



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
Departamento de Tecnología de la
Alimentación y la Nutrición

Efecto de una bebida antioxidante sobre
biomarcadores de estrés oxidativo y riesgo
cardiovascular en pacientes con síndrome
metabólico

Autora:

Juana Bernabé García

Directoras:

Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas

Dr. Francisco V. Avilés Plaza

Murcia, Enero de 2014



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES

DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

La Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero, la Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas y el Dr. D. Francisco V. Avilés Plaza como directores de la Tesis Doctoral titulada “Efecto de una bebida antioxidante sobre biomarcadores de estrés oxidativo y riesgo cardiovascular en pacientes con síndrome metabólico” realizada por D^a. Juana Bernabé García en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, autorizan su presentación a trámite dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos para dar cumplimiento a los Reales Decretos 56/2005 y 778/1998, en Murcia a 23 de enero de 2014.

Dra. D^a. Pilar Zafrilla Rentero

Dra. D^a. Juana Mulero Cánovas

Dr. D. Francisco V. Avilés Plaza

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación Campus de Los Jerónimos. 30107, Guadalupe (Murcia) Tno: (+34) 968 27 88 22, Fax: (+34) 968 27 85 78. C.e.: tercerciclo@pdi.ucam.edu

AGRADECIMIENTOS

En el año 2009, terminaba el master en nutrición y tecnología de alimentos que me abría la puerta hacia el camino y el mundo de la investigación. Era fascinante tener la posibilidad de poder adentrarme en ese lugar del que tanto había oído hablar y que era mágico para mí. Tenía ansia de saber, de investigar de hurgar en las entrañas de la Universidad.

Comencé mi periodo docente donde conocí a la Dra. Zafrilla que fue una de mis profesoras durante todos los ciclos formativos, desde primero de carrera, master final y ahora con la dirección de esta Tesis Doctoral. Ella siempre estuvo ahí, ayudándome y orientándome. Ha conseguido que yo pueda llevar a cabo una proeza de juventud cuando empieza el ocaso de mi vida. Gracias Doctora.

Dicen los sabios latinos "*faber est suae quisque fortune*" (cada uno construye su propio destino) y qué razón tenían. Miro estas hojas y no me lo creo: quien me lo iba a decir cuando enferma, muy enferma, empecé mi primer curso en esta Universidad. Todos los días iba hasta la capilla a rezar y pedir fuerzas para seguir y poder terminar lo que con tanta ilusión había empezado. Era muy difícil para mí: me fallaban las fuerzas para seguir las clases, mantener la atención. Las tardes de prácticas se convertían en un suplicio, me resultaban extenuantes dado mi estado de salud, pero yo ahí estaba presente, sin faltar ni a una clase ya fuera teórica o práctica; nunca pensé que podría llegar hasta aquí. Ahora estoy llena de gozo, ilusión y me faltan palabras para dar gracias y más gracias a Dios.

Como todos los principios, los míos fueron muy sufridos: no sabes por dónde andas, ni qué hacer ni decir. Pero como tenía tanta ilusión no me importaba nada, siempre miraba hacia adelante, pensando en la posibilidad de llegar hasta aquí, en el día que estas páginas vieran la luz -el sueño de mi vida- yo que lloraba cuando pasaba por delante de la Universidad de la Merced. Mi deseo de formar parte de la comunidad universitaria era desmesurado; allí estaba la fuente, el saber, la ciencia, todo lo que yo ansiaba, por eso no puedo dejar de dar gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí y así mismo a todas las personas que me han ayudado a conseguirlo.

Deseo agradecer y espero nombrar a todas y cada una de las personas que en mayor o menor medida han sido participes para que este sueño, hoy sea una realidad. Gracias a todos de todo corazón.

Desde estas páginas, quiero expresar mi más sincero y profundo agradecimiento a los directores de esta tesis: a la Dra. Pilar Zafrilla Rentero, por la oportunidad que me ha brindado de realizar esta tesis bajo su extraordinaria dirección y sin la cual no se hubiera podido llevar a cabo, por el cariño y afecto que en todo momento he percibido de ella. Estaré eternamente agradecida. A la Dra. Juana Mulero Cánovas por su eficiente colaboración; desde su discreción siempre ha estado ahí, dispuesta en todo momento. Al Dr. Francisco V. Avilés Plaza, del laboratorio de bioquímica del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia, por su colaboración en las tareas de laboratorio.

