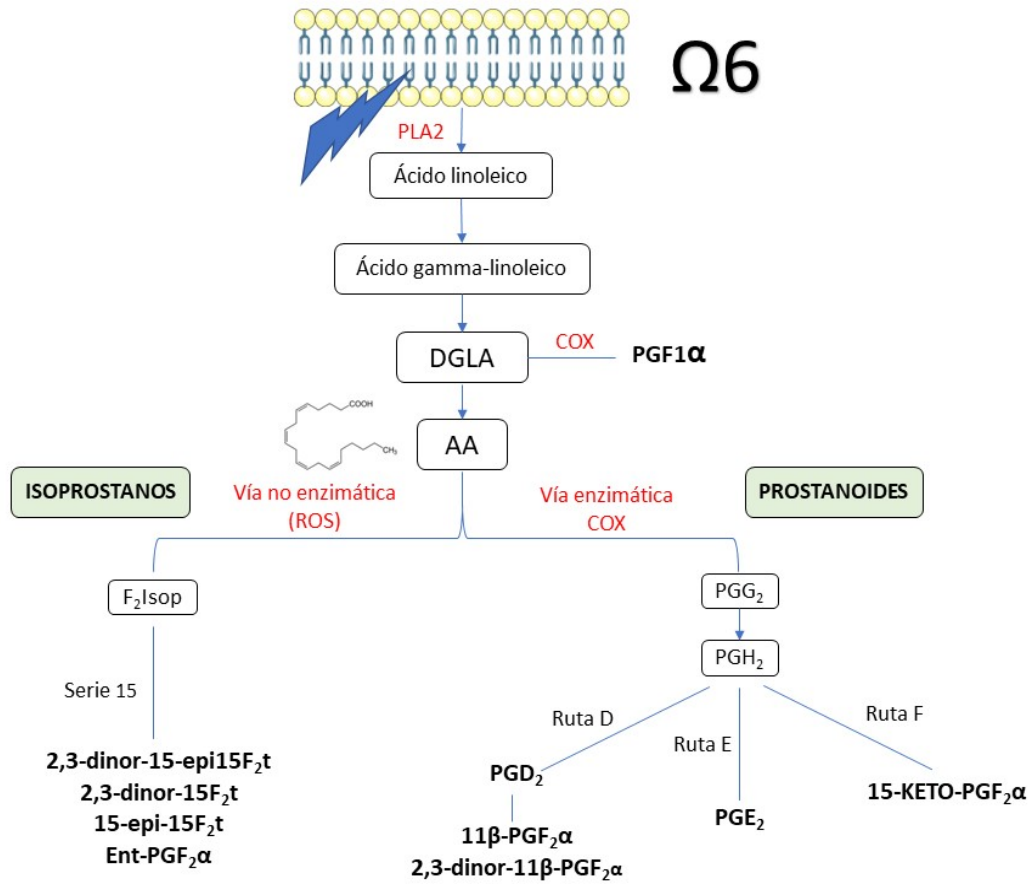


Figura 10. Resumen de las rutas de oxilipinas cuantificadas en el presente estudio. Las oxilipinas cuantificadas están resaltadas en color negro. Elaboración propia.

4.4.2 Variables secundarias

En cuanto a variables secundarias, se realizó el análisis e interpretación de F₄-Neuroprostanos, F₂-dihomoisoprostanos y bioquímicas.

4.4.2.1 NEUROPROSTANOS, F₂-DIHOMO-ISOPROSTANOS

- Químicos y reactivos

Tres Neuroprostanos (4(RS)-4F_{4t}-NeuroP, 4-*epi*-4-F_{3t}-NeuroP, 4-F_{4t}-NeuroP); y tres F_{2t}-dihomo-Isoprostanos (17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo-IsoP, 17-F_{2t}-dihomo-IsoP, *Ent*-7(RS)-7F_{2t}-dihomo-IsoP) fueron sintetizados por el equipo de Durand en el Institut des Biomolécules Max Mosseron (IBMM) (Montpellier, Francia). La tabla 7 muestran los diferentes NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsPs analizados.

La enzima β-glucuronidasa, tipo H2 de *Helix pomatia*, y el BIS-TRIS (bis-(2hidroxietyl)-amino-tris(hidroximetil)-metano) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EE.UU.). Todos los disolventes de grado LC-MS se obtuvieron de J.T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, EE.UU.). El ácido clorhídrico, el hexano, el ácido tricloroacético y el acetato de etilo se compararon a Panreac (Castejón del Vallés, Barcelona, España). Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) Strata X-AW, 100 mg por 3 mL, se compraron a Phenomenex (Torrance, California, EE.UU.). El agua se trató en un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, Massachusetts, EE.UU.).

Tabla 7. Neuroprostanos y F_{2t}-dihomo-Isoprostanos analizados en la presente investigación.

NeuroPs // F _{2t} -dihomo-IsPs	Tiempo de retención (min)	MRM Transición (m/z)	Peso Molecular (g/mol)
Neuroprostanos derivados de DHA			
4(RS)-4-F _{4t} -NeuroP	5.26	377.1 > 271.2	378.5
4- <i>epi</i> -4-F _{3t} -NeuroP	7.18	379.0 > 219.0	378.5
4-F _{4t} -NeuroP *	4.10	377.1 > 333.1	378.5
F_{2t}-dihomo-Isoprostanos derivados de ADA			
17- <i>epi</i> -17-F _{2t} -dihomo-IsoP *	5.90	381.0 > 337.1	382.5
17-F _{2t} -dihomo-IsoP *	6.54	381.0 > 337.1	382.5
<i>Ent</i> -7(RS)-7F _{2t} -dihomo-IsoP *	5.89	381.1 > 363.2	382.5

DHA: ácido docosahexaenoico; ADA: Ácido adrenico; MRM: multiple reaction monitoring; (*) NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsPs que se logaron cuantificar en la presente investigación.

4.4.2.2 BIOQUÍMICAS

Los biomarcadores analizados para cada variable fueron:

- Biomarcadores pro-inflamatorios:

En cuanto biomarcadores proinflamatorios se determinaron la **OxLDL** (ng/mL) por ensayo ELISA en muestras de suero, **TNF- α** (pg/mL) y **sNTRF1** (ng/mL) por ELISA competitivo (DRG diagnostic marca), **PCR** (mg/L) ultrasensible por inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) y homocisteína (pg/mL) en un BN ProSpec®analizador (según el protocolo provisto en el kit Siemens N Latex HCYOPAX 03).

- Biomarcadores de riesgo cardiovascular:

Homocisteína (pg/mL) en un BN ProSpec®analizador (según el protocolo provisto en el kit Siemens N Latex HCYOPAX 03).

- Biomarcadores asociados al perfil lipídico:

Colesterol total, HDL y TG. Mediante técnica Colesterol oxidasa/peroxidasa, con reactivos Bio Systems y analizar BA 400 BioSystems. Y para las tres variables los resultados se expresaron en mg/dL.

- Vitaminas:

Vitamina E (mcg/mL) por HPLC con un cromatógrafo JASCO (PU-980 Intelligent PLC-Plus) y una columna Betasil-C18 (tamaño de partícula 5 μ m, 250 \times 4,6 mm) conectada a un detector de fluorescencia JASCO (Detector de Fluorescencia Inteligente FP-920), y **vitamina B12** (pg/mL) por quimioluminiscencia con inmunoensayos comerciales utilizando equipo automatizado Centaur XP Siemens Diagnostics (Siemens Healthcare SA).

- Catecolaminas:

Cortisol (mcg/L) usando la técnica de quimioluminiscencia con inmunoensayo Immulite 2000 (DPC, Gwynedd, RU), y **noradrenalina** (pg/mL), **adrenalina** (pg/mL) y **dopamina** (pg/mL) por HPLC con flujo de 0.5mL/min, T^o de 35 °C, sensibilidad de 20, potencial de 0.7, fase móvil de acetonitrilo-agua, y fase inversa de C18 usando n detector electroquímico.

- Función tiroidea

T3 (mcg/L), **T4** (mcg/L) y **TSH** (mU/L) utilizando equipo automatizado Centaur XP Siemens Diagnostics (Siemens Healthcare SA).

4.5 EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE OXILIPINAS, NEUROPROSTANOS Y F₂-DIHOMO- ISOPROSTANOS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QQQ-MS/MS

Para llevar a cabo la extracción de las oxilipinas, neuroprostanos y F₂-dihomo-Isoprostanos humanos en la orina, se realizó previamente una etapa de hidrólisis enzimática que simulaba la digestión, seguida de la extracción en fase sólida (SPE) que se describe a continuación (115,263).

Una vez recogidas las muestras de orina de cada sujeto, se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Para la hidrólisis enzimática, se dejaron descongelar las muestras y se tomó 1 mL de orina a temperatura ambiente a la que se añadieron 100 µL de tampón de acetato 0,1M, pH 4,9, luego se añadieron 55 µL de enzima (β -glucuronidasa *Helix pomatia* G-0876) para eliminar los conjugados glucurónico y sulfato según (122,167) y se incubó durante 2 horas a 37°C en baño caliente. Después de dos horas, se añadieron 500 µL de MeOH/HCL mM para provocar un precipitado proteico, se agitó en vórtex y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min.

Posteriormente, se pasó a la fase 2 de SPE. Para el procesamiento de las muestras, el sobrenadante se transfirió a tubos falcon de 15 mL, se añadieron 1250 µL de MeOH y se agitó en vórtex. Se añadieron 2 mL de tampón Bis Tris 0,02 M HCL, pH 7 y se volvió a agitar. El siguiente paso fue acondicionar los cartuchos (Stra-ta-X-AW- Phenomenex) y luego cargar la muestra. Para acondicionar los cartuchos, se añadieron 2 mL de MeOH y 2 mL de MiliQ H₂O, se cargó la muestra y se lavó con 4 mL de MiliQ H₂O y el flujo de aire eliminó los compuestos no intersecantes de los cartuchos. Posteriormente, se realizó la elución de los compuestos de interés con 1 mL de MeOH y se almacenó en un eppendorf para posteriormente secar el eluyente en el concentrador de vacío de velocidad durante 24 horas y se almacenó congelado hasta su posterior análisis.

Antes del análisis por UHPLC, la muestra tuvo que ser reconstituida con 200 µL de fase móvil (H₂O/0,1% ácido fórmico:MeOH, 90:10), baño sónico durante 10 min y filtrado a través de filtros de PTFE de 0,45 µL con jeringas de 1 mL para finalmente introducir la muestra en viales de vidrio ámbar con inserto.

4.6 ANALISIS DE OXILIPINAS MEDIANTE UHPLC-QQQ-MS/MS

La separación cromatográfica de las oxilipinas presentes en la orina se llevó a cabo empleando un UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo 6460 QqQ-MS/MS (Agilnet Technologies, Waldbronn, Alemania), utilizando la configuración descrita anteriormente (85,263). La separación cromatográfica se realizó en una columna ACQUITY BECH C18 (2,1 × 150 mm, tamaño de poro de 1,7 μm) (Waters, MA, EE.UU.). El análisis MS se aplicó en modo monitorización de reacciones múltiples (MRM) electrospray (ESI) negativo. Las fases móviles utilizadas fueron el disolvente A (Milli-Q H₂O/ácido acético (99,99:0,01, v/v)) y el disolvente B (MeOH/ácido acético (99,99:0,01, v/v)). El caudal y el volumen de inyección fueron de 0,150 mL/min y 20 μL/min, respectivamente. La identificación y cuantificación de las oxilipinas se logró mediante el análisis de las masas parentales y los patrones de fragmentación específicos de las oxilipinas de las tabla 5 y 6, realizados mediante análisis de espectrometría de masas en modo de MRM y la aplicación de la ionización por ESI. Además, la identificación y cuantificación de las oxilipinas monitoreadas se realizó utilizando estándares auténticos de las oxilipinas referenciadas en las tablas 5 y 6. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron con el software MassHunter versión B.08.00 (Agilent Technologies, Alemania).

4.7 ANALISIS DE NEUROPROSTANOS Y F_{2T}-DIHOMO-ISOPROSTANOS EN ORINA MEDIANTE UHPLC-QQQ-MS/MS

La separación cromatográfica de los NeuroPs/F_{2T}-dihomo-IsoPs presentes en la orina se llevó a cabo empleando un sistema de UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem de triple cuadrupolo 6460 QqQ-MS/MS (Agilnet Technologies, Waldbronn, Alemania), utilizando la configuración descrita anteriormente (167). La separación cromatográfica se realizó en una columna ACQUITY BECH C18 (2,1 × 50 mm, tamaño de poro de 1,7 μm) (Waters, MA, EE. UU.). Las temperaturas de la columna fueron de 6 °C (izquierda) y 6 1^o (derecha). La MRM se realizó utilizando el modo de ionización por ESI y el tiempo de permanencia fue de 25 ms para todas las transiciones MRM. Las fases

móviles A (H₂O) y B(MeOH) contenían 0,01% de ácido acético (v/v). La velocidad de flujo fue de 0,2 mL/min, utilizando un esquema de gradiente lineal: (t;%B):(0,0;60,00),(7,00;70,00),(7,01;90,00),(10,00; 90,00),(10,01;60,00). El volumen de inyección fue de 20 µL. Las condiciones de funcionamiento de los parámetros de la EM fueron las siguientes: flujo de gas, 8 L/min; nebulizador, 30 psi; voltaje del capilar, 4000V; voltaje de la boquilla, 1000V; temperatura del gas, 325 °C; temperatura del gas de la vaina, 350 °C; y flujo de gas del chorro, 12 L/min. La concentración urinaria de las NeuroPs/dihomo-IsoPs se calculó a partir de la relación de área de los picos de iones de los compuestos sobre los estándares deuterados correspondientes. La adquisición y el procesamiento de los datos se realizaron con el software MassHunter versión B.08.00 (Agilent Technologies, Alemania).

4.8 ESTADÍSTICA

Se realizó un análisis descriptivo (media y desviación estándar SD) de todas las variables del estudio, en condiciones basales y en su evolución, empleando el test de Kolmogórov-Smirnov para verificar la distribución normal de los datos discontinuos, tanto en periodo de consumo de producto (EXT) como de consumo de placebo (PLA).

En la línea de base se realizaron comparaciones t-Student entre las dos ramas del estudio para comprobar que se partía de grupos homogéneos. Para analizar la evolución de las variables entre grupos se realizó un análisis de varianza para medidas repetidas con un factor intrasujeto (tiempo: basal y final para cada rama de estudio) y un factor intersujeto (producto: experimental y placebo). Para el análisis post-hoc se realizó el test de Bonferroni. Se realizaron comparaciones para aquellos efectos significativos con la opción de asumir o no igualdad de varianzas.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizada fue de 0,05 y el análisis estadístico se realizó mediante el software informático SPSS Statistics 27 (SPSS, Inc., Chichago, IL, USA).

4.9 CONFIDENCIALIDAD

El presente ensayo clínico se realizó siguiendo las normas de buena práctica clínica y las condiciones que deben regir los estudios de intervención con humanos delimitados en la Declaración de Helsinki.

Durante el ensayo clínico, todos los datos obtenidos se conservaron en los más altos niveles de conducta profesional y confidencialidad, siguiendo con la legislación nacional y europea vigente acerca de protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 relativo a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos).

Los investigadores informaron a cada uno de los sujetos de que su información personal solo tenía fines a nivel de investigación y sería almacenada en una base de datos informática.

La identidad de los sujetos fue codificada de forma confidencial, de modo que en ningún lugar apareciese el nombre de los sujetos, y solo el personal debidamente autorizado tuvo acceso a dichos datos personales en caso de verificación de algún criterio relacionado con el estudio.

V - RESULTADOS

V - RESULTADOS

5.1 POBLACIÓN A ESTUDIO

Un total de 117 sujetos sanos de ambos sexos fueron reclutados para comenzar la intervención, de los cuales 4 no cumplían los criterios de selección. El resto fueron aleatorizados en 2 grupos homogéneos y, tras la aleatorización, 5 de ellos decidieron no acudir a la primera visita. Finalmente 108 sujetos comenzaron la intervención y, tras las pérdidas de seguimiento y abandono, un total de 92 sujetos completaron la intervención y fueron incluidos en el análisis estadístico final. En la tabla 8 se pueden observar las características demográficas de la población que finalizó la intervención y en la figura 11 el diagrama de flujo del estudio detallado.

Tabla 8. Características demográficas de la población que finalizó la intervención.

	Total	N ₁	N ₂
N	92	48	44
Hombres	45	20	25
Mujeres	47	28	19
Edad (años)	34 ± 11	33 ± 10	36 ± 12
Peso (kg)	73.10 ± 14.29	70.68 ± 13.88	75.68 ± 14.44
Estatura (cm)	172 ± 9	171 ± 9	173 ± 9
IMC (kg/m ²)	24.4 ± 3.43	23.98 ± 3.42	24.99 ± 3.38

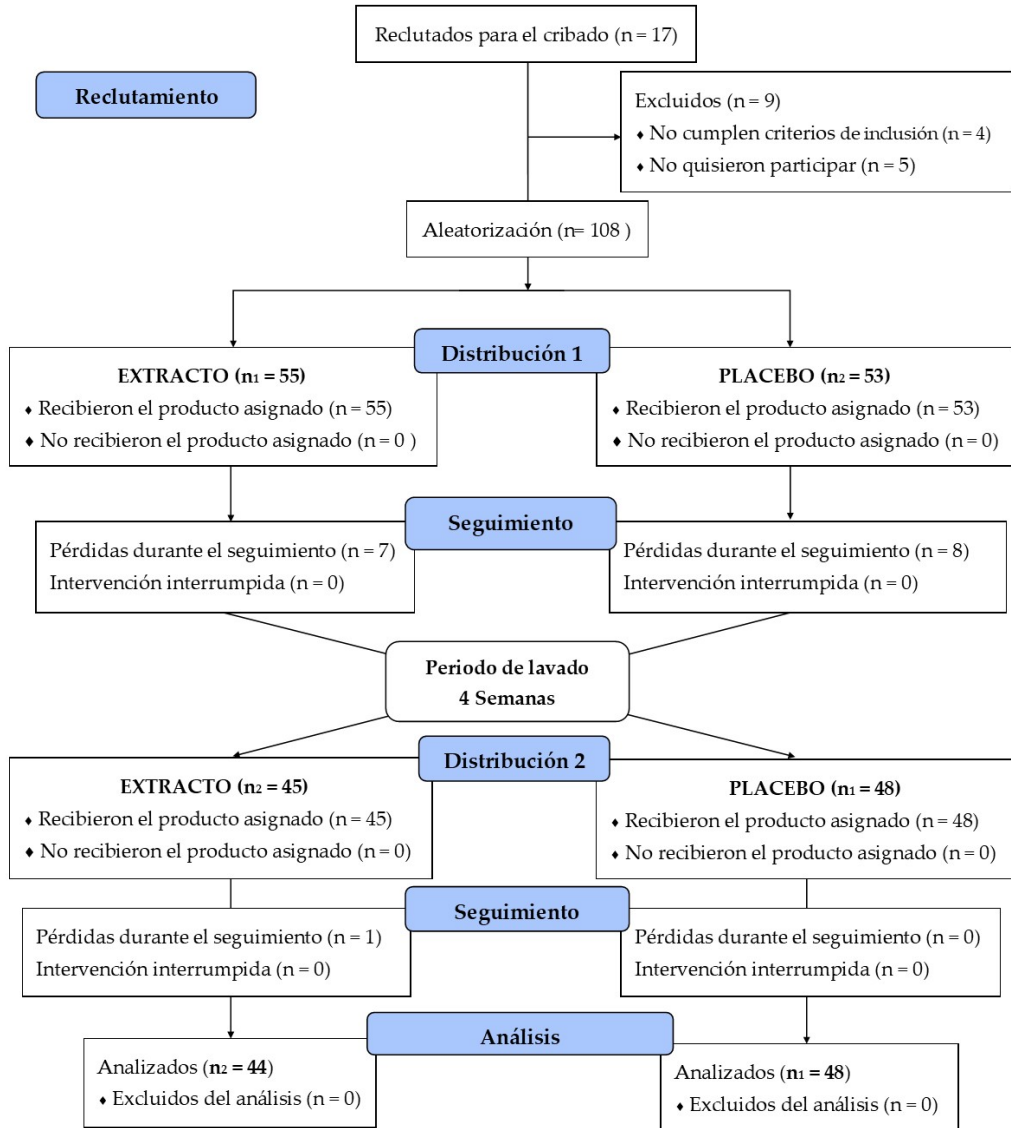


Figura 11. Diagrama de flujo del estudio.

5.2 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA GENERALIZADA

Tanto al inicio como al final de la intervención, se recogieron muestras de orina para determinar la variación de diferentes oxilipinas. Conviene resaltar que al comienzo de la intervención los niveles de basales oxilipinas no presentaban diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación entre grupos en ninguna oxilipina, por lo tanto, se puede afirmar que partían de valores homogéneos.

5.2.1 Prostanoides

De los diferentes prostanoides evaluados en la tabla 6, se logró cuantificar los mostrados en la tabla 9, la cual está segmentada por rutas metabólicas para facilitar su comprensión.

Tabla 9. Evolución de los diferentes prostanoides en orina medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.

Oxilipina (ng/ml)	Producto	Basal	Final	<i>p1</i>	<i>p2</i>
Prostanoides derivados de AA					
Ruta D					
PGD ₂	Placebo	0.86 ± 0.21	0.77 ± 0.16	0.065	0.855
	Extracto	0.80 ± 0.19	0.73 ± 0.17	0.081	
11-β-PGF _{2α}	Placebo	1.18 ± 0.38	1.13 ± 0.32	0.704	0.324
	Extracto	1.11 ± 0.43	0.92 ± 0.27	0.037*	
2,3-dinor-11β-PGF _{2α}	Placebo	1.16 ± 0.31	1.20 ± 0.41	0.692	0.134
	Extracto	1.17 ± 0.35	1.02 ± 0.27	0.033*	
Ruta E					
PGE ₂	Placebo	1.01 ± 0.30	1.10 ± 0.39	0.342	0.172
	Extracto	1.02 ± 0.38	1.26 ± 0.38	0.020*	
Ruta F					
15-keto-PGF _{2α}	Placebo	0.92 ± 0.23	0.88 ± 0.24	0.438	0.244
	Extracto	0.90 ± 0.25	0.74 ± 0.19	0.004*	

Tabla 9. Continuación

Oxilipina (ng/ml)	Producto	Basal	Final	<i>p1</i>	<i>p2</i>
Prostanoides derivados de DGLA					
PGF _{1α}	Placebo	0.63 ± 0.14	0.64 ± 0.10	0.886	0.145
	Extracto	0.64 ± 0.10	0.59 ± 0.15	0.101	
TOTAL PROSTANOIDES					
Total Prostanoides	Placebo	4.81 ± 1.43	4.94 ± 1.50	0.596	0.158
	Extracto	4.70 ± 1.33	4.36 ± 0.91	0.105	

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre momento basal y final ($p < 0.05$). *p1* (intragrupo) *p2* (producto*tiempo).