A la Dr. Cristina García-Vigueras del Departamento de Investigación del CEBAS que me ofreció la posibilidad de de incorporarme a su proyecto mediante esta Tesis.

Al Dr. José Abellán, médico del Centro de Atención Primaria Dr. Quesada de Murcia, pieza clave para este estudio, al seleccionar a las personas participantes en el mismo.

A todas las personas que se han prestado a participar en dicho estudio, sin ellas esto no habría sido posible. Muchas gracias.

Al ATS Salvador encargado de las extracciones, que siempre estaba dispuesto a primera hora de la mañana.

Al personal del laboratorio de bioquímica de la Arrixaca: Dra. Soledad Parra jefe de sección de análisis clínicos, unidad de bioquímica del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, junto a la que di los primeros pasos en ese menester, nada fácil por cierto, de procesar y almacenar muestras biológicas. Con su ayuda lo conseguí. Al Dr. Avilés, a Ignacio, Mari Carmen, Conchita, Amalia; a todos les estoy muy agradecida por sus palabras de ánimo y colaboración. Siempre los tenía dispuestos para lo que hiciera falta: informática, manejo de aparatos, etc. Gracias a todos, fuisteis un gran apoyo para mí y os recuerdo con cariño.

A la Dra. Albaladejo del Hitachi, por su gran colaboración en el procesado de las muestras de sangre.

Al personal de la UCAM que colaboraron en la recogida de muestras. Dra. Morillas, Dra. Cerdá, y Dra. Mulero.

Al portero del CEBAS, siempre tan amable y dispuesto a cubrir cualquier

necesidad, ya fuera para recibir el furgón que traía la bebida, como para llamarlo y que todo el reparto se llevara a cabo en tiempo y forma.

A aquellos amigos que de manera especial me han apoyado y cuyo ánimo constante ha sido fundamental en los momentos difíciles.

Muy especialmente a mi familia que ha sabido sufrir mis deficiencias: a mi marido Francisco, a mis hijos Elena, Javier y Teresa, a mis nietos Javier y Lidia por los que siento una especial debilidad y a los que con tanto cariño les entrego la antorcha para que sigan.

*Si te faltan médicos, sean tus médicos estas tres cosas:
mente alegre, descanso y alimentación moderada.*

Escuela de Salerno. Siglo X.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

El contenido de esta Tesis Doctoral ha sido parcialmente publicado en los siguientes trabajos:

- Bernabé J, Avilés F, Cerdá B, Mulero J, García-Vigueras C, Leal M, Abellan J, Parra S, Zafrilla MP. Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico, Reunión nacional Sociedad Española de Hipertensión, liga española para la lucha contra la hipertensión arterial, Zaragoza. Marzo; 2010.
- Bernabé J, Zafrilla MP, Mulero J, Avilés F, Cerdá B, Moreno D, Morillas JM, Parra S. Biomarcadores de estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico. Reunión nacional Sociedad Española de Hipertensión, liga española para la lucha contra la hipertensión arterial, Zaragoza. Marzo; 2010.
- Bernabé J, Zafrilla MP, Cerdá B, García-Vigueras C, Moreno D, Parra S, Avilés F, Gil A, Abellán J, Mulero J. Effects of citrus-based functional juice on the markers of oxidative stress in metabolic syndrome patients. FENS, Madrid. Octubre; 2011.
- Mulero J, Bernabé J, Cerdá B, García-Vigueras C, Moreno D, Albaladejo MD, Avilés F, Parra S, Abellán J, Zafrilla MP. Effects of citrus-based functional juice on the markers of oxidative stress in metabolic syndrome patients. FENS, Madrid. Octubre; 2011.
- Mulero J, Bernabé J, Cerdá B, García-Vigueras C, Moreno DA, Albaladejo MD, Avilés F, Parra S, Abellán J, Zafrilla MP. Variations on cardiovascular risk factors in metabolic syndrome after consume of a citrus-based juice. Clinical Nutrition. 2012; Vol. 31, p. 372- 377.
- Bernabé J, Mulero J, Cerdá B, García-Vigueras C, Moreno DA, Albaladejo MD, Avilés F, Parra S, Gil-Izquierdo A, Abellán J, Zafrilla MP. Effects of a citrus based juice on biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome patients. Functional Foods. 2012; Vol. 5, p. 1031-1038.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	35
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	41
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	42
3.1. SÍNDROME METABÓLICO: DEFINICIÓN Y DIAGNÓSTICO.....	44
3.2. FISIOPATOLOGÍA.....	50
3.3. RIESGO CARDIOVASCULAR EN EL SÍNDROME METABÓLICO.....	53
3.3.1. Obesidad y síndrome metabólico.....	53
3.3.1.1. <i>Obesidad, síndrome metabólico e inflamación.....</i>	<i>54</i>
3.3.2. Resistencia a la insulina y síndrome metabólico.....	56
3.3.2.1. <i>Resistencia a la insulina e hipertensión.....</i>	<i>58</i>
3.3.2.2. <i>Otros trastornos asociados a la resistencia a la insulina: hígado graso y dislipemia aterogénica.....</i>	<i>58</i>
3.3.2.3. <i>Estado protrombótico.....</i>	<i>60</i>
3.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	61
3.5. ESTRÉS OXIDATIVO.....	67
3.5.1. Radicales libres. Tipos.....	67
3.5.1.1. <i>Especies reactivas derivadas del oxígeno.....</i>	<i>67</i>
3.5.1.1.1. Oxígeno molecular.....	68
3.5.1.1.2. Oxígeno singlete.....	68

3.5.1.1.3. Radical superóxido.....	69
3.5.1.1.4. Peróxido de hidrógeno.....	70
3.5.1.1.5. Radical hidroxilo.....	71
3.5.1.1.6. Radical perhidroxilo.....	71
3.5.1.1.7. Radicales alcoxilo y perxolilo.....	71
3.5.1.2. <i>Especies reactivas derivadas del nitrógeno</i>	71
3.5.1.2.1. Óxido nítrico.....	71
3.5.1.2.2. Anión peroxinitrito.....	72
3.5.1.2.3. Dióxido de nitrógeno.....	72
3.5.1.3. <i>Radicales de átomos derivados del carbono</i>	72
3.5.1.4. <i>Radicales de átomos derivados del azufre</i>	73
3.5.2. Producción de radicales en los seres vivos	73
3.5.2.1. <i>Fuentes endógenas de radicales libres</i>	73
3.5.2.2. <i>Fuentes exógenas de radicales libres</i>	75
3.5.3. Estrés oxidativo	75
3.5.4. Estrés oxidativo y síndrome metabólico	78
3.5.4.1. <i>Alteraciones en la cascada de señalización de la insulina</i>	79
3.5.4.2. <i>Pérdida en el control de la lipólisis</i>	79
3.5.4.3. <i>Disfunción endotelial</i>	80
3.5.4.4. <i>Disfunción de las células β</i>	82
3.5.4.5. <i>Formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs) y productos de lipoxidación avanzada (ALEs)</i>	82
3.5.5. Sistema de defensa antioxidante	83
3.5.5.1. <i>Clasificación de la acción de los antioxidantes</i>	84
3.5.5.1.1. Antioxidantes enzimáticos.....	86
3.5.5.1.1.1. Catalasa.....	86
3.5.5.1.1.2. Glutación reductasa (GR).....	86
3.5.5.1.1.3. Glutación peroxidasa (GPx).....	86

5.2.1.2.1. Vitaminas.....	122
5.2.1.2.2. Minerales.....	124
6. INFLUENCIA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	128
6.1. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	130
6.1.1. Toma de muestras.....	130
6.1.2. Parámetros bioquímicos.....	130
6.1.2.1. Glucosa.....	130
6.1.2.2. Determinación de lípidos en plasma.....	131
6.1.2.2.1. Colesterol total.....	131
6.1.2.2.2. Triglicéridos.....	132
6.1.2.2.3. Colesterol-HDL.....	132
6.1.2.2.4. Colesterol-LDL.....	133
6.1.2.2.5. Albúmina.....	133
6.1.2.2.6. Homocisteína.....	133
6.1.2.2.7. Proteína C-Reactiva.....	134
6.1.2.2.8. LDL oxidadas.....	134
6.2. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y LA GLUCEMIA DE PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA.....	135
6.3. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL DE PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA.....	141
6.4. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA DE PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA.....	143
6.5. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LA PROTEÍNA C-REACTIVA COMO MARCADOR DE INFLAMACIÓN DE PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA.....	145