- **Ruta D**

Las 3 PGs derivadas de la ruta D variaron de forma similar durante la intervención. En el caso de PGD₂, PG primaria y precursora de la serie, se observaron disminuciones similares en ambos grupos siendo ($\Delta -0.08$ ng/ml) ($p = 0.065$) para PLA y ($\Delta -0.07$ ng/ml) ($p = 0.081$) EXT sin llegar a ser significativas tras la ingesta de ninguno de los productos. Al realizar la comparación entre la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias significativas ($p = 0.855$). Dicha ausencia de significación podría deberse a su vida corta y rápida metabolización en el resto de los metabolitos de la ruta D.

En cuanto a los metabolitos de PGD₂, para la 11- β -PGF_{2 α} se observó una disminución no significativa tras el consumo de PLA ($\Delta -0.05$ ng/ml) ($p = 0.704$), mientras que tras el consumo de EXT sí se observó una reducción más pronunciada ($\Delta -0.22$ ng/ml) y significativa ($p < 0.037$). Al realizar al comparativa de la evolución entre grupos al final de la intervención no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.118$). En el caso de la 2,3-dinor-11 β -PGF_{2 α} , tras el consumo de PLA se observó un ligero incremento ($\Delta 0.04$ ng/ml) ($p = 0.692$) no significativo, y de forma opuesta tras el consumo de EXT se apreció una reducción significativa ($\Delta -0.16$ ng/ml) ($p < 0.033$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.134$). Los datos sugieren que el consumo de EXT podría contribuir a ciertas mejoras, mediante la reducción de metabolitos derivados de la PGD₂.

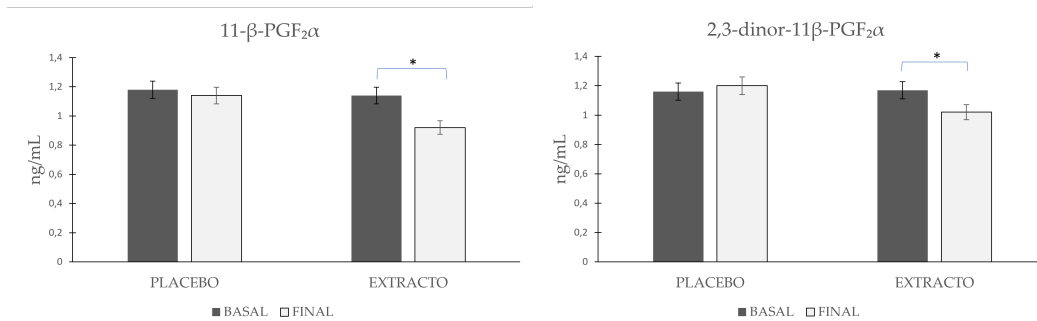


Figura 12. Evolución de PG derivadas de la ruta D durante la intervención.

- **Ruta E**

En el caso de la ruta E, solo fue posible cuantificar su metabolito primario y precursor de la ruta, la PGE₂. Los valores de dicha PG se incrementaron tras el consumo de PLA (Δ 0,09 ng/ml) de forma no significativa ($p = 0,342$), mientras que tras el consumo de EXT se incrementaron de forma significativa (Δ 0,24 ng/ml) ($p < 0,020$). Al realizar la comparativa de la evolución entre grupos al final de la intervención, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, sí se observan diferencias estadísticamente significativas en el momento final de la intervención entre PLA y EXT ($p < 0,017$) que no se observaban en el momento basal ($p = 0,943$), lo que sugiere que el consumo de EXT podría contribuir a mejoras respecto al PLA mediante mecanismos antiinflamatorios.

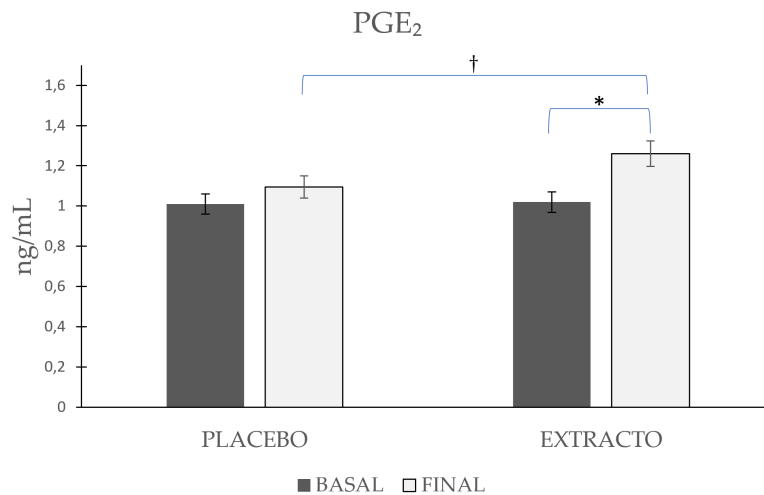


Figura 13. Evolución de la PGE₂ durante la intervención.

- **Ruta F**

Respecto a la ruta F de PGs derivadas del AA, solo fue posible cuantificar la 15-keto-PGF_{2α}. Tras el consumo de PLA los valores se mantuvieron constantes con una ligera reducción ($\Delta -0.04$ ng/ml) no significativa ($p = 0.438$), mientras que tras el consumo de EXT se produjo una reducción ($\Delta -0.16$ ng/ml) estadísticamente significativa ($p = 0.004$). Tras realizar al comparativa de la evolución entre grupos al final de la intervención, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.244$). A pesar de ello, sí se observan diferencias estadísticamente significativas en el momento final de la intervención entre PLA y EXT ($p = 0.045$) que no se observaban en el momento basal ($p = 0.690$), lo que sugiere que el consumo de EXT podría contribuir a mejoras respecto al PLA.

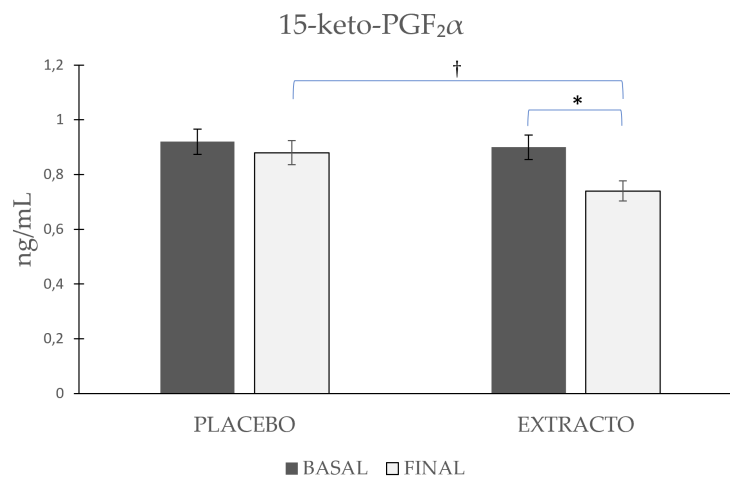


Figura 14. Evolución de la 15-keto-PGF_{2α} durante la intervención.

- **Prostanoides derivados de DGLA**

En el caso de PG derivadas de DGLA se logró cuantificar la PGF_{1α}, cuyos valores se mantuvieron estables tras el consumo de PLA ($\Delta 0.01$ ng/ml) ($p = 0.886$) y ligeramente reducidos tras el consumo de EXT ($\Delta -0.05$ ng/ml) ($p = 0.101$) no siendo en ninguno de los dos casos. Al realizar la comparación de la evolución entre grupos, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.145$).

- **Prostanoides totales**

El valor total de prostanoides varió de forma opuesta en cada grupo, en función del tipo de producto consumido. Tras el consumo de PLA se observó un incremento de los valores totales de (Δ 0.13 ng/ml), mientras que tras el consumo de EXT un descenso de (Δ -0.34 ng/ml). Pese a no observarse diferencias estadísticamente significativas tras consumo de PLA ($p = 0.596$) o EXT ($p = 0.105$) en los grupos por separado, ni al realizar la comparativa de la evolución entre grupos al final de la intervención ($p = 0.158$), sí se observan diferencias estadísticamente significativas en el momento final de la intervención entre PLA y EXT ($p < 0.017$) que no se observaban en el momento basal ($p = 0.690$), lo que sugiere que el consumo de EXT podría contribuir a mejoras respecto al PLA reduciendo el contenido total de prostanoides.

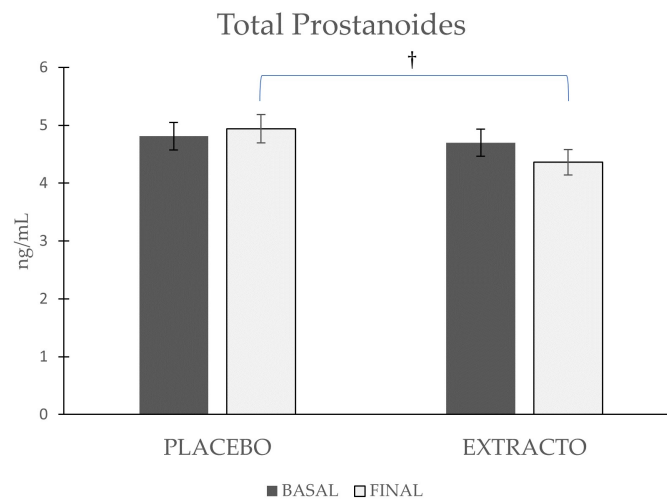


Figura 15. Evolución de la suma de prostanoides totales durante la intervención.

5.2.2 Isoprostanos

De los isoprostanos analizados, se lograron cuantificar los 4 que se muestran en la tabla 10, todos derivados de la serie 15, cuyo precursor es el 15-F_{2t}-IsoP.

Tabla 10. Evolución de los diferentes isoprostanos en orina medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.

Oxilipina (ng/ml)	Producto	Basal	Final	<i>p</i> -1	<i>p</i> -2
Isoprostanos					
Isoprostanos derivados de 15-F _{2t} -IsoP					
2,3-dinor-15- <i>epi</i> -15F _{2t}	Placebo	0.56 ± 0.16	0.53 ± 0.17	0.436	0.625
	Extracto	0.60 ± 0.10	0.55 ± 0.08	0.025*	
2,3-dinor-15F _{2t}	Placebo	0.60 ± 0.15	0.67 ± 0.10	0.098	0.059
	Extracto	0.61 ± 0.12	0.56 ± 0.11	0.258	
15- <i>epi</i> -15F _{2t}	Placebo	1.20 ± 0.31	1.28 ± 0.38	0.500	0.867
	Extracto	1.07 ± 0.36	1.12 ± 0.32	0.643	
<i>ent</i> -PGF _{2α}	Placebo	1.62 ± 0.39	1.72 ± 0.51	0.513	0.150
	Extracto	1.59 ± 0.37	1.44 ± 0.32	0.137	
TOTAL ISOPROSTANOS					
Total IsoPs	Placebo	2.76 ± 1,24	3.52 ± 1.08	<0.001*	<0.001 [#]
	Extracto	3.33 ± 1,24	2.89 ± 0.96	0.025*	

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre momento basal y final ($p < 0.05$). # Significa diferencias estadísticamente significativas entre grupos al final de la intervención ($p < 0.05$). *p*1 (intragrupo) *p*2 (producto*tiempo).

- **Ruta 15-F_{2t}-Isop**

El 15-F_{2t}-Isop, considerado como isoprostano primario y precursor de la ruta 15 no se logró cuantificar, lo cual podría ser debido a la vida corta y rápida metabolización de dichos compuestos, no obstante, sí se lograron cuantificar 4 de sus metabolitos.

- **2,3-dinor-15-epi-15F_{2t}**

Los valores de 2,3-dinor-15-epi-15F_{2t} se vieron reducidos tras el consumo de PLA (Δ -0.03 ng/ml) ($p = 0.436$) y de EXT (Δ -0.03 ng/ml) ($p < 0.025$) siendo estadísticamente significativo solo tras el consumo de EXT. Al realizar la comparación de la evolución entre grupos al final de la intervención no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.625$).

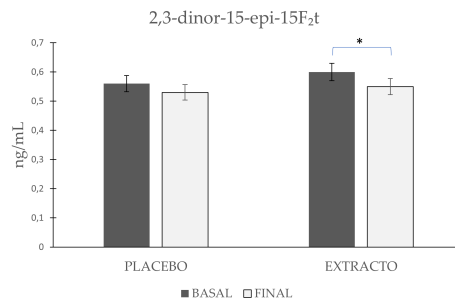


Figura 16. Evolución 2,3-dinor-15-epi-15F_{2t} durante la intervención.

- **2,3-dinor-15F_{2t}**

Los valores de 2,3-dinor-15F_{2t} se mantuvieron estables con un ligero incremento no significativo tras consumo de PLA (Δ 0.07 ng/ml) ($p = 0.098$) y una leve reducción no significativa tras consumo de EXT (Δ -0.04 ng/ml) ($p = 0.258$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos al final de la intervención no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.059$). No obstante, al realizar la comparación del momento final entre grupos, sí se observan diferencias estadísticamente significativas entre PLA y EXT ($p < 0.002$) que no se observaban en el momento basal ($p = 0.768$), lo que sugiere que el consumo de EXT podría contribuir a mejoras respecto al PLA si el protocolo de consumo hubiera sido más prologando.

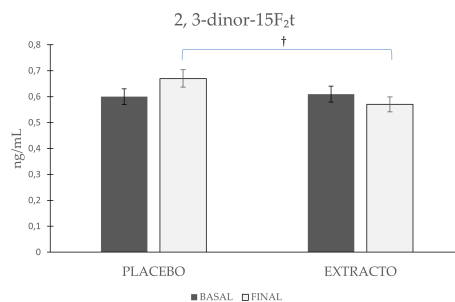


Figura 17. Evolución 2,3-dinor-15F_{2t} durante la intervención.

- **15-*epi*-15F_{2t}**

Los valores de 15-*epi*-15F_{2t} se mantuvieron estables a lo largo de la intervención. Se observó un ligero incremento no significativo independientemente del producto consumido PLA (Δ 0.08 ng/ml) ($p = 0.500$) EXT (Δ 0.05 ng/ml) ($p = 0.643$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos al final de la intervención no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.867$).

- ***Ent*-PGF_{2 α}**

Los valores de 15-*epi*-15F_{2t} se mantuvieron estables a lo largo de la intervención. Se observó un ligero incremento no significativo tras el consumo de PLA (Δ 0.1 ng/ml) ($p = 0.513$) y una ligera reducción tras el consumo de EXT (Δ -0.15 ng/ml) ($p = 0.643$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos al final de la intervención no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.150$). No obstante, al realizar la comparación del momento final entre grupos, sí se observan diferencias estadísticamente significativas entre PLA y EXT ($p < 0.017$) que no se observaban en el momento basal ($p = 0.745$), lo que sugiere que el consumo de EXT podría contribuir a mejoras respecto al PLA si el protocolo de consumo hubiera sido más prologando.

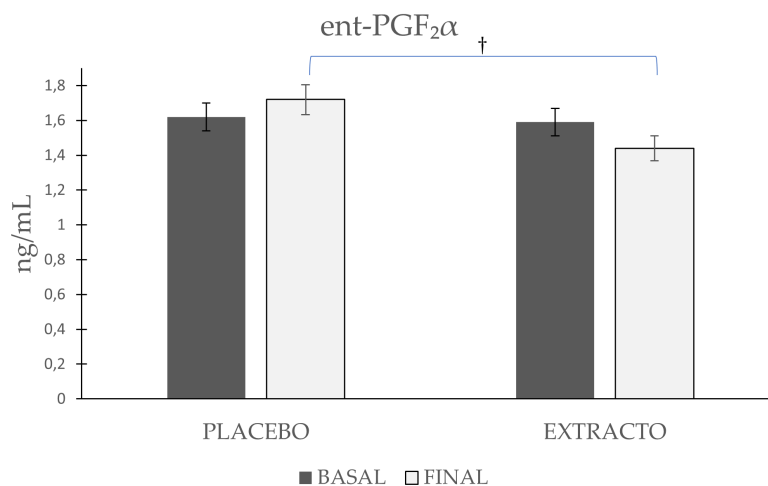


Figura 18. Evolución de la ent-PGF_{2 α} durante la intervención.

- **Isoprostanos totales**

Los valores de isoprostanos totales variaron en diferente dirección en función del producto consumido. Tras la ingesta de PLA se vieron incrementados de forma significativa ($\Delta 0.76$ ng/ml) ($p < 0.001$), mientras que tras el consumo de EXT se vieron reducidos de forma significativa ($\Delta -0.44$ ng/ml) ($p < 0.025$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos al final de la intervención se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), y al realizar la comparación del momento final entre grupos, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre PLA y EXT ($p < 0.001$). Dichos resultados parecen confirmar que el consumo es efectivo para reducir el contenido de isoprostanos.

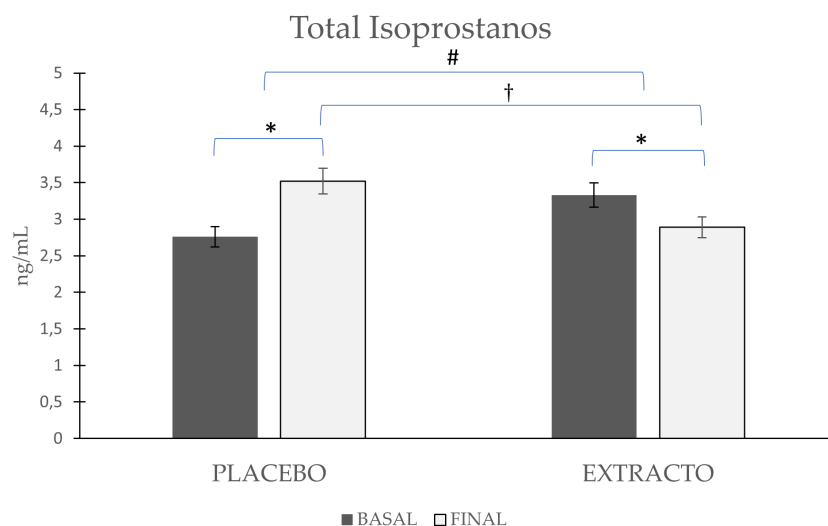


Figura 19. Evolución del total de Isoprostanos durante la intervención.

5.2.3 Oxilipinas totales

En cuanto a oxilipinas totales se consideró la suma tanto de prostanoides como IsoPs debido a que proceden de la misma ruta de metabolización del AA cuya variación de valores a lo largo de la intervención se pueden consultar en la tabla 11.

Tabla 11. Evolución de las oxilipinas totales en orina medidas durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.

Oxilipina (ng/ml)	Producto	Basal	Final	<i>p</i> -1	<i>p</i> -2
Total Oxilipinas	Placebo	7,57 ± 2,11	8,46 ± 2,07	0,021*	<0,001#
	Extracto	8,03 ± 1,86	7,25 ± 1,23	0,006*	

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre momento basal y final ($p < 0.05$). # Significa diferencias estadísticamente significativas entre grupos al final de la intervención ($p < 0.05$). *p*1 (intragrupo) *p*2 (producto*tiempo).

El contenido total de oxilipinas varió de forma distinta en función del producto consumido como describe la tabla 11. Tras el consumo de PLA sus valores se vieron incrementados significativamente ($\Delta 0.89$ ng/ml) ($p < 0.001$), mientras que tras el consumo de EXT sus valores se vieron reducidos de forma significativa ($\Delta -0.78$ ng/ml) ($p < 0.001$). Además, es destacable que tras realizar la comparación en la evolución entre grupos al final de la intervención también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), al igual que ocurre cuando se compara el momento final entre PLA y EXT ($p < 0.001$), lo que parece confirmar que el consumo de EXT es eficaz en la reducción de oxilipinas en orina.

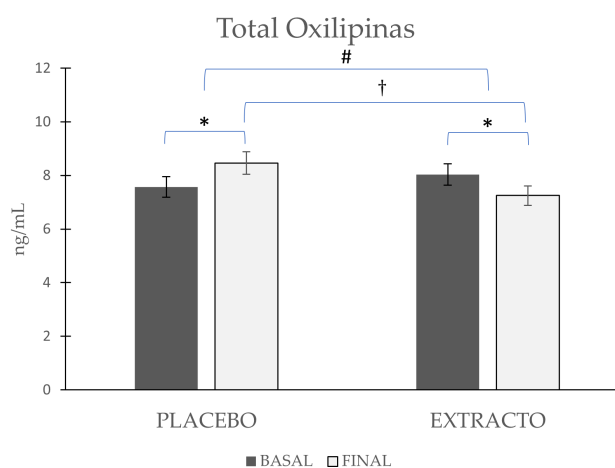


Figura 20. Evolución de la suma de oxilipinas totales durante la intervención.

5.3 BIOMARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA ESPECÍFICOS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Tanto al inicio como al final de la intervención se recogieron muestras de orina para determinar la variación de diferentes NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsoPs. Salvo para el Ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo, conviene resaltar que al comienzo de la intervención los niveles basales oxilipinas no presentaban diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación entre grupos en ninguna oxilipina, por lo tanto, el resto partían de valores homogéneos. Su evolución durante la intervención se aprecia en la tabla 12.

Tabla 12. Evolución de neuroprostanos en orina medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo y final de la intervención.

Neuroprostanos (ng/ml)	Producto	Basal	Final	<i>p</i> -1	<i>p</i> -2
F_{2t}-dihomo-IsoPs					
17- <i>epi</i> -17-F _{2t} -dihomo	Placebo	2,51 ± 0,881	2,39 ± 0,828	0,621	0,001 [#]
	Extracto	2,59 ± 0,853	0,94 ± 0,261	0,001*	
17-F _{2t} -dihomo	Placebo	1,23 ± 0,358	1,23 ± 0,406	0,983	0,084
	Extracto	1,34 ± 0,425	1,17 ± 0,308	0,015	
<i>ent</i> -7(RS)-7-F _{2t} -dihomo	Placebo	0,60 ± 0,182	0,63 ± 0,181	0,971	0,001 [#]
	Extracto	2,51 ± 0,643	0,54 ± 0,149	0,001*	
NeuroPs					
4-F _{4t} -NeuroP	Placebo	18,12 ± 6,41	18,50 ± 5,86	0,86	0,02 [#]
	Extracto	22,04 ± 7,47	14,10 ± 5,335	0,001*	

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre momento basal y final ($p < 0.05$). # Significa diferencias estadísticamente significativas entre grupos al final de la intervención ($p < 0.05$). *p*1 (intragrupo) *p*2 (producto*tiempo).

5.3.1 F2t-dihomo-IsoProstanos

- **17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo**

Los valores 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo se vieron reducidos de forma no significativa tras el consumo de PLA ($\Delta -0.121$) ($p < 0.001$), mientras que tras el consumo de EXT se vieron reducidos de forma más pronunciada y significativa ($\Delta -1.65$ ng/ml) ($p < 0.001$). Además, es destacable que tras realizar la comparación en la evolución entre grupos al final de la intervención se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), al igual que ocurre cuando se compara el momento final entre PLA y EXT ($p < 0.001$), que lo dota de mayor potencia estadística y parece confirmar que el consumo de EXT es eficaz en la reducción de dicha variable.

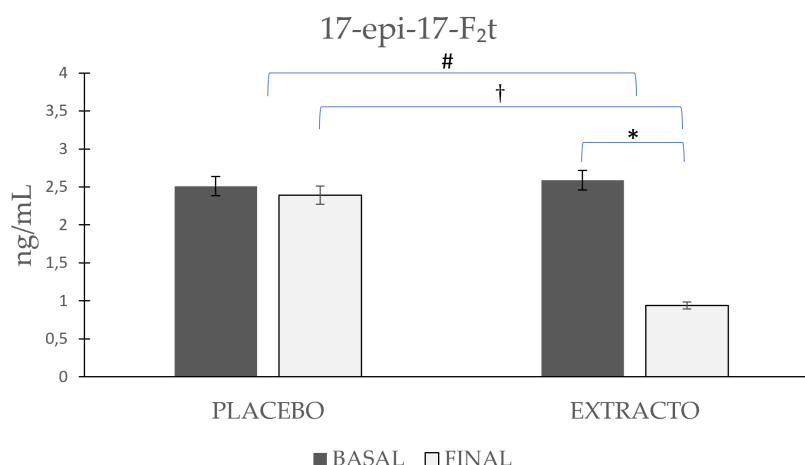


Figura 21. Evolución de 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo durante la intervención.

- **17-F_{2t}-dihomo**

Los valores 17-F_{2t}-dihomo se mantuvieron estables tras el consumo de PLA ($\Delta 0$) ($p < 0.983$), mientras que tras el consumo de EXT se vieron reducidos de forma significativa ($\Delta -0.17$ ng/ml) ($p < 0.015$). No obstante, al realizar la comparación en la evolución entre grupos al final de la intervención no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.084$). Dichos datos sugieren que el consumo de EXT mejora dicha variable reduciendo su valor respecto a PLA.

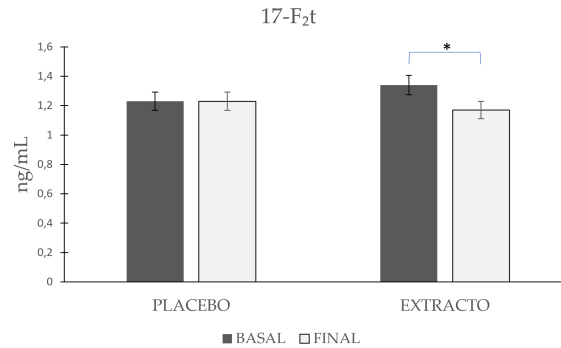


Figura 22. Evolución de 17-F_{2t}-dihomo durante la intervención.

- ***ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo**

Los valores de *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo partían de valores dispares y no homogéneos al comienzo de la intervención ($p < 0.001$), siendo más elevados en el grupo EXT. Al comparar la evolución en los grupos por separado se observa que no se alteran tras consumo de PLA ($\Delta 0.03$) ($p < 0.971$), mientras que tras el consumo de EXT se vieron reducidos de forma significativa ($\Delta -1.97$ ng/ml) ($p < 0.001$). Tras realizar la comparación en la evolución entre grupos al final de la intervención se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), y al realizar la comparación al final del estudio dejaron de observarse las diferencias significativas del estado basal ($p = 0.152$). Dichos resultados parecen mostrar que el EXT presenta eficacia en cuanto a la reducción de dicha variable. No obstante, dado que al comienzo de la intervención los resultados eran muy dispares, y al desconocimiento del motivo se debe ser cauto interpretando dichos resultados.

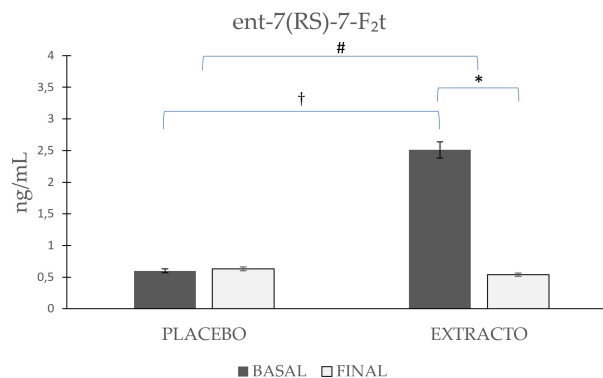


Figura 23. Evolución de *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo durante la intervención.

5.3.2 Neuroprostanos

- **4-F_{4t}-Neurop**

Respecto al 4-F_{4t}-Neurop, neuroprostano más representativo se observa que tras el consumo de PLA sus valores no variaron de forma significativa (Δ 0.38) ($p < 0.86$), mientras que tras el consumo de EXT se vieron reducidos de forma significativa (Δ -7.94 ng/ml) ($p < 0.001$). Al realizar la comparación en la evolución entre grupos al final de la intervención se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.02$), además para dar más peso a la potencia estadística al analizar la diferencia en el momento final de la intervención entre PLA y EXT también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.025$). Por lo tanto, el consumo de EXT parece eficaz a la hora de reducir dicha variable.

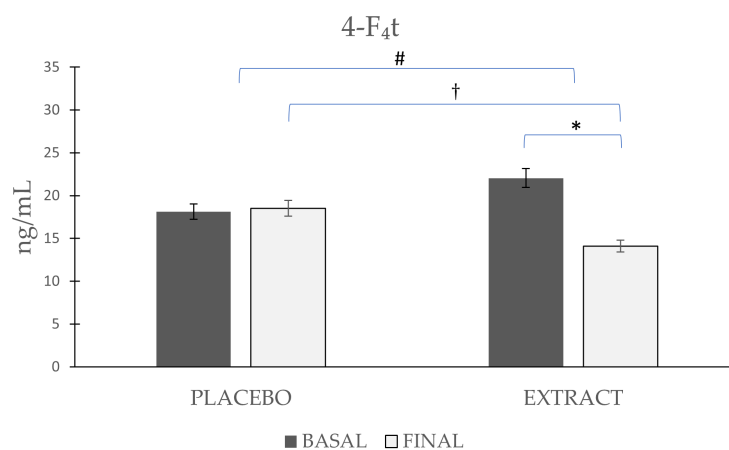


Figura 24. Evolución de 4-F_{4t}-Neurop durante la intervención.

5.4 BIOMARCADORES EN PLASMA

Al comienzo y final de cada fase se realizaron extracciones sanguíneas para evaluar diferentes parámetros en plasma; (parámetros asociados a la inflamación, parámetros asociados a riesgo cardiovascular, perfil lipídico, vitaminas, inmunidad, función tiroidea, catecolaminas y parámetros para determinar la seguridad del producto). La tabla 13 muestra la evolución de los biomarcadores plasmáticos evaluados durante la intervención.

Tabla 13. Evolución de los diferentes biomarcadores en plasma medidos durante la intervención. Los valores están expresados como media y desviación estándar (SD) al comienzo (basal) y final de la intervención.

Biomarcador	Producto	Basal	Final	<i>p</i> -1	<i>p</i> -2
Parámetros de Inflamación					
OxLDL (ng/mL)	Placebo	88.16 ± 30.14	86.08 ± 32.57	0.632	0.189
	Extracto	78.97 ± 24.48	69.52 ± 15.64	0.005*	
sTNFR ₁ (ng/mL)	Placebo	1.43 ± 0.32	1.43 ± 0.33	0.864	0.023
	Extracto	1.49 ± 0.37	1.36 ± 0.26	0.043*	
PCR (mg/L)	Placebo	1.84 ± 0.64	1.71 ± 0.41	0.085	0.792
	Extracto	1.50 ± 0.33	1.39 ± 0.37	0.021*	
TNF- α (pg/mL)	Placebo	5.69 ± 1.02	5.30 ± 0.87	0.006*	0.302
	Extracto	5.82 ± 1.14	5.22 ± 1.21	<0.001*	
Parámetros asociados a riesgo cardiovascular					
Homocisteína (mcm/L)	Placebo	11.75 ± 2.21	11.07 ± 2.92	0.024*	0.094
	Extracto	11.65 ± 2.30	10.33 ± 2.17	<0.001*	
Parámetros asociados perfil lipídico					
HDL colesterol (mg/dL)	Placebo	66.28 ± 15.34	61.76 ± 15.14	0.004*	<0.001 [#]
	Extracto	63.12 ± 15.11	69.37 ± 15.29	0.002*	
Triglicéridos (mg/dL)	Placebo	74.07 ± 26.92	73.94 ± 29.27	0.967	0.744
	Extracto	69.79 ± 24.93	68.39 ± 21.54	0.588	
Colesterol Total (mg/dL)	Placebo	187.71 ± 40.21	188.78 ± 39.07	0.329	0.866
	Extracto	184.06 ± 36.30	187.13 ± 32.07	0.456	
Vitaminas					
Vitamina B12 (pg/mL)	Placebo	309.11 ± 85.1	314.99 ± 82.20	0.430	0.260
	Extracto	308.41 ± 123.51	333.45 ± 115.00	0.092	
Vitamina E (mcg/mL)	Placebo	13.20 ± 3.33	13.21 ± 3.53	0.980	0.944
	Extracto	13.15 ± 3.68	13.20 ± 3.37	0.906	
Catecolaminas					
Cortisol (mcg/L)	Placebo	14.32 ± 5.22	13.92 ± 3.72	0.358	0.152
	Extracto	13.42 ± 4.07	13.87 ± 4.03	0.261	
Adrenalina (pg/mL)	Placebo	22.05 ± 8.03	23.50 ± 6.98	0.191	0.894
	Extracto	22.67 ± 8.61	23.91 ± 6.97	0.232	
Noradrenalina (pg/mL)	Placebo	361.86 ± 110.58	367.06 ± 102.28	0.717	0.093
	Extracto	343.64 ± 96.38	382.85 ± 83.88	0.005*	

Tabla 13. Continuación

Biomarcador	Producto	Basal	Final	<i>p</i> -1	<i>p</i> -2
Dopamina (pg/mL)	Placebo	15.51 ± 3.09	16.25 ± 4.60	0.224	<0.001#
	Extracto	15.43 ± 2.66	19.61 ± 5.74	<0.001*	
Función tiroidea					
T3 (mcg/L)	Placebo	1.13 ± 0.23	1.07 ± 0.19	0.003*	0.912
	Extracto	1.09 ± 0.23	1.03 ± 0.16	0.003*	
T4 (mcg/L)	Placebo	7.64 ± 1.31	8.21 ± .130	<0.001*	0.195
	Extracto	8.75 ± 7.49	8.27 ± 1.53	0.545	
TSH (mU/L)	Placebo	2.28 ± 1.03	2.28 ± 1.06	0.987	0.813
	Extracto	2.23 ± 1.11	2.20 ± 1.03	0.657	

* Significa diferencias estadísticamente significativas entre momento basal y final ($p < 0.05$). ** Significa diferencias estadísticamente significativas entre momento basal y final ($p < 0.001$). #Significa diferencias estadísticamente significativas al comparar la evolución entre grupos ($p < 0.05$). *p*1 (intragrupo) *p*2 (producto*tiempo)

5.4.1 Biomarcadores relacionados con inflamación

- LDL OXIDADA

Al evaluar la evolución de los grupos por separado, los valores de OxLDL disminuyeron de forma significativa tras el consumo de EXT (Δ -9.45 ng/ml) ($p < 0.005$) vs PLA (Δ -2.08 ng/ml) ($p = 0.632$), donde, pese a observarse cierta reducción, esta no fue significativa, lo cual refleja que el consumo de EXT mejora dicha variable, mientras que el PLA no produce dichas mejoras. Al realizar la comparación de la evolución de los grupos durante la intervención, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.189$). No obstante, al comparar el momento final entre PLA y EXT, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), por lo que se puede concluir que el consumo de producto mejora en cuanto a reducción de dicha variable.

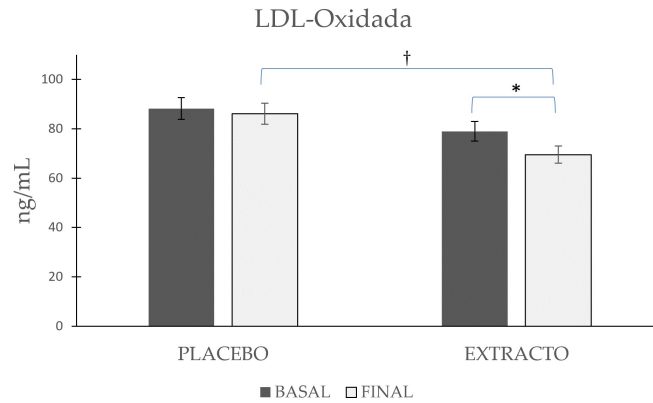


Figura 25. Evolución de la LDL-Oxidada durante la intervención.

- **Proteína C-Reactiva**

En el caso de la PCR, se observó una disminución en ambos grupos independientemente del producto consumido ($\Delta -0.13$ mg/L) ($\Delta -0.11$ mg/L) para PLA y EXT respectivamente. No obstante, dicha reducción solo fue significativa tras el consumo de EXT ($p < 0.021$) vs PLA ($p = 0.085$), por lo que se puede concluir que el consumo de EXT mejora dicha variable respecto PLA. Al realizar la comparativa de la evolución entre grupos durante la intervención, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.792$). No obstante, al realizar la comparativa entre productos al final de la intervención sí se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), por lo tanto, el consumo de EXT parece producir una mejora en cuanto a reducción de la presente variable frente al PLA.

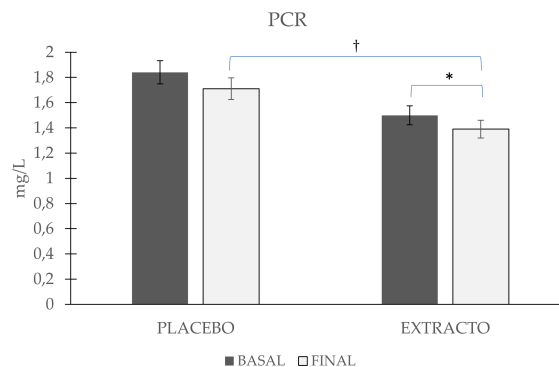


Figura 26. Evolución de la PCR durante la intervención.

- **Receptor 1 del factor de necrosis tumoral**

En el caso de sTNFR₁, estese mantiene estable tras el consumo de PLA (Δ 0 ng/ml) ($p = 0.864$) mientras que se observa una reducción significativa tras el consumo de EXT (Δ -0.13 ng/ml) ($p < 0.043$), lo cual refleja que tras el consumo de EXT se ve mejorada dicha variable. Al realizar la comparación de la evolución de los grupos durante la intervención se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.023$), lo cual dota de mayor peso estadístico a la hora de concluir que el consumo de EXT mejora el valor de esta variable vs PLA.

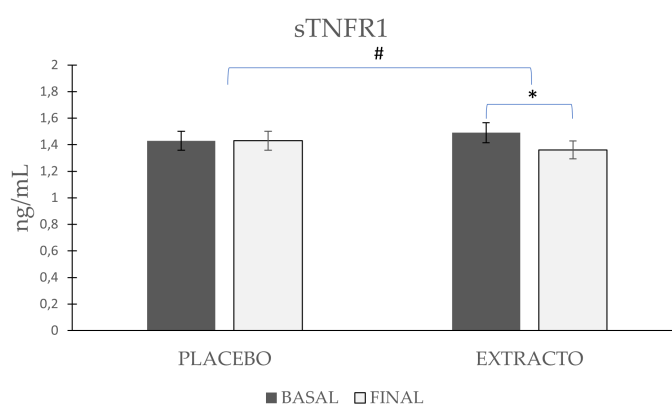


Figura 27. Evolución de sTNFR1 durante la intervención

- **Factor de necrosis tumoral α**

Respecto al TNF- α , se observaron reducciones estadísticamente significativas independientemente del consumo de EXT o PLA. No obstante, dicha reducción y significación fue más pronunciada tras el consumo de EXT (Δ -0.6 pg/mL) ($p < 0.001$) vs PLA (Δ -0.39 pg/mL) ($p < 0.006$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.302$).

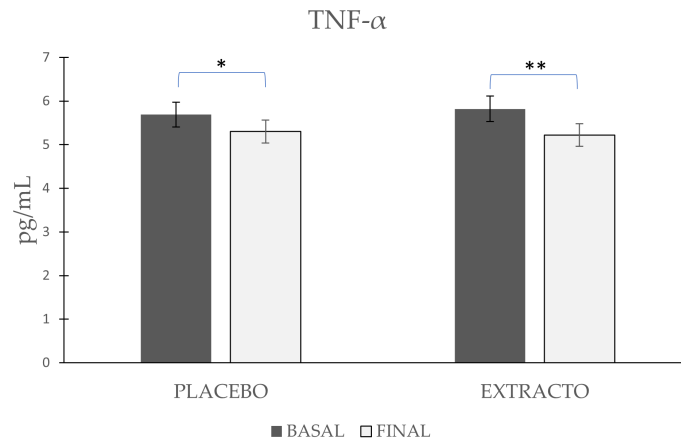


Figura 28. Evolución de TNF- α durante la intervención.

5.4.2 Biomarcadores de riesgo cardiovascular

- Homocisteína

Los valores de homocisteína se vieron reducidos, tanto tras el consumo de EXT como de PLA. Si bien, si se analizan los datos se observa que dicha disminución fue más pronunciada y con mayor significación estadística tras el consumo de EXT ($\Delta -1.32$ mcm/L) ($p < 0.001$), en comparación con el PLA ($\Delta -0.68$ mcm/L) ($p < 0.024$). Al realizar la comparativa en la evolución de los grupos durante la intervención, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.094$), por tal motivo no se puede concluir que el EXT mejore la presente variable.

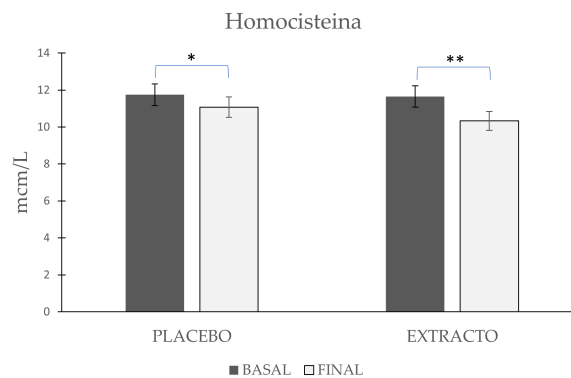


Figura 29. Evolución de Homocisteína durante la intervención.

5.4.3 Perfil lipídico

- **Colesterol HDL**

Los valores de colesterol HDL, variaron de forma opuesta y significativa en función de producto consumido. Tras el consumo de EXT se observó un incremento de (Δ 6.25 mg/dL) ($p < 0.002$) y tras el consumo de PLA una reducción de (Δ -4.52 mg/dL) ($p < 0.004$). Al analizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención también se observaron diferencias significativas en entre grupos ($p < 0.001$), y al realizar la comparación entre PLA y EXT al final de la intervención también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.002$). Dichos datos dotan de un gran peso estadístico y reflejan que el consumo de EXT mejora los niveles de HDL colesterol frente al PLA.

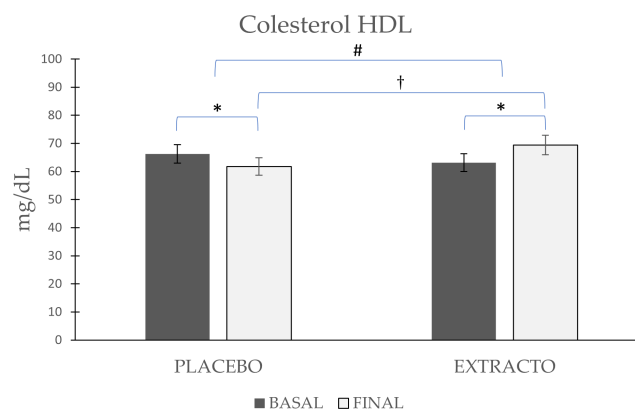


Figura 30. Evolución del colesterol HDL durante la intervención

- **Triglicéridos**

Los valores de TG se mantuvieron estables a lo largo de la intervención, con una ligera reducción no significativa tanto tras el consumo de EXT (Δ -1.4 mg/dL) ($p = 0.588$) como de PLA (Δ -0.13 mg/dL) ($p = 0.967$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.744$), por lo que no se puede afirmar que el consumo de EXT mejore dicha variable.

- **Colesterol total**

Al igual que con los TG, los valores de colesterol se mantuvieron estables a lo largo de la intervención. En este caso se observaron ligeros incrementos no significativos tras el consumo de EXT (Δ 3.07 mg/dL) ($p = 0.456$) y de PLA (Δ 1.07 mg/dL) ($p = 0.329$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.866$), por lo que no se puede afirmar que el consumo de EXT mejore dicha variable.

5.4.4 Vitaminas

- **Vitamina B12 y vitamina E**

Los valores plasmáticos de vitaminas se mantuvieron estables, sin cambios significativos tras consumo de EXT o PLA. En el caso de la vitamina B12 se observó un ligero incremento (Δ 5.88 pg/mL) ($p = 0.43$) tras consumo de PLA y de (Δ 25.04pg/mL) ($p = 0.092$) tras consumo de EXT, mientras que los de vitamina E fueron (Δ 0.01 μ g/mL) ($p = 0.98$) para PLA y (Δ 0.05 mcg/mL) ($p = 0.906$) para EXT. Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos vitaminas siendo ($p = 0.260$) y ($p = 0.944$) para vitamina B12 y vitamina E respectivamente.

5.4.5 Catecolaminas

- **Cortisol**

Los valores de cortisol se mantuvieron estables a lo largo de la intervención, sin observarse cambios estadísticamente significativos. En el caso de PLA se observó un descenso (Δ -0.4 mcg/L) ($p = 0.358$), y en el caso de EXT un incremento de (Δ -0.45 mcg/L) ($p = 0.261$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.152$), por lo que no se puede afirmar que el consumo de EXT mejore dicha variable.

- **Adrenalina**

De forma similar al cortisol, los valores de adrenalina también se mantuvieron estables sin cambios estadísticamente significativos a lo largo de la intervención en ninguno de los grupos. En este caso, se apreció un ligero incremento (Δ 1.45 pg/mL) ($p = 0.191$) y (Δ 1.24 pg/mL) ($p = 0.232$) para PLA y EXT respectivamente. Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.894$), por lo que no se puede afirmar que el consumo de EXT mejore dicha variable.

- **Noradrenalina**

En el caso de la noradrenalina, se observó un incremento en sus valores tras finalizar la intervención. Tras consumo de PLA el incremento fue ligero (Δ 5.2 pg/mL) y no significativo ($p = 0.717$), mientras que tras el consumo de EXT el incremento fue más pronunciado (Δ 39.21 pg/mL) presentado una variación estadísticamente significativa ($p < 0.005$). No obstante, al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.093$).