7. EFECTO DE UNA BEBIDA SOBRE EL ESTADO ANTIOXIDANTE Y BIOMARCADORES DEL ESTRÉS OXIDATIVO.....	148
7.1. INTRODUCCIÓN.....	150
7.2. OBJETIVOS.....	150
7.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	151
7.3.1. Marcadores del estado antioxidante.....	151
7.3.1.1. Estado antioxidante total.....	151
7.3.1.2. Enzimas antioxidantes.....	152
7.3.1.2.1. Glutación peroxidasa.....	152
7.3.1.2.2. Glutación reductasa.....	153
7.3.1.2.3. Superóxido dismutasa.....	154
7.3.2. Biomarcadores del estrés oxidativo.....	155
7.3.2.1. 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG). Marcador de oxidación al DNA.....	155
7.3.2.2. Grupos carbonilo. Marcadores de oxidación proteica.....	156
7.3.2.3. Isoprostanos. Marcadores de oxidación lipídica.....	156
7.3.2.4. LDL oxidadas.....	157
7.3.2.5. Cociente GSH/GSSG.....	157
7.4. RESULTADOS.....	158
7.4.1. Estado antioxidante.....	158
7.4.1.1. Actividad antioxidante total.....	158
7.4.1.2. Superóxido dismutasa.....	160
7.4.1.3. Glutación reductasa.....	161
7.4.1.4. Glutación peroxidasa.....	162
7.4.2. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	164
7.4.2.1. Isoprostanos.....	164
7.4.2.2. 8-hidroxi-2-desoxiguanosina.....	166
7.4.2.3. Grupo carbonilo.....	166
7.4.2.4. LDL-oxidadas.....	169

7.4.2.5. <i>Glutación reducido/ glutación oxidado (GSH/ GSSH)</i>	170
8. CONCLUSIONES	174
BIBLIOGRAFÍA	178
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO	218
ANEXO 2. COMITÉ DE ÉTICA	221
ANEXO 3. ENCUESTA 24 HORAS	224

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico según distintos organismos.....	45
Tabla 3.2. Características de la resistencia a la insulina.....	48
Tabla 3.3. Cifras del perímetro abdominal según las diferencias étnicas.....	50
Tabla 3.4. Patologías asociadas al síndrome metabólico.....	52
Tabla 3.5. Prevalencia del síndrome metabólico en diferentes países.....	62
Tabla 3.6. Especies reactivas dependientes del oxígeno y nitrógeno.....	68
Tabla 3.7. Principales factores exógenos que incrementan la producción de ERO.....	76
Tabla 3.8. Clasificación de los antioxidantes.....	85
Tabla 4.1. Criterios diagnósticos según el NCEP-ATP III.....	104
Tabla 4.2. Descripción de la muestra poblacional.....	105
Tabla 4.3. Marcadores analizados.....	107
Tabla 4.4. Contenido de flavonas, antocianos, derivados hidroxicinámicos y flavonoles (derivados de quercitina) de la bebida antioxidante.....	108
Tabla 4.5. Composición nutricional de la bebida antioxidante (B).....	109
Tabla 5.1. Descripción de la muestra poblacional.....	117
Tabla 5.2. Ingesta de vitaminas del grupo control y de los pacientes con síndrome metabólico.....	123
Tabla 5.3. Ingesta de minerales del grupo control y de los pacientes con síndrome metabólico.....	126
Tabla 6.1. Valores basales de los parámetros bioquímicos.....	136
Tabla 7.1. Valores de la glutatión reductasa inicialmente y tras el consumo de la bebida (B) o placebo (P).....	162
Tabla 7.2. Valores de la glutatión peroxidasa inicialmente y tras el consumo de la bebida (B) o placebo(P).....	163

SIGLAS Y ABREVIATURAS

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AACE	American Collage of Endocrinology
AAPH	Radical 2, 2-azobis-[2-metilpropionamida] dihidrocloridro
AbPR	Anticuerpo anti Proteína C reactiva
ACV	Accidente cerebrovascular
AGA	Alteración de la glucosa en ayunas
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ADA	Americam Diabetes Asociación
ADN	Ácido dexosiribonucleíco
AGL	Ácidos grasos libres
AGNE	Ácidos grasos no esterizados
AHA	American Heart Association
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ATP III	Adult Treatment Panel III (Panel de tratamiento del adulto)
ATP	Adenosin-trifosfato
BCG	Bromocresol
BRA	Betabloqueantes de angiotensina
CEE	Comunidad Económica Europea
CEERI	Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina
CE	Colesterol esterasa
CHS	Cardiovascular Heart Study
CO	Colesterol oxidasa
DHA	Ácido docosahecanoico
cHDL	Colesterol HDL

DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo2
DNP	Dinitrofenihidracina
DPP	Diabetes prevention program
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTT	Ditiotreitol
EASD	Europeam Association for the Study of Diabetes
ECV	Enfermedad cardiovascular
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EEUU	Estados Unidos
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
EHNA	Esteatosis hepática no alcohólica
EO	Estrés oxidativo
EPA	Ácido eicosapentanoico
EQO	Especies químicas oxidantes
ERCs	Especies químicas reactivas del carbono
ERCLs	Especies químicas reactivas del cloro
ERNs	Especies químicas reactivas del nitrógeno
EROs	Especies químicas reactivas del oxígeno
ERSs	Especies químicas reactivas del azufre
ETDRS	Treadment Diabetic Retinopathy Study
EVCV	Evento cardiovascular
FAO	Food and Agriculture Organization
FL	Fluoresceína
FR	Factor de riesgo
FRCV	Factores de riesgo cardiovascular
GC	Grupos carbonilo
GK	Glicerol kinasa
GLUT- 4	Glucotranportadores

GP_x	Glutation peroxidasa
GPO	Glicerol fosfato oxidasa
GR	Glutation reductasa
GRS	Sustratos proteicos exógenos
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutatóin oxidado
HOMA	Homeostasis model assessment
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HTA	Hipertensión arterial
HUVA	Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca
IC	Intolerancia a los hidratos de carbono
IDF	Internacional Diabetes Federación
IL	Interleuquina
IMC	Índice de masa corporal
IRS	Insulin receptor sustrate
ITG	Índice de trigliceridemia
LDL-c	Colesterol LDL
LDL_{ox}	LDL oxidada
ISA	Actividad simpaticomimetica intrínseca
MDA	Malon-dialdehido
MESYAS	Metabolic syndrome in active subjects
MMg	Modelo mínimo del metabolismo de la glucosa
NCEP	National Cholesterol Education Program
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Oxido nítrico
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
8-OH	8-Hidroxiideoxiguananosina
PA	Presión arterial

PAL-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PC-1	Glicoproteína plasmática
PCK	Proteína C kinasa
PCR	Proteína C reactiva
PEG	Polietilenglicol
PEG-CE	Polietilenglicol-colesterol-esterasa
PO	Peroxidasa
PPAR	Receptor activado de los peroxisomas
RCV	Riesgo cardiovascular
RL	Radicales libres
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDA	Sistema de defensa antioxidante
SOD	Superoxido dismutasa
SEEDO	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
SEE	Sociedad Española de Epidemiología
SM	Síndrome metabólico
TAS	Estado antioxidante total
TAG	Triacil-glicéridos
TG	Triglicéridos
TMB	Tetrametilbencidina
TNFα	Factor de necrosis tumoral
UCAM	Universidad Católica de San Antonio
UCPI	Proteína desacoplante de la termogénesis
Ug/Hg	Unidades gramo de hemoglobina
U/L	Unidades litro
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico conocido también como síndrome plurimetabólico, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X, es una entidad clínica controvertida que aparece con amplias variaciones fenotípicas, en personas con una predisposición endógena, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales. Representa un problema de salud pública a nivel mundial.