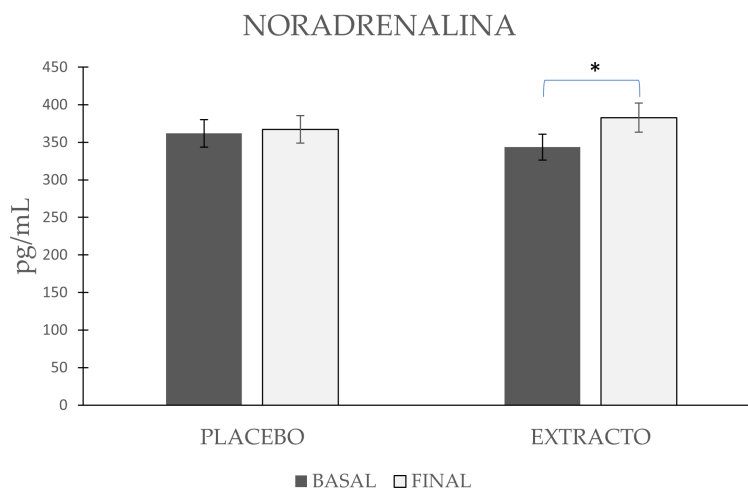


Figura 31. Evolución de la noradrenalina durante la intervención

- **Dopamina**

Los valores de dopamina se vieron incrementados de forma significativa tras el consumo de EXT (Δ 4.18 pg/mL) ($p < 0.001$) y de forma no significativa (Δ 0.74 pg/mL) ($p = 0.224$) tras el consumo de PLA. Para dicha variable, al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$), al igual que al comparar EXT y PLA al final de la intervención ($p < 0.001$). Estos datos sugieren que el consumo de EXT mejora considerablemente dicha variable respecto al PLA.

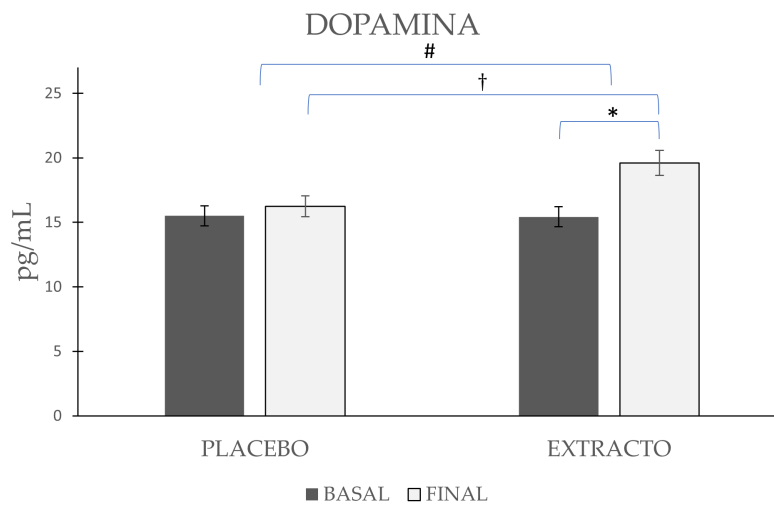


Figura 32. Evolución de dopamina durante la intervención.

5.4.6 Función tiroidea

- **T3**

Los valores de T3 se vieron disminuidos de forma significativa ($p < 0.003$) tanto tras el consumo de EXT como de PLA, siendo además la disminución en ambos de igual valor (Δ -0.06 mcg/L). Consecuentemente, al realizar la comparativa de la evolución entre grupos durante la intervención, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.912$), y no se puede afirmar que la ingesta de EXT mejore dicha variable.

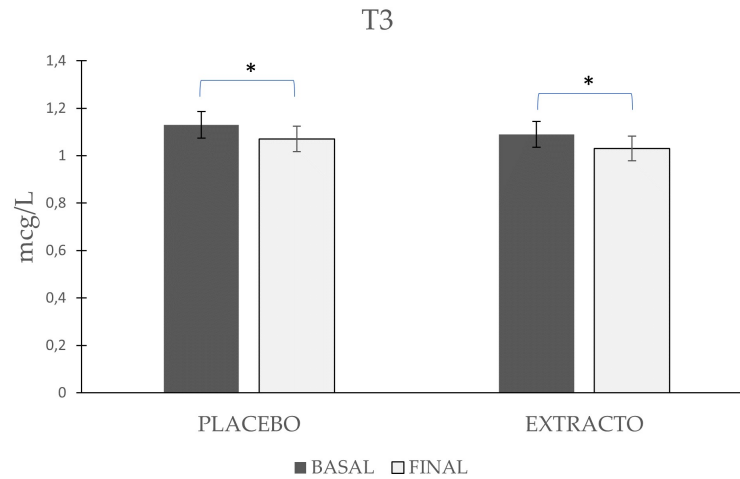


Figura 33. Evolución de T3 durante la intervención.

- **T4**

En el caso de la T4 los valores variaron de forma opuesta en función del producto consumido. En el caso del PLA se vieron incrementados ($\Delta 0.57$ mcg/L) de forma significativa ($p < 0.001$), mientras que tras consumo de EXT se vieron reducidos ($\Delta -0.48$ mcg/L) de forma no significativa ($p = 0.545$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.195$).

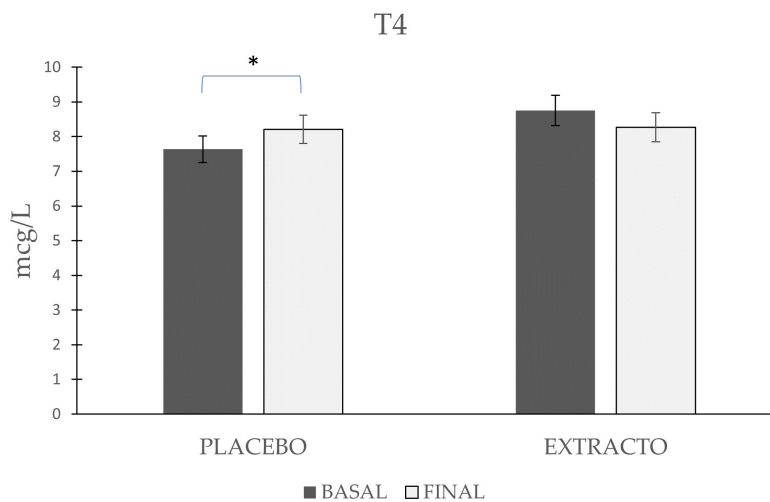


Figura 34. Evolución de T4 durante la intervención.

- **TSH**

Los valores de TSH se mantuvieron estables a lo largo de la intervención. Tras el consumo de PLA no se observaron cambios en sus valores ($\Delta 0$ mU/L) ($p = 0.987$), mientras que tras el consumo de EXT se observó un ligero descenso ($\Delta -0.03$ mU/L) no significativo ($p = 0.657$). Al realizar la comparación de la evolución entre grupos durante la intervención, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.813$), por lo que no se puede afirmar que el consumo de EXT mejore dicha variable.

5.4.7 Parámetros de seguridad

- **GOT, GPT, GAMMA GT**

Para determinar la seguridad del producto bajo investigación, se evaluaron diferentes enzimas hepáticas denominadas transaminasas (GOT, GPT y GAMMA GT) con el objetivo de evaluar la función hepática de los sujetos, sin observarse diferencias estadísticamente significativas en ninguna estas ($p > 0.05$) tras el consumo de EXT o PLA. Por tal motivo, se puede considerar que el producto bajo investigación es seguro.

VI - DISCUSIÓN

VI - DISCUSIÓN

Las ECV y el cáncer son unas de la primera causas de mortalidad a nivel mundial, y desafortunadamente han incrementado en las últimas décadas tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo (264). El estrés oxidativo es una de las causas directas o indirectas de dichas patologías (265–267), y puede ser modulado por cambios en el estilo de vida, como por ejemplo a través de la alimentación (246). En este sentido, es ampliamente conocido el papel que juegan los polifenoles, ejerciendo protección cardiovascular, debido a que altas ingestas de estos compuestos se asocian a menor riesgo de ECV, cáncer (268) y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (269).

Respecto a la salud cardiovascular, dentro de los polifenoles, el grupo de los flavonoides ha mostrado potentes efectos beneficiosos mediante inhibición de agregación plaquetaria (270), reducción de la expresión de moléculas de adhesión (271), mejoras en la función endotelial (272), alteración del metabolismo de lípidos (273) con inhibición de la oxidación de LDL (274) así como reducción de la presión arterial (275).

La inflamación aguda es un proceso necesario, debido a que actúa como mecanismo de defensa natural del organismo. Sin embargo, cuando dicha inflamación se convierte en crónica es cuando se asocia a mayor producción de especies reactivas y acaba generando estrés oxidativo. La inhibición o sobreexpresión en la síntesis de cierto tipo de oxilipinas con carácter proinflamatorio o antiinflamatorio respectivamente, parece que puede modular la inflamación.

Los polifenoles pueden activar el factor 2 relacionado con el factor nuclear E2 (Nrf2) que juega un rol importante al combatir la inflamación y el estrés oxidativo, ejerciendo protección frente enfermedades cardiovasculares, pulmonares, renales, neurodegenerativas y cáncer (276).

Afortunadamente y gracias al avance de la ciencia, en los últimos años han surgido diferentes formas de evaluar el estrés oxidativo o estado redox del organismo mediante la medición de ciertos parámetros antes desconocidos, como

el caso de oxilipinas, que fueron descubiertas en los años 90 por Morrow y colaboradores (110). No obstante, se debe ser cauto al analizar los datos, puesto que este tipo de compuestos presentan un bajo rango de concentración que oscila entre picogramos y nanogramos en la mayoría de muestras biológicas y son difíciles de evaluar e interpretar.

Por todos estos motivos, se decidió escoger para la presente investigación un extracto rico en polifenoles capaz de aportar una dosis diaria de 600 mg (261) en población con bajo consumo de frutas y verduras, con el objetivo de evaluar la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo mediante la variación de oxilipinas en función de sus diferentes rutas, y a través de los biomarcadores plasmáticos citados en puntos anteriores, cuyos resultados se discutirán a continuación.

Uno de los mayores obstáculos que surgen a la hora de evaluar ciertos productos a base de polifenoles, es la amplia gama de productos que el mercado ofrece, con declaraciones en el etiquetado de ciertos componentes que no contienen (277,278). Gracias a publicaciones previas sobre la caracterización y biodisponibilidad del producto empleado, se puede considerar que una de las fortalezas de la presente investigación es que el EXT utilizado contiene un elevado contenido polifenólico de 600 mg/día por medio de la ingesta de 6 cápsulas diarias, siendo los componentes principales cinco flavonoides (flavonoles, flavanos, flavanonas, flavan-3-oles y antocianinas) y un no flavonoide (elagitaninos) (260,261). Todos los metabolitos que se lograron cuantificar en plasma se encontraron conjugados en forma de glucurónido, glicina o sulfato, siendo absorbidos en diferentes momentos a lo largo del aparato digestivo, especialmente a nivel de colon.

Así como el consumo de vitaminas muestra beneficios a corto plazo, la literatura científica justifica un consumo de polifenoles a largo plazo para obtener beneficios, motivo por el cual se consideró que el consumo de producto fuese durante 4 meses en la presente investigación. Por otro lado, pese a la baja biodisponibilidad de los polifenoles en los seres humanos, parece que una ingesta combinada de estos como es el caso del extracto utilizado, presenta mayor eficacia frente al consumo de productos aislado por una posible sinergia entre polifenoles, y por lo tanto podría solventar dicho problema.

La discusión abarcará las oxilipinas en función de sus diferentes vías enzimáticas y no enzimáticas, para posteriormente tratar los biomarcadores plasmáticos.

6.1 VÍAS ENZIMÁTICAS

Las PGs y TXs pertenecen al grupo de isoprostanoides, cuyas funciones biológicas han sido ampliamente documentados y descritas. En función de su vía enzimática, familia y metabolito sintetizado, se les atribuye diferentes acciones en el organismo, cuyos efectos son producidos mediante la activación de GPCR (89). En la presente investigación en cuanto a vías enzimáticas solo se logró cuantificar las de la vía COX.

6.1.1 COX

Como se ha comentado en la introducción, los prostanoides se sintetizan a partir del AA libre por la vía enzimática de la COX, produciéndose mediante la COX 1 y COX 2 las moléculas fugaces PGG₂ y PGH₂ a partir de la que se metabolizarán las PGs principales de las rutas y sus metabolitos bioactivos correspondientes (85).

- Ruta D

Con respecto a la ruta D, no se observaron modificaciones significativas en su PG primaria la PGD₂. No obstante, sí que se apreciaron disminuciones significativas en sus metabolitos (11-β-PGF_{2α} y 2,3-dinor-11β-PGF_{2α}) tras el consumo de EXT, no apreciadas tras el consumo de PLA. El 11-β-PGF_{2α} a su vez es precursor del 2,3-dinor-11β-PGF_{2α} (279) y ambos presentan actividades biológicas análogas incrementando la broncoconstricción e inhibiendo la diferenciación del tejido adiposo (122). De forma análoga a la PGE₂, la PGD₂ tiene la capacidad de comportarse de forma proinflamatoria o antiinflamatoria y puede ser sintetizada por dos vías, la clásica mediante la PGH₂ o a través de la PGE₂ (112).

- Ruta E

Tras realizar la cuantificación de las diferentes oxilipinas, en el caso de la ruta E tan solo se logró cuantificar su PG principal la PGE₂ cuyos valores se

vieron incrementados de forma significativa tras el consumo de EXT, no observándose ninguna modificación tras el consumo de PLA. En procesos inflamatorios, así como en los clásicos de enrojecimiento, hinchazón y dolor en función del tipo de receptores (EP₁, EP₂, EP₃, EP₄) la PGE₂ puede presentar efectos pro/antinflamatorios así como pro/antitrombóticos (78). Se ha documentado como en las fases tempranas de la inflamación, tiende ser una PG proinflamatoria, mientras que en la fase de resolución de la inflamación los efectos son antinflamatorios (280). La PGE₂, posee la capacidad de atenuar el TNF- α y suprimir la síntesis de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 (281).

Debido a que a partir de la PGE₂ se puede sintetizar la PGD₂, se puede plantear la posibilidad de que al producirse una disminución en la excreción urinaria en los metabolitos de PGD₂ (ambos con carácter proinflamatorio) junto con el incremento de PGE₂, que no afectan a las concentraciones de PGD₂, el incremento observado de PGE₂ puede tener un antinflamatorio.

- Ruta F

Respecto a la ruta F, solo se logró cuantificar un metabolito procedente del AA (15-keto-PGF_{2 α}) y otro del DGLA (PGF_{1 α}). En el caso del PGF_{1 α} no se apreciaron cambios significativos durante la intervención y por lo tanto no será motivo de discusión. Por otro lado, respecto a la ruta del AA en el caso del 15-keto-PGF_{2 α} cuyo precursor es el PGF_{2 α} se apreciaron disminuciones significativas en su excreción urinaria tras el consumo de EXT no observadas tras el consumo de PLA. De acuerdo con la literatura científica el PGF_{2 α} se asocia a estados proinflamatorios al participar en la síntesis y secreción de TNF- α y diferentes citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8) con efecto vasoconstrictor (282). Por tal motivo, el descenso significativo del 15-keto-PGF_{2 α} sugiere un potencial poderoso antinflamatorio.

En la suma del total de prostanoideos, tal como se observó en los resultados, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas tras consumo de EXT o PLA. No obstante, sí se observaron diferencias estadísticamente significativas al realizar la comparación en el momento final entre grupos, que podría ser debido a que sus valores variaron de forma opuesta viéndose incrementados en PLA y reducidos en EXT. Dicha observación unida a que en el contenido total de prostanoideos se incluyó la PGE₂, la cual parece ejercer en este ensayo clínico un rol antiinflamatorio, se podría llegar a interpretar que el consumo de EXT sí posee

efectos antiinflamatorios, y que de no haber incluido la PGE₂ en el recuento final, sí se hubieran observado diferencias significativas respecto al PLA al comparar la evolución final entre grupos.

6.2 VÍAS NO ENZIMÁTICAS

Además de las vías enzimáticas, los AGPI pueden sufrir peroxidación lipídica mediante una vía no enzimática dependiente de ROS principalmente, originando compuestos similares a las PGs. A diferencia de los prostanoides, tanto los IsoPs, NeuroPs y F2t-dihomo-IsoPs se sintetizan a partir del AA, DHA/EPA y AdA presentes in situ en la membrana respectivamente.

6.2.1 Isoprostanos

Los IsoPs son considerados como un biomarcador fiable de peroxidación lipídica endógena, al ser químicamente estables en fluidos biológicos (112), siendo considerada la concentración urinaria de IsoPs como el método “*gold standard*” a la hora de evaluar el estado redox del organismo (122). Al metabolizarse y excretarse con relativa rapidez, su cuantificación resulta de utilidad para determinar el estado oxidativo en un momento concreto (263).

Concentraciones elevadas de IsoPs se asocian a mayor riesgo de ECV y peor pronóstico de esta (283), además de encontrarse elevados en diversas condiciones patológicas en humanos, observándose altamente incrementados en población obesa cuya patología se encuentra estrechamente relacionada con la inflamación crónica de bajo grado, en pacientes con cáncer, y en paciente que han sido sometidos recientemente a intervención quirúrgica (112). Por consiguiente, cualquier tipo de tratamiento con capacidad para reducir el contenido total de IsoPs podría considerarse como eficaz para mejorar la salud del individuo. En este sentido, y de acuerdo con los resultados de la presente investigación se observaron mejoras significativas en el contenido total de IsoPs tras el consumo de EXT frente al PLA tanto en la evolución de grupos por separado, entre productos al final de la intervención y en la comparación entre grupos al final del estudio.

De los IsoPs evaluados, solo se lograron cuantificar los pertenecientes a la serie 15 de la ruta F, cuyo IsoP precursor principal es el 15-F_{2t}-IsoP el cual no pudo ser cuantificado. El 15-F_{2t}-IsoP, se conoce como un potente vasoconstrictor en la mayoría de los lechos vasculares, modula la actividad plaquetaria, inhibe la angiogénesis e induce aterosclerosis mediante estimulación de la adhesión de neutrófilos y monocitos en células endoteliales (112). Uno de los motivos por los que no se pudo cuantificar podría ser causa directa de su rápida metabolización. Afortunadamente, sí se lograron cuantificar 4 metabolitos procedentes del 15-F_{2t}-IsoP descritos en la tabla 10. Juzgando los resultados, se observa que en tres de ellos se observó algún tipo de reducción significativa, como en el 2,3-dinor-15-*epi*-15F_{2t}, tras el consumo de EXT, y en el 2,3-dinor-15F_{2t} y *ent*-PGF_{2α} tras realizar la comparación en el momento final entre grupos, siendo el 15-*epi*-15F_{2t} el que no presentó ningún tipo de cambio significativo. De acuerdo con las reducciones en IsoPs totales, y teniendo en cuenta que todos los evaluados son metabolitos del 15-*epi*-15F_{2t}, se podría concluir que la ingesta de EXT produce mejoras a nivel cardiovascular. Algo similar a este ensayo clínico se observó en una intervención que evaluó la diferencia entre vinos y mostos, donde se apreciaron reducciones en el contenido total de IsoPs, siendo más pronunciada en el consumo de vinos frente a los mostos, debido a los compuestos bioactivos presentes en dichos productos (122).

6.2.2 Neuroprostanos y F₂-dihomo-Isoprostanos

El SNC presenta una gran vulnerabilidad a las lesiones mediadas por ROS, fruto del elevado consumo de oxígeno de cerebro (debido a sus altas demandas energéticas), del alto nivel de AGPI y de sus débiles defensas antioxidantes (154), dando lugar a una sobreproducción de ROS (152). En concreto, el cerebro emplea más del 20% de todo el oxígeno consumido durante la respiración mitocondrial (284).

El cerebro utiliza cantidades elevadas de oxígeno que le hacen ser proclive al estrés oxidativo, siendo las lesiones oxidativas cerebrales unas de las principales causas de trastornos neurológicos como, por ejemplo, epilepsia (285). La oxidación del DHA en el SNC se asocia a diversos trastornos neurodegenerativos, entre los que se incluyen síndrome de Rett, esclerosis lateral

amiotrófica, preeclampsia, enfermedad de Huntington, Parkinson y Alzheimer (286,287).

En la presente investigación, se consideró evaluar tres NeuroPs correspondientes a la serie 4 y tres F_{2t}-dihomo-IsoPs correspondientes a la serie 7 y 17 (tabla 7) con objeto de evaluar la oxidación de DHA y AdA respectivamente. De los seis compuestos analizados, se lograron cuantificar cuatro, un NeuroPs y tres F_{2t}-dihomo-IsoPs cuyos resultados pueden consultarse en la tabla 12.

En el caso del único NeuroP analizado, el cual fue el 4-F_{4t}-NeuroP, se observó una reducción significativa de sus valores tras el consumo de EXT, hecho que no ocurrió tras el consumo de PLA. Además, al observar las diferencias al final de la intervención entre grupos y comparar la evolución de cada uno de ellos también se observaron diferencias significativas, lo que refuerza la potencia estadística de los resultados.

Dentro de los F_{4t}-NeuroPs los 4-F_{4t}-NeuroPs y 10-F_{4t}-NeuroPs son los más representados, encontrándose elevados en multitud de enfermedades neurológicas (288) y deterioro cognitivo (289), así como en fumadores (290) o pacientes diabéticos tipo 2 (291). Signorini y colaboradores realizaron una investigación para evaluar la relevancia clínica de 4-F_{4t}-NeuroPs y 10-F_{4t}-NeuroPs en cuatro enfermedades neurológicas, como síndrome de Rett, síndrome de Down, esclerosis múltiple y trastorno del espectro autista, comparado con un grupo control de sujetos de la misma edad, encontrando los niveles de 10-F_{4t}-NeuroPs elevados en todas las enfermedades y valores elevados de 4-F_{4t}-NeuroPs tan solo en síndrome de Rett y esclerosis múltiple (292). Estos resultados parecen mostrar la relación de estas moléculas con este tipo de enfermedades, como se ha mostrado con anterioridad en este trabajo.

En el caso de los F_{2t}-dihomo-IsoPs que proceden del AdA, se observaron reducciones significativas tras el consumo de EXT en todos ellos (17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo, 17-F_{2t}-dihomo y *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo) y al igual que con el 4-F_{4t}-NeuroP no observó en PLA. Además, el 17-*epi*-17-F_{2t}-dihomo presentó diferencias significativas al realizar comparación entre grupos al final del estudio y al comparar la evolución entre grupo. Es de destacar que los valores de *ent*-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo presentaban diferencias significativas, desconociéndose la causa. Por tal motivo, se deben tomar sus resultados con cautela, puesto que, pese a mostrar

diferencias significativas al comparar la evolución entre grupos durante la intervención, podría deberse a que no parten de valores homogéneos.