El síndrome metabólico se caracteriza por la presencia de insulinoresistencia con hiperinsulinismo compensador asociado a trastornos del metabolismo hidrocarbonado, cifras elevadas de presión arterial, alteraciones lipídicas, hipertrigliceridemia, descenso del colesterol HDLc, aumento del colesterol LDL, aumento de ácidos grasos libres, lipemia postprandial y obesidad, con un incremento de la morbimortalidad de origen aterosclerótico. No se trata de una simple enfermedad, sino de un grupo de factores de riesgo, asociados al estilo de vida, como la sobrealimentación y la ausencia de actividad física; de forma que un exceso de grasa corporal (particularmente abdominal) y la inactividad física favorecen al desarrollo de insulinoresistencia.

Dentro de los sistemas de criterios diagnósticos, el primero fue el propuesto por la OMS, seguido por el elaborado por el National Cholesterol Education Program en su Adult Treatment Panel III (ATP III) el cual es ampliamente aceptado y empleado en la mayoría de los trabajos por su sencillez y efectividad demostrada.

El estrés oxidativo se ha relacionado con diversos procesos fisiopatológicos que ocurren en el síndrome metabólico, tanto en su génesis como en el proceso aterogénico. Se produce cuando se altera el balance entre los mecanismos antioxidantes y la producción de moléculas pro-oxidantes. El estrés oxidativo estimula la producción de citoquinas (interleucina 6, interleucina 8, interleucina 18, factor de necrosis tumoral $-\alpha$) que inician una respuesta inflamatoria y con ello una alteración en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

Se sugiere que el incremento en la secreción de pro-oxidantes es el responsable de la generación de resistencia a la insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo y de la alteración en la secreción de insulina por las células pancreáticas. La acumulación de moléculas prooxidantes en el organismo

causan daño e inducen la activación de vías específicas, ambos procesos conllevan la proliferación, disfunción, adaptación o muerte celular.

Las especies reactivas de oxígeno son capaces de oxidar macromoléculas biológicas como son las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, generándose otros radicales libres que ocasionan daño, envejecimiento y muerte celular, principalmente del endotelio vascular. La comprensión de los eventos que participan en la aparición y progresión del estrés oxidativo facultan el diseño de estrategias de prevención y de tratamiento específico dirigidos a su control en individuos con mayor riesgo y pacientes en etapas tempranas de la enfermedad.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de una bebida con zumo de limón y aronia (bebida antioxidante), sobre el estado antioxidante, biomarcadores de estrés oxidativo y marcadores de inflamación en pacientes con síndrome metabólico y comparar los resultados con los obtenidos en un grupo control.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una valoración nutricional a pacientes con síndrome metabólico, comparados con un grupo control.
- Analizar el estado antioxidante, los biomarcadores de estrés oxidativo y los marcadores de inflamación en estos pacientes, comparando los resultados con los obtenidos en un grupo control.
- Analizar el efecto de una bebida antioxidante (bebida con zumo de limón y aronia) sobre el perfil lipídico y la glucemia en pacientes con síndrome metabólico respecto a un grupo control.
- Analizar el efecto de una bebida antioxidante sobre marcadores de inflamación (homocisteína y proteína C reactiva) en pacientes con síndrome metabólico y comparar los resultados con un grupo control.
- Analizar el efecto de una bebida con zumo de limón y aronia en el estado antioxidante (actividad de la enzima superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y actividad antioxidante total) en pacientes con síndrome metabólico y comparar los resultados con un grupo control.
- Analizar el efecto de la bebida antioxidante sobre biomarcadores de estrés oxidativo (isoprostanos, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, grupos carbonilo, LDL-oxidadas) y comparar los resultados con los obtenidos en un grupo control.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. SÍNDROME METABÓLICO: DEFINICIÓN Y DIAGNÓSTICO

El síndrome metabólico (SM) no es una enfermedad nueva en el mundo. Fue descrito en la década de 1920 por Kylin, un fisiólogo sueco, que lo definió como el resultado de la asociación entre hipertensión, hiperglicemia y enfermedad de gota. Más tarde, en 1947 Vague se refirió a la acumulación de grasa en la parte superior del cuerpo (obesidad tipo androide) relacionándola con la posterior aparición de anormalidades metabólicas en pacientes con diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular. Años después, fue Reaven quien introduce el concepto de síndrome X al identificar un grupo de anomalías metabólicas junto a la resistencia a la insulina (RI) como las causantes de este síndrome. Esta nueva definición, sin embargo, no quiso considerar la obesidad como un factor importante (1).