Valores elevados de F₄-NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsoPs se asocian con enfermedades neurodegenerativas, así como lesiones cerebrales, siendo los primeros un biomarcador con mayor fiabilidad, que requieren mayor investigación a la hora de valorar si podría ser efectivo para la detección temprana de trastornos neurológicos (155). Los F₄-NeuroPs parecen ser marcadores mucho más sensibles para el daño oxidativo de las neuronas que los IsoPs, debido a que el DHA presenta mayor sensibilidad a la oxidación que el AA por la presencia de un mayor número de dobles enlaces de metileno (293). Por su parte, los F_{2t}-dihomo-IsoPs sí parecen ser un marcador temprano de peroxidación lipídica en el síndrome de Rett, trastorno que provoca retraso en el desarrollo especialmente en áreas de lenguaje expresivo y manos (154,166).

Libia y colaboradores observaron cómo los marcadores de oxidación del SNC se correlacionaban positivamente con la edad (153), lo cual plantea la eficacia de promover un consumo de polifenoles para prevenir y no acentuar futuros problemas a nivel neurológico. El mismo grupo de investigación también observó cómo los valores de NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsoPs se vieron incrementados al comparar entrenamiento en altura frente a entrenamiento a nivel del mar en triatletas de élite, lo cual parece deberse al fenómeno de la hipoxia propia de la altura (294). En otro estudio llevado a cabo por el mismo grupo de investigación, se observó que la ingesta de 200 mL de jugo de aronia en triatletas de élite durante 45 días, reducía los marcadores de peroxidación lipídica del SNC en comparación con el placebo (295). En consonancia con este último estudio, se encuentran los datos observados en una intervención que evaluó la peroxidación lipídica del DHA, producción de NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsoPs como marcadores del daño oxidativo en el SNC, observándose mejoras tras la ingesta de vino tinto frente a mostos o etanol, probablemente debido a la capacidad del vino de atravesar la BHE gracias al contenido de melatonina e hidroxitirosol (296).

Los polifenoles pueden alterar la función cerebral en tres compartimentos; fuera del SNC (mejorando el flujo sanguíneo cerebral o modulando vías de señalización de órganos periféricos al cerebro), en la BHE (alterando los mecanismos de entrada y salida de varias moléculas biomoléculas dependientes de proteínas resistentes a los medicamentos) y dentro del SNC (modificando

directamente la actividad neuronal y de las células gliales (297–299). Los flavonoides en particular, pueden influir en la cascada de supervivencia y los factores de transcripción mediante la modulación del potencial redox de las neuronas y glías, presentando una función protectora frente al daño oxidativo del cerebro (300). Además, ciertos polifenoles presentan la capacidad de atravesar la BHE (301) aunque en diversos grados en función de su estructura, lo que sugiere acciones de neuromodulación y neuroprotección directas (32).

Los polifenoles, presentan un amplio espectro de acciones moleculares y celulares frente a la degeneración neurológica (302). El cerebro está mediado por moléculas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina que influye en el mantenimiento, supervivencia, crecimiento y diferenciación de neuronas, siendo más activo en las regiones cerebrales asociadas a la cognición como corteza cerebral e hipocampo (303). Bajos niveles de BDNF se asocian incremento de enfermedades neurodegenerativas (304). Se ha visto como los alimentos ricos en polifenoles dietéticos, poseen actividades antioxidantes, y antiinflamatorias a nivel cerebral, además de asociarse a mayor expresión de BDNF (305). En consonancia con estas observaciones, unido a la reducción NeuroPs y F_{2t}-dihomo-IsoPs descritas en la presente investigación, parece que el EXT utilizado podría producir mejoras a nivel cerebral disminuyendo su daño oxidativo debido al alto contenido polifenólicos de este producto.

6.2.3 Contenido total de Oxilipinas

Para el contenido total de oxilipinas se consideró tan solo evaluar las procedentes del AA para que todas procediesen de la misma ruta y por lo tanto comprende la suma de prostanoïdes e IsoPs.

Juzgando los resultados, se observa cómo los valores variaron de forma opuesta tras consumo de EXT o PLA. En el caso de PLA se vieron incrementados de forma significativa, mientras que tras el consumo de EXT se vieron reducidos de forma significativa. También se apreció significación al comparar los productos en el momento final de la intervención, así como la evolución de los grupos (producto*tiempo). Dichos resultados parecen confirmar que el consumo de EXT reduce la peroxidación lipídica, la inflamación y el estrés oxidativo del organismo al reducir el contenido total de oxilipinas.

Sin embargo, en diferentes estudios que evalúan la variación plasmática de oxilipinas, se han podido observar datos contradictorios. Por ejemplo, en un estudio de 3 ramas en el que se les aportaba a los sujetos brócoli, comparando la ingesta de una ración completa, y de media ración frente a control, se observaron reducciones de prostanoides como el 11- β -PGF_{2 α} , pero no se mostraron cambios significativos en el contenido total de IsoPs (306). Dos limitaciones que presenta dicho estudio son el tamaño de la muestra (n=24) y el corto periodo de intervención (3 días), lo que refleja que son necesarios protocolos de consumo prolongados en el tiempo, así como un tamaño de muestra considerable. En otro ensayo clínico de 6 semanas de duración, donde se evaluó el contenido total de IsoPs, no se observaron diferencias significativas tras la ingesta de pomelo frente al placebo. Las únicas reducciones significativas observadas se pudieron ver al analizar una submuestra de la población obesa en el grupo que consumía el pomelo (307). Es posible que dicha reducción solo se produjese en el subgrupo compuesto por personas con obesidad, debido a la alta tasa de oxidación y peroxidación que puede sufrir este tipo de muestra. En un estudio sobre polifenoles procedentes del jugo de aronia y oxilipinas en población deportista (triatletas), se encontraron reducciones significativas del 11- β -PGF_{2 α} , tras consumo de aronia e incrementos de PGE₂ y de 15-keto-15-F_{2t}-IsoP respectivamente (85). Sin embargo, no parece adecuado la comparación de dichos resultados con los de la presente investigación debido a que el producto no era similar al de esta; las muestras fueron completamente diferentes (deportistas vs. población sana, donde en población deportista, gran parte de los efectos observados podrían ser originados por la propia práctica de actividad física), y, por último, la duración de su estudio fue mucho más corta (45 días).

Cabe concluir que, entre las fortalezas de la investigación realizada durante la presente Tesis Doctoral, frente a investigaciones previas similares, se encuentra el tamaño de la muestra y la duración de la intervención, lo cual otorga mayor potencia estadística y veracidad en la interpretación de resultados.

6.3 BIOMARCADORES PLASMÁTICOS

En cuanto a biomarcadores plasmáticos, el hallazgo con mayor relevancia fue la reducción significativa de OxLDL unido al incremento del HDL colesterol

tras el consumo de EXT. Resultados que concuerdan con los observados en estudios previos tanto en humanos como animales, que muestran el efecto protector de los polifenoles frente a la aterosclerosis, mediante la inhibición de la proliferación de células del músculo liso vascular (308–310).

OxLDL promueve la adhesión de monocitos a células endoteliales mediante mecanismos no dependientes de la expresión de VCAM e ICAM originando células espumosas (311), hecho que no ocurre con la LDL no oxidada (192). Dicha adhesión se produce mediante determinados receptores como el CD36. La OxLDL es un ligando de PPAR γ que regula la expresión de CD36, facilitando la captación de OxLDL por los macrófagos (312), y por consiguiente contribuyendo al desarrollo de aterosclerosis, mediante la activación del sistema inmunitario (313). Es interesante señalar que la OxLDL favorece la aterosclerosis y disfunción endotelial, lo que incrementa el riesgo cardiovascular (314,315). La OxLDL en plasma es uno de los pocos parámetros reconocidos por la EFSA para evaluar una medición directa del daño oxidativo en lípidos juntos a los IsoPs (316). Entre el resto de parámetros se encuentra el MDA, que parece no ser un marcador fiable, aunque puede utilizarse como pruebas de apoyo a IsoPs y OxLDL, siempre que se utilicen técnicas adecuadas como la cromatografía líquida (317). Moreno-Luna y colaboradores observaron que el consumo de aceite de oliva, debido a su contenido en polifenoles, producía una reducción de los mediadores de inflamación y estrés oxidativo mediante reducciones de OxLDL y PCR, a la vez que incrementaba los nitratos plasmáticos mejorando la función endotelial (318). En un estudio triple rama con un producto que contenía extracto de uvas, extracto de uvas con 8 gramos de resveratrol y placebo, se observó que, tras 6 meses de consumo, en el grupo placebo no se encontraron diferencias en cuanto a lípidos plasmáticos, mientras que tras el consumo de extracto de uvas se vieron reducidos de forma significativa los valores de OxLDL, destacando el hecho de que en el grupo al que se agregó el resveratrol tuvo también una reducción de la apolipoproteína B, la cual se asocia a mayor riesgo cardiovascular que la determinación de LDL (319).

La PCR es una proteína de fase aguda mediada por otras citoquinas como IL-1 e IL-6 y sintetizada en el hígado (176). En la presente investigación y de acuerdo con la bibliografía se evaluó la PCR ultrasensible (mg/L), cuyo riesgo se establece como riesgo bajo cuando se encuentra en valores por debajo de 1 mg/L,

riesgo moderado entre 1 y 3 mg/L y riesgo alto cuando los valores se encuentran por encima de 3 mg/L (320). Valores elevados de PCR están correlacionados con incremento en el riesgo de eventos cardiovasculares, incluso en individuos aparentemente sanos (321). Diversos estudios han encontrado cierta correlación entre elevadas concentraciones de PCR y eventos cardiovasculares como infarto agudo de miocardio, ictus y progresión de enfermedad oclusiva arterial periférica (322,323). A lo largo de la intervención, los valores de dicha variable se encontraron por encima de 1 pero sin llegar a 2, valores considerados como riesgo moderado, observándose una disminución significativa tras el consumo de EXT frente a PLA. Pese a no descender por debajo de 1 mg/L tras el consumo de EXT también se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los grupos en el momento final del estudio, lo que sugiere que si el periodo de consumo hubiera sido más prolongado sí se podrían alcanzar valores inferiores a 1 mg/L. No obstante, es cierto que en la presente investigación los niveles de PCR descendieron en un valor (Δ -0.2 mg/L) más tras consumo de PLA frente a EXT y, sin embargo, las diferencias significativas solo se observaron tras el consumo de EXT, por lo que se debe tener cautela a la hora de interpretar esta variable.

Siguiendo con la inflamación, el TNF- α , conocida citoquina proinflamatoria asociada al tejido adiposo, células musculares, endoteliales y leucocitos (179), que participa en la desregulación endotelial, favoreciendo la migración de monocitos y macrófagos, e induciendo la expresión de moléculas de adhesión (180), se redujo significativamente tras el consumo de EXT y de PLA siendo en el caso de EXT de forma más significativa. Se han observado incrementos de TNF- α en dietas con bajas concentraciones de carotenos (324), lo que podría explicar que tras el consumo de EXT, con una alta concentración en estos, se reduzcan los niveles de TNF- α . En cuanto a valores considerados normales de TNF- α un estudio en población suiza determinó que oscilaban entre (1.72 – 4.42 pg/mL) para mujeres y entre (1.90 – 4.65 pg/mL) para hombres (325). Al finalizar la intervención de la presente investigación en ambos grupos se observaron valores superiores a 5 pg/mL. No obstante, dado que previo al consumo de EXT se partía de valores ligeramente más altos y se finalizó en valores ligeramente más bajos, es posible, al igual que ocurre con la PCR, que un consumo del EXT durante un periodo más prolongado pueda reducir sus valores a niveles considerados como fuera de riesgo.

Los niveles séricos del receptor de membrana sTNFR1 se redujeron de forma significativa tras el consumo de EXT, manteniéndose estables tras el consumo de PLA. Está estrechamente relacionado con el TNF- α debido a que al unirse a este se desprende de la membrana celular (185). Por lo tanto, la reducción de dichos valores tras consumo de EXT junto con los resultados observados en el TNF- α sugieren que la ingesta de EXT puede reducir la inflamación local y sistémica.

Como indicador de riesgo cardiovascular se decidió evaluar la homocisteína plasmática, la cual también presenta efecto neuroprotector y se puede modular a través de factores modificables como la dieta y el ejercicio (326,327). Tras la intervención se apreciaron disminuciones significativas tras consumo de EXT y PLA siendo más significativas en EXT ($p < 0.001$) vs. PLA ($p < 0.024$). Dichos resultados concuerdan con los observados en un estudio similar, donde se administraron 500 mg de extracto de amla (175 mg de polifenoles, 40 mg de triterpenoides y 50 mg de aceite entre los que se incluyen ácidos grasos omega 3), disminuyendo la homocisteína tanto tras consumo de producto como de placebo (328). Sin embargo, en otro estudio con un producto similar al de la presente investigación, con una duración de 6 semanas sí se observaron reducciones significativas en comparación con el placebo (203). En consonancia con estos datos, parece que el consumo de altas dosis de polifenoles ayuda a reducir la homocisteína, y se podría asociar una capacidad cardioprotectora.

En cuanto a perfil lipídico, el consumo a largo plazo de EXT no logró afectar a los valores totales de colesterol ni de TG, sin embargo, como se mencionó al comienzo del presente punto, es destacable el incremento significativo de HDL tras consumo de EXT unido al descenso de HDL tras consumo de PLA. Dado que las HDL son conocidas como cardioprotectoras (329), cuya función básica es garantizar un transporte inverso de colesterol con la salida de colesterol de células periféricas a las hepáticas para su posterior excreción por medio de la bilis y de las heces (330,331), estos resultados sugieren que el EXT posee capacidad cardioprotectora.

Respecto a las catecolaminas, se observaron cambios significativos tanto para la noradrenalina como para la dopamina tras el consumo de EXT, sin verse cambios significativos en valores de cortisol ni adrenalina. Respecto al cortisol, algunos estudios sí han mostrado reducciones en plasma (332) o saliva (333), tras

ingesta de polifenoles. No obstante, y en consonancia con nuestros resultados es algo que no es habitual, y los valores rara vez muestran cambios (228,334,335). No observar modificaciones significativas en niveles de cortisol y/o adrenalina sugieren que el EXT no produce una respuesta adrenérgica. Pese a que el cortisol se ha evaluado en diferentes fluidos corporales (sangre, saliva, orina) dichos métodos presentan limitaciones, debido a que solo proporcionan estimaciones momentáneas a corto plazo (336), debido a que la concentración en dichos fluidos está sujeta a diferentes fluctuaciones tanto interindividuales, estados de ánimo, ritmo circadiano o procedimientos de estudio. En el caso del ritmo circadiano, para solventar dicho problema se podrían realizar diferentes medidas durante el día, pero parece que esto llevaría a un mayor estrés y tampoco resultaría efectivo (230). Sin embargo la medición de glucocorticoides en el cabello, descubierto en 2004 (337), sí parece un biomarcador de estrés fiable al evaluar la actividad del eje hipofisario-pituitario-suprarrenal a largo plazo, que refleja la producción total de cortisol durante semanas/meses, además de ofrecer la ventaja de ser una medición no invasiva para el sujeto (230).

Los polifenoles son capaces de revertir déficits de ciertos neurotransmisores como serotonina, noradrenalina y dopamina asociados a la edad, incrementando los niveles de sirtuína 1 y reduciendo los de NF- κ B (338). La noradrenalina y dopamina están relacionadas con la ansiedad (339), y mejora cognitiva (340), estando la noradrenalina de forma particular estrechamente relacionada con la atención y el estado de alerta (341,342). De acuerdo con los resultados publicados por este grupo de investigación, el incremento de los niveles de dopamina y noradrenalina se correlacionan con mejoras en pruebas cognitivas, lo cual sugiere que el EXT incrementa los niveles de alerta y atención (343).

El extracto polifenólico empleado en la presente investigación, fue previamente testado, en diferentes estudios de intervención, con diferentes protocolos en cuanto a tiempo de consumo, así como grupos de población, que podrían explicar sus resultados inconsistentes. En una intervención de 8 semanas en población mayor de 40 años con sobrepeso y obesidad, se observaron reducciones significativas de TNF- α , colesterol total, colesterol LDL tras consumo de producto no observada tras consumo de PLA, sin producirse diferencias en PCR, sTNFR₁ y Ox-LDL (344). Por otro lado, en una intervención de 28 semanas con hombres entrenados pertenecientes a las fuerzas especiales de policía

austriaca, se observaron reducciones estadísticamente significativas en la concentración de grupos carbonilo en proteínas y en TNF- α en las semanas 16 y 28. Una de las diferencias respecto a nuestra intervención fue que obtuvieron muestras en diferentes semanas en lugar de solo momento inicial y final. Las semanas escogidas para extracción fueron la 4, 8, 16 y 28. Como dato particular, destaca que los valores se vieron incrementados hasta la semana 8 y disminuyeron a partir de la semana 16 (345). Ambos estudios parecen estar en concordancia con los datos obtenidos en la presente investigación, y se podría confirmar que la ingesta de polifenoles a largo plazo presenta eficacia frente a la inflamación. En otra intervención con una duración de 8 semanas en mujeres con sobrepeso y obesas de entre 35 y 50 años, se observaron mejoras significativas en varios marcadores de oxidación de proteínas, como las proteínas carbonílicas, en OxLDL, en el estado de oxidación total, así como en el TNF- α , sin verse cambios en el MDA ni en IL-6 (346). En el caso de TNF- α los autores determinaron que al comienzo de la intervención los sujetos partían de valores por encima del rango establecido (> 24 pg/mL), y tras la intervención se encontraron dentro del rango fisiológico normal (< 20 pg/mL), sin embargo, dichas referencias distan de las halladas en la bibliografía (325). La OxLDL también se vio reducida tras tres meses de suplementación en sujetos de entre 41 y 57 años fumadores compulsivos (más de 10 años fumando más de 20 cigarros al día) donde también se vio reducido el colesterol total (347). En otro estudio en población japonesa con un periodo de intervención menor (28 días en concreto) también se observaron reducciones significativas de homocisteína tanto en fumadores como en no fumadores(348).

VII - CONCLUSIONES

VII CONCLUSIONES

Tras el consumo prolongado durante 16 semanas de un nutraceutico a base de bayas, frutas y verduras con alto contenido en polifenoles en sujetos sanos que no consumen las cantidades recomendadas de frutas y verduras se puede concluir que:

En marcadores de orina:

- Existe una mejora en marcadores de peroxidación lipídica sistémica general mediante la reducción en la excreción urinaria de isoprostanos totales.
- Se produce una mejora en marcadores de inflamación tras el consumo de producto, a través de la reducción en la excreción urinaria de las oxilipinas totales y de diferentes prostanoïdes de las ruta D y F, los cuales se caracterizan por poseer efectos proinflamatorios, así como incremento de la PGE₂, que podría presentar un carácter antiinflamatorio.
- Existe una mejora en marcadores de peroxidación lipídica del sistema nervioso central a través de reducciones en la excreción urinaria de F₄-Neurops y F₂-DihomoIsops.

En biomarcadores plasmáticos

- Se produce una mejora en biomarcadores de inflamación y perfil lipídico destacando las reducciones de la LDL oxidada, del receptor soluble del factor de necrosis tumoral 1, así como el incremento del HDL colesterol.

- Se observan mejoras en neurotransmisores como la noradrenalina y la dopamina que podrían relacionarse con los marcadores de peroxidación lipídica del sistema nervioso central, sin observarse cambios en la adrenalina ni el cortisol.
- No se observan cambios en la función tiroidea.
- El consumo diario del extracto rico en polifenoles durante 16 semanas no muestra acontecimientos adversos en ninguno de los sujetos del estudio, ni en la función hepática de sujetos evaluados mediante control de tolerabilidad y seguridad.

**VIII – LIMITACIONES Y
FUTURAS LÍNEAS DE
INVESTIGACIÓN**

VIII –LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Una de las principales limitaciones de la presente investigación, fue que la población escogida a estudio era población sana y sin patologías previas. Por tal motivo, diversos parámetros como los biomarcadores plasmáticos se encontraban en valores considerados normales, hecho por el cual podrían no apreciarse mejoras más destacables a las observadas.

Otra de las limitaciones podría ser que se instó a los sujetos a seguir realizando su vida con total normalidad, sin someterles a ningún estrés adicional que hubiera podido ocasionar inflamación y/o estrés oxidativo. Quizás, en este caso sí se hubieran visto efectos deletéreos en el grupo placebo, a la par que mejoras o ausencia de cambios, y por lo tanto mejoras en el grupo que consumió el extracto. Sin embargo, este tipo de intervención con una duración tan prolongada debe facilitar el cumplimiento de las directrices dentro de lo posible. De modo que se optó por no controlar de forma tan exhaustiva a los sujetos, para no perder un número elevado de pacientes.

Una de las limitaciones que también se encuentra en este tipo de intervenciones es que los investigadores no pueden tener la certeza absoluta de que los sujetos se tomen el producto de forma adecuada y durante un largo periodo de tiempo, como son dos periodos de 4 meses. Esto no ocurre, por ejemplo, cuando se realiza una biodisponibilidad en el laboratorio, ya que el investigador se asegura de que el sujeto consume el producto en su presencia y bajo su supervisión. Pese a que devuelven el producto sobrante al final del estudio y se cuantifica por parte de los investigadores, no se puede asegurar que lo han cumplido al 100%.

Dado que existe una gran variabilidad interindividual en cuanto al metabotipo, y que los polifenoles se absorben principalmente a nivel colónico, se podría pensar que este hecho puede ser motivo de las discrepancias observadas en los resultados de ensayos clínicos en humanos. Por lo tanto, hubiera sido conveniente realizar una estratificación por metabotipos, donde quizá se hubieran

observado diferencias significativas en ciertos marcadores en función del microbioma de los sujetos.

Como futuras líneas de investigación, se podría realizar las siguientes intervenciones:

- Escoger una población con patologías previas, o con cierto grado de inflamación como podría ser una población obesa, donde ciertos parámetros estén alterados, y de esta forma observar si hay mejoras tras el consumo de producto vs placebo
- Someter a la población escogida a cierto estrés, como podría ser la actividad física, pese a que el propio ejercicio físico puede mejorar la capacidad antioxidante endógena.
- Realizar una estratificación por diferentes metabotipos, que nos permita identificar, en función de la composición de la microbiota, a qué tipo de sujetos les podría beneficiar más un tipo de polifenoles u otro.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Constitución [Internet]. Organización Mundial de la Salud. [cited 2022 Jan 7]. Available from: <https://www.who.int/es/about/governance/constitution>
2. Herrero Jaén S. Formalización del concepto de salud a través de la lógica: impacto del lenguaje formal en las ciencias de la salud . Vol. 10, Ene . scieloes ; 2016. p. 0.
3. Busse R, Scheller-Kreinsen D, Zentner A. Tackling chronic disease in Europe: strategies, interventions and challenges. WHO Regional Office Europe; 2010.
4. Macia L, Galy O, Nanan RKH. Editorial: Modern Lifestyle and Health: How Changes in the Environment Impacts Immune Function and Physiology. Vol. 12, *Frontiers in immunology*. 2021. p. 762166.
5. Graham H, White PCL. Social determinants and lifestyles: integrating environmental and public health perspectives. *Public Health*. 2016 Dec;141:270–8.
6. Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M. Dietary patterns, Mediterranean diet, and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2014 Feb;25(1):20–6.
7. Sánchez-Carracedo D, López-Guimerà G, Asesns E, Fauquet J. Dieta: efectos, defectos y significados. *Cuad Med psicosomática y Psiquiatr enlace*. 2008;86(87):37–51.
8. Argüelles LM. *Vegetarianos con ciencia*. Arcopress; 2016.
9. Rogerson D. Vegan diets: practical advice for athletes and exercisers. *J Int Soc Sports Nutr*. 2017;14:36.
10. Mattson MP, de Cabo R. Effects of intermittent fasting on health, aging, and disease. Reply. *N Engl J Med*. 2020;382(18):1773–4.
11. Challa HJ, Bandlamudi M, Uppaluri KR. Paleolithic Diet. In *Treasure Island (FL)*; 2022.

12. Benlloch M, López-Rodríguez MM, Cuerda-Ballester M, Drehmer E, Carrera S, Ceron JJ, et al. Satiating effect of a ketogenic diet and its impact on muscle improvement and oxidation state in multiple sclerosis patients. *Nutrients*. 2019;11(5):1156.
13. Dussailant C, Echeverría G, Urquiaga I, Velasco N, Rigotti A. Evidencia actual sobre los beneficios de la dieta mediterránea en salud. *Rev Med Chil*. 2016;144(8):1044–52.
14. Serra Mir M, Pérez Heras A. Avances en dieta mediterránea y salud. Sect Of N° 7 28760, Tres Cantos e-mail info@ puntodidot com Isbn-e-b 978-84-92926-38-1. 2013;57.
15. Keys A, Menotti A, Karvonen MJ, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, et al. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol*. 1986 Dec;124(6):903–15.
16. Tuttolomondo A, Simonetta I, Daidone M, Mogavero A, Ortello A, Pinto A. Metabolic and Vascular Effect of the Mediterranean Diet. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep;20(19).
17. Altomare R, Cacciabaudo F, Damiano G, Palumbo VD, Gioviale MC, Bellavia M, et al. The mediterranean diet: a history of health. *Iran J Public Health*. 2013;42(5):449.
18. Rungay H, Murphy N, Ferrari P, Soerjomataram I. Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients*. 2021 Sep;13(9).
19. Santos-Buelga C, González-Manzano S, González-Paramás AM. Wine, Polyphenols, and Mediterranean Diets. What Else Is There to Say? *Molecules*. 2021 Sep;26(18).
20. Tosti V, Bertozzi B, Fontana L. Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018 Mar;73(3):318–26.
21. Castro-Barquero S, Lamuela-Raventós RM, Doménech M, Estruch R. Relationship between Mediterranean Dietary Polyphenol Intake and Obesity. *Nutrients*. 2018 Oct;10(10).
22. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021 Jan;13(1).

23. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(14):1818–92.
24. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009;2(5):270–8.
25. Li A, Li S, Zhang Y, Xu X, Chen Y, Li H. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*. 2014;6(12):6020–47.
26. Faller ALK, Fialho E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. *J Food Compos Anal*. 2010;23(6):561–8.
27. Bolling BW, Dolnikowski G, Blumberg JB, Chen C-YO. Polyphenol content and antioxidant activity of California almonds depend on cultivar and harvest year. *Food Chem*. 2010;122(3):819–25.
28. Gómez-Rico A, Salvador MD, La Greca M, Fregapane G. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J Agric Food Chem*. 2006 Sep;54(19):7130–6.
29. Bouaziz M, Chamkha M, Sayadi S. Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *J Agric Food Chem*. 2004 Aug;52(17):5476–81.
30. Andre CM, Oufir M, Hoffmann L, Hausman J-F, Rogez H, Larondelle Y, et al. Influence of environment and genotype on polyphenol compounds and in vitro antioxidant capacity of native Andean potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J Food Compos Anal*. 2009;22(6):517–24.
31. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2005;45(4):287–306.
32. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*. 2010;2(11):1106–31.
33. Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Étienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*. 2012 Nov;108(9):1532–49.

34. Spagnuolo C, Russo M, Bilotto S, Tedesco I, Laratta B, Russo GL. Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jul;1259:95–103.
35. Recio MC, Andujar I, Rios JL. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. *Curr Med Chem.* 2012;19(14):2088–103.
36. Vitaglione P, Forza S, Rio DD. *Flavonoids and Related Compounds: Bioavailability and Function*; Crozier, A., Ed. Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA; 2012.
37. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):76–89.
38. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jan;81(1 Suppl):230S-242S.
39. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010 Dec;2(12):1231–46.
40. McMurry J, Mondragón CH, Pozo VG. *Química orgánica. Vol. 5.* Cengage learning México; 2008.
41. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal.* 2013;2013:162750.
42. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci.* 2016;5:e47.
43. Shahidi F, Naczki M. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications.* Lancaster, PA: Technomic Pub. Co.; 1995.
44. Landete JM. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Res Int.* 2011;44(5):1150–60.
45. Langcake P, Pryce RJ. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia.* 1977 Feb;33(2):151–2.
46. Crozier A, Borges G, Ryan D. The glass that cheers: Phenolic and polyphenolic constituents and the beneficial effects of moderate red wine consumption. *Biochem (Lond).* 2010;32(6):4–9.
47. Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 1997 Apr;29(2):95–120.

48. Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell JA, Hémon B, Moskal A, Overvad K, et al. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Nutr.* 2016 Jun;55(4):1359–75.
49. Tresserra-Rimbau A. Dietary Polyphenols and Human Health. Vol. 12, *Nutrients.* 2020.
50. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'hiri N, García-Lobato P, et al. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database (Oxford).* 2013;2013:bat070.
51. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* 2007;43(4):348–61.
52. Fraga CG, Croft KD. Function The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food Funct.* 2019;10(2):514–28.
53. Espín JC, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA. The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol.* 2017 Sep;139:82–93.
54. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:7432797.
55. Korkina LG, Afanas'ev IB. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol.* 1997;38:151–63.
56. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Cheng D, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Nov;23(14):1144–70.
57. Ďuračková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res.* 2010;59(4):459–69.
58. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38(6):698–710.
59. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Med Leg Costa Rica.* 2019;36(1):91–100.

60. Kumar S, Pandey AK. Free radicals: health implications and their mitigation by herbals. *Br J Med Med Res.* 2015;7(6):438–57.
61. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990 Apr;15(4):129–35.
62. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010 Jul;4(8):118–26.
63. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017 Jun;86:715–48.
64. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006 Apr;52(4):601–23.
65. Organization WH. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation-Environmental Health Criteria 222. 2001.
66. Pompella A, Sies H, Wacker R, Brouns F, Grune T, Biesalski HK, et al. The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. *Nutrition.* 2014;30(7–8):791–3.
67. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180–3.
68. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993 Jul;215(2):213–9.
69. Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med.* 2002;23(1–3):101–208.
70. Mishra A, Sharma AK, Kumar S, Saxena AK, Pandey AK. *Bauhinia variegata* leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *Biomed Res Int.* 2013;2013:915436.
71. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem.* 2013;72:1–20.
72. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):749–60.

73. Alkadi H. A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Infect Disord Drug Targets*. 2020;20(1):16–26.
74. Von Dentz KE, Silva BS, Queiroz EAIF, Bomfim GF, Nascimento AF, Sugizaki MM, et al. Hibiscus sabdariffa ethanolic extract modulates adipokine levels, decreases visceral fat and improves glycemic profile in high-fat/sugar diet-induced obese rats. *Nutr Food Sci*. 2020;
75. Nayeem MA. Role of oxylipins in cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*. 2018 Jul;39(7):1142–54.
76. Tourdot BE, Ahmed I, Holinstat M. The emerging role of oxylipins in thrombosis and diabetes. *Front Pharmacol*. 2014 Jan;4:176.
77. Gleim S, Stitham J, Tang WH, Martin KA, Hwa J. An eicosanoid-centric view of atherothrombotic risk factors. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Oct;69(20):3361–80.
78. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science (80-)*. 2001;294(5548):1871–5.
79. Ghosh M, Tucker DE, Burchett SA, Leslie CC. Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog Lipid Res*. 2006;45(6):487–510.
80. Massey KA, Nicolaou A. Lipidomics of oxidized polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*. 2013;59:45–55.
81. Gabbs M, Leng S, Devassy JG, Monirujjaman M, Aukema HM. Advances in Our Understanding of Oxylipins Derived from Dietary PUFAs. *Adv Nutr*. 2015 Sep;6(5):513–40.
82. Wahli W, Michalik L. PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(7):351–63.
83. Shearer GC, Newman JW. Impact of circulating esterified eicosanoids and other oxylipins on endothelial function. *Curr Atheroscler Rep*. 2009;11(6):403–10.
84. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):787–95.
85. García-Flores LA, Medina S, Gómez C, Wheelock CE, Cejuela R, Martínez-Sanz JM, et al. Aronia–citrus juice (polyphenol-rich juice) intake and elite triathlon training: A lipidomic approach using representative oxylipins in urine. *Food Funct*. 2018;9(1):463–75.

86. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2000 Feb;28(4):505–13.
87. Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ. Isoprostane generation and function. *Chem Rev*. 2011;111(10):5973–96.
88. Murphy RC, Gijón MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J*. 2007 Aug;405(3):379–95.
89. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May;31(5):986–1000.
90. Biringer RG. The enzymology of the human prostanoid pathway. *Mol Biol Rep*. 2020 Jun;47(6):4569–86.
91. Smith WL, Urade Y, Jakobsson P-J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev*. 2011 Oct;111(10):5821–65.
92. Tam VC. Lipidomic profiling of bioactive lipids by mass spectrometry during microbial infections. *Semin Immunol*. 2013 Oct;25(3):240–8.
93. Peters-Golden M, Brock TG. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett*. 2001 Jan;487(3):323–6.
94. Krönke G, Katzenbeisser J, Uderhardt S, Zaiss MM, Scholtysek C, Schabbauer G, et al. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J Immunol*. 2009 Sep;183(5):3383–9.
95. Peters-Golden M, Gleason MM, Toghiani A. Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;36(6):689–703.
96. Sha W, Brüne B, Weigert A. The multi-faceted roles of prostaglandin E2 in cancer-infiltrating mononuclear phagocyte biology. *Immunobiology*. 2012 Dec;217(12):1225–32.
97. Peters-Golden M. Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function. *Sci Signal*. 2009 Jun;2(75):pe37.
98. Joo M, Sadikot RT. PGD synthase and PGD2 in immune response. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:503128.
99. Scher JU, Pillinger MH. The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. 2009 Aug;57(6):703–8.
100. Miller SB. Prostaglandins in health and disease: an overview. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Aug;36(1):37–49.

101. Demers LM. Prostaglandins in human disease. *Clin Lab Med.* 1984 Dec;4(4):787–801.
102. Rall JM, Mach SA, Dash PK. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Res.* 2003 Apr;968(2):273–6.
103. Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ. Prostaglandins and other lipid mediators in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002 Aug;68–69:197–210.
104. Teismann P, Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse.* 2001 Feb;39(2):167–74.
105. Beamish RE, Das PK, Karmazyn M, Dhalla NS. Prostaglandins and heart disease. *Can J Cardiol.* 1985 Jan;1(1):66–74.
106. Chan PS, Cervoni P. Prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane in cardiovascular diseases. *Drug Dev Res.* 1986;7(4):341–59.
107. Sales KJ, Jabbour HN. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction.* 2003;126(5):559.
108. Spector D, Zusman RM, Caldwell B V, Speroff L. The distribution of prostaglandins A, E, and F in the human kidney. *Prostaglandins.* 1974;6(3):263–70.
109. Narumiya S, FitzGerald GA. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(1):25–30.
110. Morrow JD, Harris TM, Roberts II LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem.* 1990;184(1):1–10.
111. Rokach J, Kim S, Bellone S, Lawson JA, Praticò D, Powell WS, et al. Total synthesis of isoprostanes: discovery and quantitation in biological systems. *Chem Phys Lipids.* 2004 Mar;128(1–2):35–56.
112. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ 2nd. The isoprostanes--25 years later. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Apr;1851(4):433–45.
113. Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ 2nd, et al. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest.* 1992 Dec;90(6):2502–7.

114. Voynow JA, Kummarapurugu A. Isoprostanes and asthma. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov;1810(11):1091–5.
115. Medina S, Domínguez-Perles R, Cejuela-Anta R, Villaño D, Martínez-Sanz JM, Gil P, et al. Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012;99(3–4):79–86.
116. Galano J-M, Lee YY, Oger C, Vigor C, Vercauteren J, Durand T, et al. Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25 years of research in chemistry and biology. *Prog Lipid Res*. 2017 Oct;68:83–108.
117. Montine TJ, Montine KS, Reich EE, Terry ES, Porter NA, Morrow JD. Antioxidants significantly affect the formation of different classes of isoprostanes and neuroprostanes in rat cerebral synaptosomes. *Biochem Pharmacol*. 2003 Feb;65(4):611–7.
118. Yin H, Morrow JD, Porter NA. Identification of a novel class of endoperoxides from arachidonate autoxidation. *J Biol Chem*. 2004 Jan;279(5):3766–76.
119. Kayganich-Harrison KA, Rose DM, Murphy RC, Morrow JD, Roberts LJ 2nd. Collision-induced dissociation of F2-isoprostane-containing phospholipids. *J Lipid Res*. 1993 Jul;34(7):1229–35.
120. Stafforini DM, Sheller JR, Blackwell TS, Sapirstein A, Yull FE, McIntyre TM, et al. Release of free F2-isoprostanes from esterified phospholipids is catalyzed by intracellular and plasma platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem*. 2006 Feb;281(8):4616–23.
121. Yan Z, Mas E, Mori TA, Croft KD, Barden AE. A significant proportion of F2-isoprostanes in human urine are excreted as glucuronide conjugates. *Anal Biochem*. 2010 Aug;403(1–2):126–8.
122. Marhuenda J, Medina S, Martínez-Hernández P, Arina S, Zafrilla P, Mulero J, et al. Effect of the dietary intake of melatonin- and hydroxytyrosol-rich wines by healthy female volunteers on the systemic lipidomic-related oxylipins. *Food Funct*. 2017 Oct;8(10):3745–57.
123. Milne GL, Morrow JD. Isoprostanes and related compounds: update 2006. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(7–8):1379–84.

124. Barden AE, Mas E, Croft KD, Phillips M, Mori TA. Minimizing artifactual elevation of lipid peroxidation products (F2-isoprostanes) in plasma during collection and storage. *Anal Biochem.* 2014 Mar;449:129–31.
125. Yen H-C, Wei H-J, Lin C-L. Unresolved issues in the analysis of F2-isoprostanes, F4-neuroprostanes, isofurans, neurofurans, and F2-dihomoisoprostanes in body fluids and tissue using gas chromatography/negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *Free Radic Res.* 2015;49(7):861–80.
126. Tsikas D, Suchy M-T. Assessment of urinary F(2)-isoprostanes in experimental and clinical studies: mass spectrometry versus ELISA. Vol. 60, *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979).* United States; 2012. p. e14; author reply e15.
127. Kaikkonen JE, Vilppo T, Asikainen J, Voutilainen S, Kurl S, Salonen JT. Fatty acids as determinants of in-vivo lipid peroxidation: the EFFGE study in Eastern Finnish hypertensive and non-hypertensive subjects. *Ann Med.* 2013 Sep;45(5–6):455–64.
128. Sakamoto H, Corcoran TB, Laffey JG, Shorten GD. Isoprostanes--markers of ischaemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol.* 2002 Aug;19(8):550–9.
129. Veglia F, Werba JP, Tremoli E, Squellerio I, Sisillo E, Parolari A, et al. Assessment of oxidative stress in coronary artery bypass surgery: comparison between the global index OXY-SCORE and individual biomarkers. *Biomarkers Biochem Indic Expo response, susceptibility to Chem.* 2009 Nov;14(7):465–72.
130. Berg K, Langaas M, Ericsson M, Pleym H, Basu S, Nordrum IS, et al. Acetylsalicylic acid treatment until surgery reduces oxidative stress and inflammation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J cardio-thoracic Surg Off J Eur Assoc Cardio-thoracic Surg.* 2013 Jun;43(6):1154–63.
131. Praticò D, Clark CM, Lee VM, Trojanowski JQ, Rokach J, FitzGerald GA. Increased 8,12-iso-iPF2alpha-VI in Alzheimer's disease: correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Ann Neurol.* 2000 Nov;48(5):809–12.
132. Seet RCS, Lee C-YJ, Lim ECH, Tan JJH, Quek AML, Chong W-L, et al. Oxidative damage in Parkinson disease: Measurement using accurate biomarkers. *Free Radic Biol Med.* 2010 Feb;48(4):560–6.

133. D'Amico E, Factor-Litvak P, Santella RM, Mitsumoto H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2013 Dec;65:509–27.
134. Davì G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, et al. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation.* 2003 Jul;107(25):3199–203.
135. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med.* 1995 May;332(18):1198–203.
136. Montine KS, Quinn JF, Zhang J, Fessel JP, Roberts LJ 2nd, Morrow JD, et al. Isoprostanes and related products of lipid peroxidation in neurodegenerative diseases. *Chem Phys Lipids.* 2004 Mar;128(1–2):117–24.
137. Keaney JFJ, Larson MG, Vasani RS, Wilson PWF, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Mar;23(3):434–9.
138. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Feb;25(2):279–86.
139. Morrow JD, Zackert WE, Yang JP, Kurhts EH, Callewaert D, Dworski R, et al. Quantification of the major urinary metabolite of 15-F2t-isoprostane (8-iso-PGF2alpha) by a stable isotope dilution mass spectrometric assay. *Anal Biochem.* 1999 May;269(2):326–31.
140. Dai Q, Gao Y-T, Shu X-O, Yang G, Milne G, Cai Q, et al. Oxidative stress, obesity, and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009 May;27(15):2482–8.
141. Khan F, Ray S, Craigie AM, Kennedy G, Hill A, Barton KL, et al. Lowering of oxidative stress improves endothelial function in healthy subjects with habitually low intake of fruit and vegetables: a randomized controlled trial of antioxidant- and polyphenol-rich blackcurrant juice. *Free Radic Biol Med.* 2014 Jul;72:232–7.

142. McAulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Shooter LA, Henson DA, Utter AC, et al. Effect of blueberry ingestion on natural killer cell counts, oxidative stress, and inflammation prior to and after 2.5 h of running. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab*. 2011 Dec;36(6):976–84.
143. Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, Casoli T, Di Stefano G, González-Paramás AM, et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *J Nutr Biochem*. 2014 Mar;25(3):289–94.
144. Traustadóttir T, Davies SS, Stock AA, Su Y, Heward CB, Roberts LJ 2nd, et al. Tart cherry juice decreases oxidative stress in healthy older men and women. *J Nutr*. 2009 Oct;139(10):1896–900.
145. Morrow JD. The isoprostanes - unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des*. 2006;12(8):895–902.
146. Hou X, Roberts LJ 2nd, Gobeil FJ, Taber D, Kanai K, Abran D, et al. Isomer-specific contractile effects of a series of synthetic f2-isoprostanes on retinal and cerebral microvasculature. *Free Radic Biol Med*. 2004 Jan;36(2):163–72.
147. Bauer J, Ripperger A, Frantz S, Ergün S, Schwedhelm E, Benndorf RA. Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2014 Jul;171(13):3115–31.
148. Song W-L, Paschos G, Fries S, Reilly MP, Yu Y, Rokach J, et al. Novel eicosapentaenoic acid-derived F3-isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 2009 Aug;284(35):23636–43.
149. Barden A, Mas E, Henry P, Durand T, Galano J-M, Roberts LJ, et al. The effects of oxidation products of arachidonic acid and n3 fatty acids on vascular and platelet function. *Free Radic Res*. 2011 Apr;45(4):469–76.
150. Halliwell B, Lee CYJ. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. *Antioxid Redox Signal*. 2010 Jul;13(2):145–56.
151. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1634–58.

152. Friedman J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: *Oxidative stress and free radical damage in neurology*. Springer; 2011. p. 19–27.
153. García-Flores LA, Medina S, Martínez-Hernández P, Oger C, Galano J-M, Durand T, et al. Snapshot situation of oxidative degradation of the nervous system, kidney, and adrenal glands biomarkers-neuroprostane and dihomio-isoprostanes-urinary biomarkers from infancy to elderly adults. *Redox Biol*. 2017 Apr;11:586–91.
154. Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. Isoprostanes and neuroprostanes as biomarkers of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:572491.
155. Galano J-M, Mas E, Barden A, Mori TA, Signorini C, De Felice C, et al. Isoprostanes and neuroprostanes: total synthesis, biological activity and biomarkers of oxidative stress in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013 Dec;107:95–102.
156. Vigor C, Bertrand-Michel J, Pinot E, Oger C, Vercauteren J, Le Faouder P, et al. Non-enzymatic lipid oxidation products in biological systems: assessment of the metabolites from polyunsaturated fatty acids. *J Chromatogr B, Anal Technol Biomed life Sci*. 2014 Aug;964:65–78.
157. Reich EE, Markesbery WR, Roberts LJ 2nd, Swift LL, Morrow JD, Montine TJ. Brain regional quantification of F-ring and D-/E-ring isoprostanes and neuroprostanes in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 2001 Jan;158(1):293–7.
158. Roberts LJ 2nd, Milne GL. Isoprostanes. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S219-23.
159. Nourooz-Zadeh J, Liu EHC, Änggård EE, Halliwell B. F4-Isoprostanes: A Novel Class of Prostanoids Formed during Peroxidation of Docosahexaenoic Acid (DHA). *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1998;242(2):338–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X97978839>
160. Roberts LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, et al. Formation of Isoprostane-like Compounds (Neuroprostanes) in Vivo from Docosahexaenoic Acid*. *J Biol Chem* [Internet]. 1998;273(22):13605–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819578000>

161. Yin H, Musiek ES, Gao L, Porter NA, Morrow JD. Regiochemistry of Neuroprostanes Generated from the Peroxidation of Docosahexaenoic Acid in Vitro and in Vivo*. *J Biol Chem* [Internet]. 2005;280(28):26600–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820568543>
162. Roy J, Oger C, Thireau J, Roussel J, Mercier-Touzot O, Faure D, et al. Nonenzymatic lipid mediators, neuroprostanes, exert the antiarrhythmic properties of docosahexaenoic acid. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2015;86:269–78. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158491500177X>
163. Roy J, Fauconnier J, Oger C, Farah C, Angebault-Prouteau C, Thireau J, et al. Non-enzymatic oxidized metabolite of DHA, 4(RS)-4-F4t-neuroprostane protects the heart against reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017;102:229–39. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584916310930>
164. Roy J, Oliveira LT, Oger C, Galano J-M, Bultel-Poncé V, Richard S, et al. Polymeric nanocapsules prevent oxidation of core-loaded molecules: evidence based on the effects of docosahexaenoic acid and neuroprostane on breast cancer cells proliferation. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Dec;34:155.
165. VanRollins M, Woltjer RL, Yin H, Morrow JD, Montine TJ. F2-Dihomo-isoprostanes arise from free radical attack on adrenic acid*. *J Lipid Res* [Internet]. 2008;49(5):995–1005. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520425866>
166. De Felice C, Signorini C, Durand T, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, et al. F2-dihomo-isoprostanes as potential early biomarkers of lipid oxidative damage in Rett syndrome. *J Lipid Res* [Internet]. 2011;52(12):2287–97. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520408338>
167. Medina S, De Miguel-Elizaga I, Oger C, Galano J-M, Durand T, Martínez-Villanueva M, et al. Dihomo-isoprostanes—nonenzymatic metabolites of AdA—are higher in epileptic patients compared to healthy individuals by a new ultrahigh pressure liquid chromatography–triple quadrupole–tandem mass spectrometry method. *Free Radic Biol Med*. 2015;79:154–63.
168. Turck D, Bresson J-L, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, et al. Guidance for the scientific requirements for health claims

related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health: (Revision 1). EFSA journal Eur Food Saf Auth. 2018 Jan;16(1):e05136.