En la actualidad se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas constituidas por obesidad de distribución central, disminución de las concentraciones de colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), elevación de las concentraciones de triglicéridos, aumento de la presión arterial (PA) e hiperglucemia (2).

El síndrome metabólico se caracteriza por la presencia de resistencia a la insulina junto a un hiperinsulinismo compensador. La existencia del síndrome metabólico como una entidad nosológica aislada es materia controvertida, según la etiología común del síndrome, pero la mayor evidencia habla del papel central de la RI (3,4). Son varias las asociaciones que han propuesto criterios para el diagnóstico del síndrome metabólico, como aparece en la Tabla 3.1.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998 introdujo el síndrome metabólico en la práctica clínica, enfatizando el papel central de la resistencia a la insulina, para cuyo diagnóstico, aunque es difícil valorar en la práctica clínica, se aceptaron evidencias indirectas como la alteración de la glucosa tras carga y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). De este modo, según los criterios OMS, para diagnosticar el síndrome metabólico el paciente debe mostrar marcadores de resistencia a la insulina, más dos factores de riesgo adicionales de los que se

incluyen a continuación; obesidad, medida por el índice de masa corporal (IMC) y/o relación cintura-cadera, hipertensión, hipertrigliceridemia, bajos niveles de colesterol-HDL y microalbuminuria (5).

Tabla 3.1. Criterios para el diagnóstico del SM según distintas organizaciones

Criterios del síndrome X (Según Reaven)	
Criterios del Síndrome X	
Resistencia a insulina	
Tolerancia alterada a la glucosa o DM2	
Obesidad de predominio central	
Hipertensión arterial	
Estado pro-coagulante	
Dislipemia aterogénica	
Criterios diagnósticos según la OMS	
Criterios Principales	
Resistencia a la insulina	
Intolerancia oral a la glucosa y/o	
Diabetes mellitus tipo 2	
Criterios Menores	
Hipertensión arterial: PA \geq 140/90 mmHg	
Índice de masa corporal \geq 30 kg/m ² . Cintura > 90 cm en hombres y > 85 cm en mujeres	
Hipertrigliceridemia > 150 mg/dL. HDLc < 35 (hombres) y < 39 (mujeres) mg/dL	
Cociente albúmina creatinina > 30 mg/g	
Excreción urinaria de albúmina 20-199 mg/L o 30-299 mg/L	

Criterios diagnósticos según el EGIR

Criterios Principales

Resistencia a la insulina (necesaria)

Insulina basal: > percentil 75

Además dos de estos factoresPerímetro de cintura: ≥ 94 cm en hombres, ≥ 80 cm en mujeresTriglicéridos: ≥ 180 mg/dL. HDLc < 40 mg/dLPresión arterial: $\geq 140/90$ mmHg o tratamiento específicoGlucemia basal en plasma: ≥ 110 , sin llegar al rango diabético

Criterios diagnósticos según el NCEP-ATP III

Diagnóstico: tres o más criterios

Obesidad abdominal:

Perímetro abdominal: >102 cm (hombres) / > 88 cm (mujeres)

Dislipidemia:

Hipertrigliceridemia: triglicéridos ≥ 150 mg/dLColesterol-HDL: < 40 mg/dL (hombres) / < 50 mg/dL (mujeres)Presión arterial: $\geq 130/85$ mmHgGlucemia basal en plasma: ≥ 110 mg/dL

Criterios según la IDF

Diagnóstico: Obesidad central + dos o más de los siguientes factoresObesidad central: ≥ 94 cm (hombre) / ≥ 80 cm (mujer) europeosTriglicéridos: ≥ 150 mg/dL o tratamiento específico; HDLc < 40 mg/dL (hombres) / < 50 mg/dL (mujeres) o tratamiento específicoHipertensión arterial: $\geq 130/85$ mmHg o tratamiento específico

Glucemia basal en plasma: 100 mg/dL o diagnóstico previo DM2

En 1999 el European Group for Study of Insulin Resistente (EGIR) propuso sus propios criterios. Este grupo introduce como necesaria la demostración de la resistencia a la insulina para el diagnóstico de síndrome metabólico, con medición de niveles plasmáticos de insulina mayores al percentil 75, junto con otros dos factores que incluyen obesidad central medida por perímetro abdominal, hipertensión, hipertrigliceridemia, c-HDL bajo, estados pre-diabéticos, alteración de la glucosa en ayunas (AGA) y/o intolerancia a los carbohidratos (IC). Una diferencia importante con el grupo de la OMS es que excluyen a los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (4).