169. Martini D, Rossi S, Biasini B, Zavaroni I, Bedogni G, Musci M, et al. Claimed effects, outcome variables and methods of measurement for health claims proposed under European Community Regulation 1924/2006 in the framework of protection against oxidative damage and cardiovascular health. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2017 Jun;27(6):473–503.

170. Gilmore TD, Herscovitch M. Inhibitors of NF- κ B signaling: 785 and counting. *Oncogene*. 2006;25(51):6887–99.

171. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853–66.

172. Karlsen A, Paur I, Bøhn SK, Sakhi AK, Borge GI, Serafini M, et al. Bilberry juice modulates plasma concentration of NF-kappaB related inflammatory markers in subjects at increased risk of CVD. *Eur J Nutr*. 2010 Sep;49(6):345–55.

173. Karlsen A, Retterstøl L, Laake P, Paur I, Kjølrsrud-Bøhn S, Sandvik L, et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr*. 2007;137(8):1951–4.

174. Kelley DS, Rasooly R, Jacob RA, Kader AA, Mackey BE. Consumption of Bing sweet cherries lowers circulating concentrations of inflammation markers in healthy men and women. *J Nutr*. 2006;136(4):981–6.

175. Calder PC, Albers R, Antoine J-M, Blum S, Bourdet-Sicard R, Ferns GA, et al. Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*. 2009;101(S1):1–45.

176. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clin Chem*. 2009;55(2):229–38.

177. Armani A, Becker RC. The biology, utilization, and attenuation of C-reactive protein in cardiovascular disease: part II. *Am Heart J*. 2005;149(6):977–83.

178. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101(15):1767–72.

179. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084(1):89–117.
180. He FJ, Nowson CA, Lucas M, MacGregor GA. Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. *J Hum Hypertens.* 2007 Sep;21(9):717–28.
181. Jia Z, Nallasamy P, Liu D, Shah H, Li JZ, Chitrakar R, et al. Luteolin protects against vascular inflammation in mice and TNF-alpha-induced monocyte adhesion to endothelial cells via suppressing IKB α /NF- κ B signaling pathway. *J Nutr Biochem.* 2015 Mar;26(3):293–302.
182. Chen T, Zhang X, Zhu G, Liu H, Chen J, Wang Y, et al. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine (Baltimore).* 2020 Sep;99(38):e22241.
183. Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, et al. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the Cytokine-Activation and Long-Term Prognosis in Myocardial Infarction (C-ALPHA) study. *Circulation.* 2005 Feb;111(7):863–70.
184. Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* 1996;7(2):93–124.
185. Levine SJ. Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *J Biol Chem.* 2008 May;283(21):14177–81.
186. Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini R V, et al. Mechanistic Insights into the Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:5245308.
187. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008 May;4(5):278–86.
188. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med.* 1986 Feb;314(8):488–500.
189. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002 Mar;105(9):1135–43.

190. Lin F, Pei L, Zhang Q, Han W, Jiang S, Lin Y, et al. Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis and macrophage migration by regulating caveolin-1 phosphorylation. *J Cell Physiol*. 2018;233(10):6683–92.
191. Dwivedi A, Anggård EE, Carrier MJ. Oxidized LDL-mediated monocyte adhesion to endothelial cells does not involve NFkappaB. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jun;284(1):239–44.
192. Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2995–8.
193. Marventano S, Kolacz P, Castellano S, Galvano F, Buscemi S, Mistretta A, et al. A review of recent evidence in human studies of n-3 and n-6 PUFA intake on cardiovascular disease, cancer, and depressive disorders: does the ratio really matter? *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66(6):611–22.
194. Carnevale R, Bartimoccia S, Nocella C, Di Santo S, Loffredo L, Illuminati G, et al. LDL oxidation by platelets propagates platelet activation via an oxidative stress-mediated mechanism. *Atherosclerosis*. 2014 Nov;237(1):108–16.
195. Berbée JFP, Mol IM, Milne GL, Pollock E, Hoeke G, Lütjohann D, et al. Deuterium-reinforced polyunsaturated fatty acids protect against atherosclerosis by lowering lipid peroxidation and hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2017 Sep;264:100–7.
196. Castañer O, Fitó M, López-Sabater MC, Poulsen HE, Nyssönen K, Schröder H, et al. The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clin Nutr*. 2011 Aug;30(4):490–3.
197. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, et al. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr*. 2004 Jun;23(3):423–33.
198. Ibero-Baraibar I, Abete I, Navas-Carretero S, Massis-Zaid A, Martinez JA, Zulet MA. Oxidised LDL levels decreases after the consumption of ready-to-eat meals supplemented with cocoa extract within a hypocaloric diet. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2014;24(4):416–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939475313002652>

199. Vari R, Scazzocchio B, Santangelo C, Filesi C, Galvano F, D'Archivio M, et al. Protocatechuic Acid Prevents oxLDL-Induced Apoptosis by Activating JNK/Nrf2 Survival Signals in Macrophages. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:351827.
200. Chrispin J, Martin SS, Hasan RK, Joshi PH, Minder CM, McEvoy JW, et al. Landmark lipid-lowering trials in the primary prevention of cardiovascular disease. *Clin Cardiol*. 2013 Sep;36(9):516–23.
201. Xiao C, Dash S, Morgantini C, Hegele RA, Lewis GF. Pharmacological Targeting of the Atherogenic Dyslipidemia Complex: The Next Frontier in CVD Prevention Beyond Lowering LDL Cholesterol. *Diabetes*. 2016 Jul;65(7):1767–78.
202. Li S, Guo Y-L, Zhao X, Zhang Y, Zhu C-G, Wu N-Q, et al. Novel and traditional lipid-related biomarkers and their combinations in predicting coronary severity. *Sci Rep*. 2017 Mar;7(1):360.
203. Samman S, Sivarajah G, Man JC, Ahmad ZI, Petocz P, Caterson ID. A mixed fruit and vegetable concentrate increases plasma antioxidant vitamins and folate and lowers plasma homocysteine in men. *J Nutr*. 2003 Jul;133(7):2188–93.
204. Ansari R, Mahta A, Mallack E, Luo JJ. Hyperhomocysteinemia and neurologic disorders: a review. *J Clin Neurol*. 2014 Oct;10(4):281–8.
205. Selhub J. Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:217–46.
206. Heinecke JW. Biochemical evidence for a link between elevated levels of homocysteine and lipid peroxidation in vivo. *Curr Atheroscler Rep*. 1999 Sep;1(2):87–9.
207. Baroni L, Bonetto C, Rizzo G, Bertola C, Caberlotto L, Bazzlerla G. Association Between Cognitive Impairment and Vitamin B12, Folate, and Homocysteine Status in Elderly Adults: A Retrospective Study. *J Alzheimers Dis*. 2019;70(2):443–53.
208. Meng H, Li Y, Zhang W, Zhao Y, Niu X, Guo J. The relationship between cognitive impairment and homocysteine in a B12 and folate deficient population in China: A cross-sectional study. *Medicine (Baltimore)*. 2019 Nov;98(47):e17970.

209. Leishear K, Ferrucci L, Lauretani F, Boudreau RM, Studenski SA, Rosano C, et al. Vitamin B12 and homocysteine levels and 6-year change in peripheral nerve function and neurological signs. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2012 May;67(5):537–43.
210. Watanabe F, Yabuta Y, Bito T, Teng F. Vitamin B₁₂-containing plant food sources for vegetarians. *Nutrients*. 2014 May;6(5):1861–73.
211. Nelson AB. Deficiencia de vitamina B12 como etiología de deterioro cognitivo y demencia. *Rev Medica Sinerg*. 2022;7(6):e830–e830.
212. Zaric BL, Obradovic M, Bajic V, Haidara MA, Jovanovic M, Isenovic ER. Homocysteine and Hyperhomocysteinaemia. *Curr Med Chem*. 2019;26(16):2948–61.
213. Lee GY, Han SN. The Role of Vitamin E in Immunity. *Nutrients*. 2018 Nov;10(11).
214. Sheppard AJ, Pennington JAT, Weihrauch JL. Vitamin E in health and disease. Marcel-Dekker New York. 1993;
215. Dorjgochoo T, Gao Y-T, Chow W-H, Shu X, Yang G, Cai Q, et al. Major metabolite of F2-isoprostane in urine may be a more sensitive biomarker of oxidative stress than isoprostane itself. *Am J Clin Nutr*. 2012 Aug;96(2):405–14.
216. Santilli F, D'Ardes D, Davì G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul Pharmacol*. 2015 Nov;74:23–37.
217. Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JCH, Vaalburg W, Bart J, Willemsen ATM, et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):176–9.
218. Fernstrom JD, Fernstrom MH. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr*. 2007 Jun;137(6 Suppl 1):1539S-1547S; discussion 1548S.
219. Mitchell HA, Weinshenker D. Good night and good luck: norepinephrine in sleep pharmacology. *Biochem Pharmacol*. 2010 Mar;79(6):801–9.
220. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Jul;5(7):374–81.
221. Harrington KA, Augood SJ, Kingsbury AE, Foster OJ, Emson PC. Dopamine transporter (Dat) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2)

gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996 Feb;36(1):157–62.

222. Salamone JD, Correa M. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. 2012 Nov;76(3):470–85.

223. Ben Zion IZ, Tessler R, Cohen L, Lerer E, Raz Y, Bachner-Melman R, et al. Polymorphisms in the dopamine D4 receptor gene (DRD4) contribute to individual differences in human sexual behavior: desire, arousal and sexual function. *Mol Psychiatry*. 2006 Aug;11(8):782–6.

224. Berridge KC, Kringelbach ML. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Aug;199(3):457–80.

225. Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, Hauser DN, Bittencourt JC, Correa RG. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell Mol Neurobiol*. 2019 Jan;39(1):31–59.

226. Wurtman RJ, Hefti F, Melamed E. Precursor control of neurotransmitter synthesis. *Pharmacol Rev*. 1980 Dec;32(4):315–35.

227. Whitworth JA, Williamson PM, Mangos G, Kelly JJ. Cardiovascular consequences of cortisol excess. *Vasc Health Risk Manag*. 2005;1(4):291–9.

228. Michels N, Sioen I, Braet C, Huybrechts I, Vanaelst B, Wolters M, et al. Relation between salivary cortisol as stress biomarker and dietary pattern in children. *Psychoneuroendocrinology*. 2013 Sep;38(9):1512–20.

229. Girod JP, Brotman DJ. Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovasc Res*. 2004 Nov;64(2):217–26.

230. Iob E, Steptoe A. Cardiovascular Disease and Hair Cortisol: a Novel Biomarker of Chronic Stress. *Curr Cardiol Rep*. 2019 Aug;21(10):116.

231. Rahman MM, Ichiyangi T, Komiyama T, Sato S, Konishi T. Effects of anthocyanins on psychological stress-induced oxidative stress and neurotransmitter status. *J Agric Food Chem*. 2008;56(16):7545–50.

232. Graumann R, Paris I, Martinez-Alvarado P, Rumanque P, Perez-Pastene C, Cardenas SP, et al. Oxidation of dopamine to aminochrome as a mechanism for neurodegeneration of dopaminergic systems in Parkinson's disease. Possible neuroprotective role of DT-diaphorase. *Pol J Pharmacol*. 2002;54(6):573–80.

233. Dvoráková M, Jezová D, Blazíček P, Trebatická J, Skodáček I, Suba J, et al. Urinary catecholamines in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): modulation by a polyphenolic extract from pine bark (pycnogenol). *Nutr Neurosci*. 2007;10(3–4):151–7.
234. Pistollato F, Sumalla Cano S, Elio I, Masias Vergara M, Giampieri F, Battino M. Associations between Sleep, Cortisol Regulation, and Diet: Possible Implications for the Risk of Alzheimer Disease. *Adv Nutr*. 2016 Jul;7(4):679–89.
235. Takeda E, Terao J, Nakaya Y, Miyamoto K, Baba Y, Chuman H, et al. Stress control and human nutrition. *J Med Invest*. 2004 Aug;51(3–4):139–45.
236. Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Inferrera G, Squadrito F, Parisi A, et al. Serotonin, norepinephrine and dopamine involvement in the antidepressant action of hypericum perforatum. *Pharmacopsychiatry*. 2001 Mar;34(2):45–9.
237. Lima Gonçalves CF, de Souza dos Santos MC, Ginabreda MG, Soares Fortunato R, Pires de Carvalho D, Freitas Ferreira AC. Flavonoid rutin increases thyroid iodide uptake in rats. *PLoS One*. 2013;8(9):e73908.
238. Miller MG, Shukitt-Hale B. Berry fruit enhances beneficial signaling in the brain. *J Agric Food Chem*. 2012 Jun;60(23):5709–15.
239. Lomiwes D, Ha B, Ngametua N, Burr NS, Cooney JM, Trower TM, et al. Timed consumption of a New Zealand blackcurrant juice support positive affective responses during a self-motivated moderate walking exercise in healthy sedentary adults. *J Int Soc Sports Nutr*. 2019 Aug;16(1):33.
240. Boulpaep EL, Boron WF, Caplan MJ, Cantley L, Igarashi P, Aronson PS, et al. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. 2009;
241. Mancini A, Martorana GE, Magini M, Festa R, Raimondo S, Silvestrini A, et al. Oxidative stress and metabolic syndrome: Effects of a natural antioxidants enriched diet on insulin resistance. *Clin Nutr ESPEN*. 2015 Apr;10(2):e52–60.
242. Giuliani C, Noguchi Y, Harii N, Napolitano G, Tatone D, Bucci I, et al. The flavonoid quercetin regulates growth and gene expression in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology*. 2008;149(1):84–92.
243. Parmar HS, Dixit Y, Kar A. Fruit and vegetable peels: Paving the way towards the development of new generation therapeutics. *Drug Discov Ther*. 2010 Oct;4(5):314–25.

244. Kanazawa K, Sakakibara H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. *J Agric Food Chem.* 2000;48(3):844–8.
245. Parmar HS, Kar A. Protective role of *Mangifera indica*, *Cucumis melo* and *Citrullus vulgaris* peel extracts in chemically induced hypothyroidism. *Chem Biol Interact.* 2009;177(3):254–8.
246. Aune D, Giovannucci E, Boffetta P, Fadnes LT, Keum N, Norat T, et al. Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality-a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Int J Epidemiol [Internet].* 2017 Jun 1;46(3):1029–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28338764>
247. Slavin JL, Lloyd B. Health benefits of fruits and vegetables. *Adv Nutr.* 2012 Jul;3(4):506–16.
248. Nishida C, Uauy R, Kumanyika S, Shetty P. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. *Public Health Nutr.* 2004;7(1a):245–50.
249. Blomhoff R, Andersen LF, Iversen PO, Johansson L, Smeland S. Kostråd for å fremme folkehelsen og forebygge kroniske sykdommer. Metodol og vitenskapelig kunnskapsgrunnlag. 2011;
250. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Cekanova M, LeMieux M, Greer B, Moustaid-Moussa N. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. *J Nutr Biochem.* 2013 Apr;24(4):613–23.
251. Jones JL, Fernandez ML, McIntosh MS, Najm W, Calle MC, Kalynych C, et al. A Mediterranean-style low-glycemic-load diet improves variables of metabolic syndrome in women, and addition of a phytochemical-rich medical food enhances benefits on lipoprotein metabolism. *J Clin Lipidol.* 2011;5(3):188–96.
252. Urpi-Sarda M, Casas R, Chiva-Blanch G, Romero-Mamani ES, Valderas-Martínez P, Arranz S, et al. Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacol Res.* 2012 Jun;65(6):577–83.
253. Fitó M, Cladellas M, de la Torre R, Martí J, Muñoz D, Schröder H, et al. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2008 Apr;62(4):570–4.

254. Dai J, Jones DP, Goldberg J, Ziegler TR, Bostick RM, Wilson PW, et al. Association between adherence to the Mediterranean diet and oxidative stress. *Am J Clin Nutr.* 2008 Nov;88(5):1364–70.
255. Hernáez Á, Castañer O, Elosua R, Pintó X, Estruch R, Salas-Salvadó J, et al. Mediterranean Diet Improves High-Density Lipoprotein Function in High-Cardiovascular-Risk Individuals: A Randomized Controlled Trial. *Circulation.* 2017 Feb;135(7):633–43.
256. Benton D, Young HA. Role of fruit juice in achieving the 5-a-day recommendation for fruit and vegetable intake. *Nutr Rev.* 2019 Nov;77(11):829–43.
257. Li Y, Zhang D, Pagán JA. Social Norms and the Consumption of Fruits and Vegetables across New York City Neighborhoods. *J Urban Health.* 2016 Apr;93(2):244–55.
258. Sachdeva V, Roy A, Bharadvaja N. Current Prospects of Nutraceuticals: A Review. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020;21(10):884–96.
259. Espín JC, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry.* 2007;68(22–24):2986–3008.
260. Bresciani L, Martini D, Mena P, Tassotti M, Calani L, Brigati G, et al. Absorption Profile of (Poly)Phenolic Compounds after Consumption of Three Food Supplements Containing 36 Different Fruits, Vegetables, and Berries. *Nutrients.* 2017 Feb;9(3).
261. Bresciani L, Calani L, Cossu M, Mena P, Sayegh M, Ray S, et al. (Poly) phenolic characterization of three food supplements containing 36 different fruits, vegetables and berries. *PharmaNutrition.* 2015;3(2):11–9.
262. Srinivasan VS. Bioavailability of nutrients: a practical approach to in vitro demonstration of the availability of nutrients in multivitamin-mineral combination products. *J Nutr.* 2001;131(4):1349S-1350S.
263. Medina S, Domínguez-Perles R, Gil JI, Ferreres F, García-Viguera C, Martínez-Sanz JM, et al. A ultra-pressure liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry method for the analysis of 13 eicosanoids in human urine and quantitative 24 hour values in healthy volunteers in a controlled constant diet. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012;26(10):1249–57.
264. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for

240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* (London, England). 2015 Jan;385(9963):117–71.

265. García N, Zazueta C, Aguilera-Aguirre L. Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Disease. Vol. 2017, *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017. p. 5853238.

266. Pignatelli P, Menichelli D, Pastori D, Violi F. Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. *Kardiol Pol*. 2018;76(4):713–22.

267. Klaunig JE. Oxidative Stress and Cancer. *Curr Pharm Des*. 2018;24(40):4771–8.

268. Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease, cancer, and all causes in Japan: the Ohsaki study. *JAMA*. 2006 Sep;296(10):1255–65.

269. Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J*. 2001 Sep;358(Pt 3):547–57.

270. Hubbard GP, Wolfram S, de Vos R, Bovy A, Gibbins JM, Lovegrove JA. Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelet aggregation and essential components of the collagen-stimulated platelet activation pathway in man: a pilot study. *Br J Nutr*. 2006 Sep;96(3):482–8.

271. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, et al. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr;316(3):659–65.

272. Hallund J, Bügel S, Tholstrup T, Ferrari M, Talbot D, Hall WL, et al. Soy isoflavone-enriched cereal bars affect markers of endothelial function in postmenopausal women. *Br J Nutr*. 2006 Jun;95(6):1120–6.

273. Zern TL, Wood RJ, Greene C, West KL, Liu Y, Aggarwal D, et al. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. *J Nutr*. 2005 Aug;135(8):1911–7.

274. Jeong Y-J, Choi Y-J, Kwon H-M, Kang S-W, Park H-S, Lee M, et al. Differential inhibition of oxidized LDL-induced apoptosis in human endothelial cells treated with different flavonoids. *Br J Nutr.* 2005 May;93(5):581–91.
275. Hodgson JM, Croft KD. Dietary flavonoids: effects on endothelial function and blood pressure. *J Sci Food Agric.* 2006;86(15):2492–8.
276. Cardozo LFMF, Pedruzzi LM, Stenvinkel P, Stockler-Pinto MB, Daleprane JB, Leite MJ, et al. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie.* 2013 Aug;95(8):1525–33.
277. Rossi D, Guerrini A, Bruni R, Brognara E, Borgatti M, Gambari R, et al. trans-Resveratrol in Nutraceuticals: Issues in Retail Quality and Effectiveness. Vol. 17, *Molecules.* 2012. p. 12393–405.
278. Cassinese C, de Combarieu E, Falzoni M, Fuzzati N, Pace R, Sardone N. New liquid chromatography method with ultraviolet detection for analysis of anthocyanins and anthocyanidins in *Vaccinium myrtillus* fruit dry extracts and commercial preparations. *J AOAC Int.* 2007;90(4):911–9.
279. Alemán-Jiménez C, Domínguez-Perles R, Fanti F, Gallego-Gómez JI, Simonelli-Muñoz A, Moine E, et al. Unravelling the capacity of hydroxytyrosol and its lipophenolic derivatives to modulate the H₂O₂-induced isoprostanoid profile of THP-1 monocytes by UHPLC-QqQ-MS/MS lipidomic workflow. *Microchem J.* 2021;170:106703.
280. Campillo M, Medina S, Fanti F, Gallego-Gómez JI, Simonelli-Muñoz A, Bultel-Poncé V, et al. Phytosteranes and phytofurans modulate COX-2-linked inflammation markers in LPS-stimulated THP-1 monocytes by lipidomics workflow. *Free Radic Biol Med.* 2021 May;167:335–47.
281. Kashmiry A, Tate R, Rotondo G, Davidson J, Rotondo D. The prostaglandin EP4 receptor is a master regulator of the expression of PGE2 receptors following inflammatory activation in human monocytic cells. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Biol Lipids.* 2018;1863(10):1297–304.
282. Xu C, Liu W, You X, Leimert K, Popowycz K, Fang X, et al. PGF₂α modulates the output of chemokines and pro-inflammatory cytokines in myometrial cells from term pregnant women through divergent signaling pathways. *MHR Basic Sci Reprod Med.* 2015;21(7):603–14.

283. Davies SS, Roberts LJ 2nd. F2-isoprostanes as an indicator and risk factor for coronary heart disease. *Free Radic Biol Med.* 2011 Mar;50(5):559–66.
284. Rossi L, Mazzitelli S, Arciello M, Capo CR, Rotilio G. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 2008 Dec;33(12):2390–400.
285. Di Maio R. Neuronal oxidative injury in the development of the epileptic disease: a potential target for novel therapeutic approaches. *Malta Med J.* 2011;23(03).
286. Barden AE, Corcoran TB, Mas E, Durand T, Galano J-M, Roberts LJ, et al. Is there a role for isofurans and neuroprostanes in pre-eclampsia and normal pregnancy? *Antioxid Redox Signal.* 2012 Jan;16(2):165–9.
287. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radic Biol Med.* 2013 Sep;62:157–69.
288. Signorini C, De Felice C, Leoncini S, Giardini A, D'Esposito M, Filosa S, et al. F4-neuroprostanes mediate neurological severity in Rett syndrome. *Clin Chim Acta.* 2011;412(15–16):1399–406.
289. Manna C, Officioso A, Trojsi F, Tedeschi G, Leoncini S, Signorini C, et al. Increased non-protein bound iron in Down syndrome: Contribution to lipid peroxidation and cognitive decline. *Free Radic Res.* 2016;50(12):1422–31.
290. Seet RCS, Lee C-YJ, Loke WM, Huang SH, Huang H, Looi WF, et al. Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* 2011;50(12):1787–93.
291. Seet RCS, Lee C-YJ, Lim ECH, Quek AML, Huang H, Huang SH, et al. Oral zinc supplementation does not improve oxidative stress or vascular function in patients with type 2 diabetes with normal zinc levels. *Atherosclerosis.* 2011;219(1):231–9.
292. Signorini C, De Felice C, Durand T, Galano J-M, Oger C, Leoncini S, et al. Relevance of 4-F(4t)-neuroprostane and 10-F(4t)-neuroprostane to neurological diseases. *Free Radic Biol Med.* 2018 Feb;115:278–87.
293. Roberts LJ 2nd, Fessel JP. The biochemistry of the isoprostane, neuroprostane, and isofuran pathways of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids.* 2004 Mar;128(1–2):173–86.

294. García-Flores LA, Medina S, Cejuela R, Martínez-Sanz JM, Oger C, Galano J-M, et al. Assessment of oxidative stress biomarkers - neuroprostanes and dihomio-isoprostanes - in the urine of elite triathletes after two weeks of moderate-altitude training. *Free Radic Res.* 2016;50(5):485–94.
295. García-Flores LA, Medina S, Oger C, Galano J-M, Durand T, Cejuela R, et al. Lipidomic approach in young adult triathletes: effect of supplementation with a polyphenols-rich juice on neuroprostane and F(2)-dihomo-isoprostane markers. *Food Funct.* 2016 Oct;7(10):4343–55.
296. Marhuenda J, Medina S, Martínez-Hernández P, Arina S, Zafrilla P, Mulero J, et al. Melatonin and hydroxytyrosol protect against oxidative stress related to the central nervous system after the ingestion of three types of wine by healthy volunteers. *Food Funct.* 2017 Jan;8(1):64–74.
297. Ghosh D, Scheepens A. Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* 2009 Mar;53(3):322–31.
298. Spencer JPE. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr.* 2007 Dec;2(3):257–73.
299. Schaffer S, Halliwell B. Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr.* 2012 Apr;7(2):99–109.
300. Dajas F, Andrés A-CJ, Florencia A, Carolina E, Felicia R-M. Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2013 Mar;13(1):30–5.
301. Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ. Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med.* 2004 Mar;36(5):592–604.
302. Gomez-Pinilla F, Nguyen TTJ. Natural mood foods: the actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutr Neurosci.* 2012 May;15(3):127–33.
303. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol.* 2009 Jun;5(6):311–22.
304. Gómez-Pinilla F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nat Rev Neurosci.* 2008 Jul;9(7):568–78.

305. Wollen KA. Alzheimer's disease: the pros and cons of pharmaceutical, nutritional, botanical, and stimulatory therapies, with a discussion of treatment strategies from the perspective of patients and practitioners. *Altern Med Rev.* 2010 Sep;15(3):223–44.
306. Medina S, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C, Ferreres F, Gil JL, et al. The intake of broccoli sprouts modulates the inflammatory and vascular prostanoids but not the oxidative stress-related isoprostanes in healthy humans. *Food Chem.* 2015;173:1187–94.
307. Dow CA, Wertheim BC, Patil BS, Thomson CA. Daily consumption of grapefruit for 6 weeks reduces urine F2-isoprostanes in overweight adults with high baseline values but has no effect on plasma high-sensitivity C-reactive protein or soluble vascular cellular adhesion molecule 1. *J Nutr.* 2013 Oct;143(10):1586–92.
308. Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, et al. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radic Res.* 2001 Jan;34(1):93–9.
309. Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J Transl Med.* 2014 Aug;12:219.
310. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012;27(1):76–89.
311. Dwivedi A, Änggård EE, Carrier MJ. Oxidized LDL-mediated monocyte adhesion to endothelial cells does not involve NFκB. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284(1):239–44.
312. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1993 Jun;268(16):11811–6.
313. Rhoads JP, Major AS. How Oxidized Low-Density Lipoprotein Activates Inflammatory Responses. *Crit Rev Immunol.* 2018;38(4):333–42.
314. Steinberg D, Witztum JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2311–6.

315. Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calò LA. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2013/10/03. 2013;2013:714653. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24222937>
316. Tsimikas S. Measures of oxidative stress. *Clin Lab Med*. 2006 Sep;26(3):571–90, v–vi.
317. EFSA Panel on Dietetic Products N and A (EFSA NDAP, Turck D, Bresson J, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, et al. Guidance for the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health: (Revision 1). *EFSA J*. 2018;16(1):e05136.
318. Moreno-Luna R, Muñoz-Hernandez R, Miranda ML, Costa AF, Jimenez-Jimenez L, Vallejo-Vaz AJ, et al. Olive oil polyphenols decrease blood pressure and improve endothelial function in young women with mild hypertension. *Am J Hypertens*. 2012 Dec;25(12):1299–304.
319. Tomé-Carneiro J, González M, Larrosa M, García-Almagro FJ, Avilés-Plaza F, Parra S, et al. Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Mol Nutr Food Res*. 2012 May;56(5):810–21.
320. Ridker PM. A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Feb;67(6):712–23.
321. Silva D, de Lacerda AP. High-sensitivity C-reactive protein as a biomarker of risk in coronary artery disease. *Rev Port Cardiol (English Ed)*. 2012;31(11):733–45.
322. Danesh J, Pepys MB. C-reactive protein in healthy and in sick populations. Oxford University Press; 2000.
323. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer H-G, Löwel H, Döring A, et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984. *Circulation*. 1999;99(2):237–42.
324. Holt EM, Steffen LM, Moran A, Basu S, Steinberger J, Ross JA, et al. Fruit and vegetable consumption and its relation to markers of inflammation and oxidative stress in adolescents. *J Am Diet Assoc*. 2009 Mar;109(3):414–21.

325. Marques-Vidal P, Bochud M, Bastardot F, Lüscher T, Ferrero F, Gaspoz J-M, et al. Levels and determinants of inflammatory biomarkers in a Swiss population-based sample (CoLaus study). *PLoS One*. 2011;6(6):e21002.
326. Borai IH, Ezz MK, Rizk MZ, Aly HF, El-Sherbiny M, Matloub AA, et al. Therapeutic impact of grape leaves polyphenols on certain biochemical and neurological markers in AlCl₃-induced Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*. 2017 Sep;93:837–51.
327. Zeng Q, Li F, Xiang T, Wang W, Ma C, Yang C, et al. Influence of food groups on plasma total homocysteine for specific MTHFR C677T genotypes in Chinese population. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Feb;61(2).
328. Upadya H, Prabhu S, Prasad A, Subramanian D, Gupta S, Goel A. A randomized, double blind, placebo controlled, multicenter clinical trial to assess the efficacy and safety of *Emblica officinalis* extract in patients with dyslipidemia. *BMC Complement Altern Med*. 2019 Jan;19(1):27.
329. Nicholls SJ, Nelson AJ. HDL and cardiovascular disease. *Pathology*. 2019 Feb;51(2):142–7.
330. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, Givens EG, Ayers CR, Wedin KE, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2014 Dec;371(25):2383–93.
331. Rader DJ, Alexander ET, Weibel GL, Billheimer J, Rothblat GH. The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009 Apr;50 Suppl(Suppl):S189-94.
332. Beltrán-Debón R, Rodríguez-Gallego E, Fernández-Arroyo S, Senan-Campos O, Massucci FA, Hernández-Aguilera A, et al. The acute impact of polyphenols from *Hibiscus sabdariffa* in metabolic homeostasis: an approach combining metabolomics and gene-expression analyses. *Food Funct*. 2015 Sep;6(9):2957–66.
333. Tsang C, Hodgson L, Bussu A, Farhat G, Al-Dujaili E. Effect of Polyphenol-Rich Dark Chocolate on Salivary Cortisol and Mood in Adults. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2019 May;8(6).
334. Allgrove J, Farrell E, Gleeson M, Williamson G, Cooper K. Regular dark chocolate consumption's reduction of oxidative stress and increase of free-fatty-acid mobilization in response to prolonged cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2011 Apr;21(2):113–23.

335. Herrlinger KA, Chirouzes DM, Ceddia MA. Supplementation with a polyphenolic blend improves post-exercise strength recovery and muscle soreness. *Food Nutr Res.* 2015;59:30034.
336. Stalder T, Kirschbaum C. Analysis of cortisol in hair--state of the art and future directions. *Brain Behav Immun.* 2012 Oct;26(7):1019–29.
337. Raul J-S, Cirimele V, Ludes B, Kintz P. Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clin Biochem.* 2004 Dec;37(12):1105–11.
338. Sarubbo F, Ramis MR, Kienzer C, Aparicio S, Esteban S, Miralles A, et al. Chronic silymarin, quercetin and naringenin treatments increase monoamines synthesis and hippocampal Sirt1 levels improving cognition in aged rats. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2018;13(1):24–38.
339. Kita M, Uchida S, Yamada K, Ano Y. Anxiolytic effects of theaflavins via dopaminergic activation in the frontal cortex. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2019 Jun;83(6):1157–62.
340. Kehr J, Yoshitake S, Ijiri S, Koch E, Nöldner M, Yoshitake T. Ginkgo biloba leaf extract (EGb 761®) and its specific acylated flavonol constituents increase dopamine and acetylcholine levels in the rat medial prefrontal cortex: possible implications for the cognitive enhancing properties of EGb 761®. *Int psychogeriatrics.* 2012 Aug;24 Suppl 1:S25-34.
341. Sara SJ. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Mar;10(3):211–23.
342. Chamberlain SR, Robbins TW. Noradrenergic modulation of cognition: therapeutic implications. *J Psychopharmacol.* 2013 Aug;27(8):694–718.
343. Carrillo JÁ, Arcusa R, Zafrilla MP, Marhuenda J. Effects of Fruit and Vegetable-Based Nutraceutical on Cognitive Function in a Healthy Population: Placebo-Controlled, Double-Blind, and Randomized Clinical Trial. *Antioxidants* (Basel, Switzerland). 2021 Jan;10(1).
344. Williams EJ, Baines KJ, Berthon BS, Wood LG. Effects of an Encapsulated Fruit and Vegetable Juice Concentrate on Obesity-Induced Systemic Inflammation: A Randomised Controlled Trial. *Nutrients.* 2017 Feb;9(2).
345. Lamprecht M, Oettl K, Schwabegger G, Hofmann P, Greilberger JF. Several Indicators of Oxidative Stress, Immunity, and Illness Improved in Trained Men Consuming an Encapsulated Juice Powder Concentrate for 28 Weeks. *J Nutr*

[Internet]. 2007 Dec 1;137(12):2737–41. Available from: <https://doi.org/10.1093/jn/137.12.2737>

346. Lamprecht M, Obermayer G, Steinbauer K, Cvirn G, Hofmann L, Ledinski G, et al. Supplementation with a juice powder concentrate and exercise decrease oxidation and inflammation, and improve the microcirculation in obese women: randomised controlled trial data. *Br J Nutr*. 2013 Nov;110(9):1685–95.

347. Novembrino C, Cighetti G, De Giuseppe R, Vigna L, de Liso F, Pellegatta M, et al. Effects of encapsulated fruit and vegetable juice powder concentrates on oxidative status in heavy smokers. *J Am Coll Nutr*. 2011 Feb;30(1):49–56.

348. Kawashima A, Madarame T, Koike H, Komatsu Y, Wise JA. Four week supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates increased protective serum antioxidants and folate and decreased plasma homocysteine in Japanese subjects. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16(3):411–21.

X - ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado



Vicerrectorado de Investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,con

DNI:.....

DECLARO:

Haber sido informado/a minuciosamente del estudio, *“Nutraceutical clinical trial to evaluate the effects of different blends in cognitive functions of healthy volunteers”* así como de todos los procedimientos de la investigación. Los investigadores que van a acceder a mis datos personales y a los resultados de las pruebas son los investigadores participantes en el estudio.

Asimismo, he podido hacer preguntas del estudio, comprendiendo que me presto de forma voluntaria al mismo y que en cualquier momento puedo abandonarlo sin que me suponga perjuicio de ningún tipo.

CONSIENTO:

1.-) Someterme a las pruebas analíticas, que se detallan en el ensayo clínico.

2.-) El uso de los datos obtenidos según lo indicado en el párrafo siguiente:

En cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, le comunicamos que la información que ha facilitado y la obtenida como consecuencia de las exploraciones a las que se va a someter pasará a formar parte del fichero automatizado INVESALUD, cuyo titular es la FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN ANTONIO, con la finalidad de INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN LAS ÁREAS DE CONOCIMIENTO DE SALUD Y DEPORTES. Tiene derecho a acceder a esta información y cancelarla o rectificarla, dirigiéndose al domicilio de la entidad, en Avda. de los Jerónimos de Guadalupe 30107 (Murcia). Esta entidad le garantiza la adopción de las medidas oportunas para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos.



UCAM. Vicerrectorado de Investigación. Campus de los Jerónimos. 30107 GUADALUPE (Murcia)



Vicerrectorado de Investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En Guadalupe (Murcia) a de de

Fdo:.....



ANEXO 2. Encuesta de alimentación y actividad física.

DEPARTAMENTO DE FARMACIA



ENCUESTA DE SALUD

Identificación (nombre y apellidos):

Sexo:

Peso: Talla:

IMC: % Grasa Corporal:

Perímetro de la cintura:

Talla de pantalón:

FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Fumador A sí
B no
C Exfumador

1. ¿Cuántos cigarrillos fuma al día??

A	Ninguno, Nunca fumo
B	Sólo fumo de forma ocasional
C	Menos de 5 cigarrillos al día
D	Entre 5-20 cigarrillos al día
E	Más de 20 cigarrillos al día

Tiempo en años.....

2. ¿Tiene el colesterol elevado?

A	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

3. ¿Tiene elevados los triglicéridos?

A	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

4. ¿Es diabético?

A	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

5. ¿Tiene hipertensión?

A	Sí
B	No
C	No lo se

Tiempo en años.....

Medicamentos que habitualmente consume.....

Tiempo en años:.....

ENCUESTA DE DIETA MEDITERRÁNEA

6. ¿Dedica un tiempo a realizar ejercicio físico, incluyendo actividades como caminar o subir y bajar escaleras?

A	Todos los días
B	4-5 veces por semana
C	2-3 veces por semana
D	No

7. Si realiza ejercicio físico ¿Cuántas horas al día hace ejercicio físico?

A	Más de 2 horas
B	2 horas
C	1 hora y media
D	Media hora
E	Menos de media hora

8. Cuanto tiempo al día dedica a ver la televisión

A	30 minutos o menos
B	Entre 1-2 horas
C	Entre 2-3 horas
D	Más de 3 horas

9. ¿Es vegetariano?

A	No
B	Si

10. ¿Consumes suplementos nutricionales o vitamínicos?

A	No
B	Si
C	Ocasionalmente

11. ¿Qué estudios ha cursado?

A	Estudios primarios
B	Bachiller
C	Estudios universitarios de grado medio
D	Estudios universitarios de grado superior

DEPARTAMENTO DE FARMACIA



1. ¿Consume cereales (arroz, pasta, pan, galletas, cereales de desayuno, etc.....)?
- | | |
|---|--------------------------|
| A | Más de 7 raciones al día |
| B | 5-7 raciones al día |
| C | 3-4 raciones al día |
| D | 1-2 raciones al día |
| E | Nunca |
2. ¿Cuántas piezas de frutas consume al día?
- | | |
|---|--------------------------|
| A | Más de 6 raciones al día |
| B | 5-6 raciones al día |
| C | 3-4 raciones al día |
| D | 1-2 raciones al día |
| E | Ninguna |
3. ¿Cuántas veces a la semana consume legumbres?
- | | |
|---|------------------------------|
| A | Más de 4 veces a la semana |
| B | 3-4 veces por semana |
| C | 1-2 veces por semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
4. ¿Cuántas veces consume verduras y hortalizas al día?
- | | |
|---|-------------------------|
| A | Más de 2 veces al día |
| B | 2 veces al día |
| C | 1 vez al día |
| D | Menos de una vez al día |
| E | Nunca |
5. ¿Cuántas veces a la semana consume pescado?
- | | |
|---|------------------------------|
| A | Más de 4 veces a la semana |
| B | 3-4 veces por semana |
| C | 1-2 veces por semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
6. ¿Cuántas veces a la semana consume carne de ave?
- | | |
|---|------------------------------|
| A | Más de 4 veces a la semana |
| B | 3-4 veces por semana |
| C | 1-2 veces por semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
7. ¿Cuántas veces a la semana consume otro tipo de carne?
- | | |
|---|------------------------------|
| A | Más de 4 veces a la semana |
| B | 3-4 veces por semana |
| C | 1-2 veces por semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
8. ¿Cuántas veces al día consume leche y derivados lácteos?
- | | |
|---|--------------------------|
| A | Más de 4 raciones al día |
| B | 3-4 raciones al día |
| C | 1-2 raciones al día |
| D | Nunca |
9. ¿Qué tipo de aceite consume habitualmente?
- | | |
|---|-------------------------------|
| A | Aceite de oliva |
| B | Aceite de semillas |
| C | Aceite de oliva y de semillas |
10. ¿Utiliza aceite de oliva para cocinar?
- | | |
|---|----------------------------|
| A | Diariamente |
| B | 3-5 veces a la semana |
| C | 1-2 veces a la semana |
| D | Menos de 1 vez a la semana |
| E | Nunca |
11. ¿Consume normalmente frutos secos?
- | | |
|---|--|
| A | Más de 5 veces a la semana |
| B | 3-4 veces a la semana Menos de una vez a la semana |
| C | 1-2 veces a la semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
12. ¿Cuántos huevos consume a la semana?
- | | |
|---|-------------------------------|
| A | Más de 5 huevos a la semana |
| B | 3-5 huevos a la semana |
| C | 1-2 huevos a la semana |
| D | Menos de un huevo a la semana |
| E | Nunca |
13. ¿Cuántas veces a la semana consume embutido?
- | | |
|---|------------------------------|
| A | Todos los días |
| B | 3-5 veces por semana |
| C | 1-2 veces por semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
14. ¿Consume normalmente vino tinto? (125 mL, un vasito de vino)
- | | |
|---|--------------------------------------|
| A | Más de 7 vasitos de vino a la semana |
| B | 4-7 vasitos de vino a la semana |
| C | 1-3 vasitos de vino a la semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |
15. ¿Con qué frecuencia consume productos de bollería industrial?
- | | |
|---|------------------------------|
| A | Diariamente |
| B | 3 o 4 veces a la semana |
| C | 1-2 veces a la semana |
| D | Menos de una vez a la semana |
| E | Nunca |

HÁBITOS ALIMENTARIOS

DEPARTAMENTO DE FARMACIA



1. ¿Prefiere el pescado azul o el blanco?
 - A El pescado azul
 - B El pescado blanco
 - C Ninguno
2. ¿Cuántas veces a la semana consume pescado azul?
 - A Más de 4 veces a la semana
 - B 3-4 veces por semana
 - C 1-2 veces por semana
 - D Menos de una vez a la semana
 - E Nunca
3. ¿Cuántas veces a la semana consume carne roja?
 - A Más de 4 veces a la semana
 - B 3-4 veces por semana
 - C 1-2 veces por semana
 - D Menos de una vez a la semana
 - E Nunca
4. ¿Consume más pescado que carne a lo largo de la semana?
 - A Sí
 - B Igual
 - C No
5. ¿Los derivados lácteos que consume son desnatados?
 - A Nunca
 - B A veces
 - C Siempre
 - D Son semidesnatados
6. ¿Consume normalmente café?
 - A Nunca
 - B Ocasionalmente
 - C 1-2 veces al día
 - D 3-4 veces al día
 - E Más de 4 veces al día
7. ¿Consumes normalmente cerveza?
 - A Nunca
 - B Menos de una vez a la semana
 - C 1-2 veces a la semana
 - D 3-4 veces a la semana
 - E Más de 4 veces al día
8. ¿Consume normalmente bebidas alcohólicas?
 - A Nunca
 - B Menos de una vez a la semana
 - C 1-2 veces a la semana
 - D 3-4 veces a la semana
 - E Más de 4 veces a la semana
9. ¿Cuántas veces a la semana consume verduras de hoja verde?
 - A Nunca
 - B Menos de una vez a la semana
 - C 1-2 veces por semana
 - D 3-4 veces por semana
 - E Más de 4 veces a la semana
10. ¿Cuántas veces a la semana consume tomate?
 - A Nunca
 - B Menos de una vez a la semana
 - C 1-2 veces por semana
 - D 3-4 veces por semana
 - E Más de 4 veces a la semana
11. ¿Cuántas veces a la semana consume pimiento rojo?
 - A Nunca
 - B Menos de una vez a la semana
 - C 1-2 veces por semana
 - D 3-4 veces por semana
 - E Más de 4 veces a la semana
12. ¿Ha realizado alguna vez alguna dieta para adelgazar?
 - A No
 - B Sí
13. ¿Está realizando en este momento algún tipo de dieta?
 - A No
 - B Sí
14. ¿Consume alimentos funcionales generalmente en su dieta?
 - A No
 - B Sí
 - C Sólo de forma ocasional

DEPARTAMENTO DE FARMACIA



15. ¿Qué tipo de cereales consume en su dieta habitual?
- A Blanco
 - B Integral
16. ¿Cómo es una ración de carne para tí?
- A 1 filete
 - B 2 filetes
 - C Más de 2 filetes
17. Tipo de frutos secos que consume
- A Al natural o tostados sin sal
 - B Fritos y/o con sal
 - C No consumo
18. ¿Cuántos vasos de agua consumes al día?
- A Menos de 4 vasos
 - B Entre 5 u 8 vasos
 - C Más de 8 vasos
19. Consumo de refrescos a la semana
- A De forma ocasional (0 o 1 a la semana)
 - B Algunas veces (entre 2 y 5)
 - C Habitual (casi todos los días)
20. Tipo de zumos consumidos
- A Zumo natural con pulpa
 - B Zumo comercial o natural sin pulpa
 - C No consumo zumos