En 2001 el Nacional Cholesterol Education Progran (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III) introdujo sus propios criterios para diagnosticar el síndrome metabólico. El panel no hizo necesaria la demostración directa de la resistencia a la insulina ni regló la presencia de un factor único para el diagnóstico, pero estableció la existencia de tres factores de los cinco que incluyen:

1. Obesidad abdominal medida por perímetro abdominal
2. Hipertrigliceridemia, niveles de c-HDL bajos
3. PA elevada $\geq 130/85$ mmHg (no necesariamente en rango de HTA)
4. Glicemia elevada
5. Diabetes mellitus

En la definición inicial de 2001, del NCEP, el punto de corte de la glicemia para ser criterio de síndrome metabólico es de 110 mg/dL (6.1 mmol/L). La federación internacional de la diabetes (IDF) más recientemente fija sus reglas, con la finalidad de unificar las bases y plantea el hecho diferencial de establecer los diversos perímetros de cintura según los criterios geográficos de los distintos continentes (6).

En 2003 la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) modificó los criterios del panel ATP III, para rescatar el papel central de la resistencia a la insulina y de nuevo denominó al síndrome como síndrome de resistencia a la insulina, al igual que el grupo EGIR (4).

En la propuesta de la AACE se vuelve por tanto al requisito

necesario de la resistencia a la insulina para el diagnóstico de síndrome metabólico y no se establecen unos criterios mínimos por cumplir sino que se deja al juicio clínico del médico. Estos criterios incluían:

- Sobrepeso-obesidad definida por un IMC > 25
- Hipertrigliceridemia
- Niveles de c-HDL bajos
- PA elevada \geq 130/85 mmHg
- Glicemia elevada manifestada por la alteración de glucosa en ayunas (AGA) o intolerancia a los hidratos de carbono (IC)

No se incluye diabetes mellitus tipo 2 ni otras características asociadas a la resistencia a la insulina (Tabla 3.2.). Según la AACE una vez que se hace el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 no se puede aplicar el término de síndrome de resistencia a la insulina.

Tabla 3.2. Características de la resistencia a la insulina.

Historia familiar de DM2, HTA o ECV
Síndrome de ovario poliquístico
Sedentarismo
Edad avanzada (> 40 años)
Pertenencia a grupos étnicos susceptibles de DM2 (no caucásicos)
Historia de AGA y/o IC o diabetes gestacional
Diagnostico de ECV, HTA, acetosis nigricans o esteatosis hepática no alcohólica

En 2004 la American Diabetes Association modifica los criterios del NCEP de 2001 y mueve el punto de corte para la glicemia de 110 a 100 mg/dL (5.6 mmol/L). Como actualmente no existen unas bases diagnósticas unánimemente consensuadas, desde una posición clínica y práctica y por ser los más extendidos, se ha dado prioridad a los criterios propuestos por el NCEP-ATP III, que resultan los de más fácil aplicación, estando basados en

datos clínicos y analíticos sencillos y prácticos, con posibilidad de ser obtenidos en Atención Primaria (3).

En el año 2005 la IDF publicó sus propios criterios. Este grupo marca como criterio necesario la obesidad, considerando importante el perímetro abdominal por su alta correlación con la resistencia a la insulina, sumando además dos de los siguientes criterios:

- Hipertrigliceridemia
- HDL bajo
- PA elevada $\geq 130/85$ mmHg
- Glicemia > 100 mg/dL
- Diabetes mellitus

En el año 2005 la American Heart Association (AHA) y el National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) publicaron sus criterios para el diagnóstico del SM, muy similares a los del ATPIII, por considerarlos prácticos en la clínica diaria y por el gran número de estudios que había evaluado este panel.

Según la AHA los pacientes debían cumplir con tres de cinco criterios (obesidad central medida por perímetro abdominal, hipertrigliceridemia o en tratamiento farmacológico, HDL bajo o en tratamiento farmacológico, PA elevada $\geq 130/85$ ó con anti-hipertensivos, glicemia basal elevada ó en tratamiento farmacológico para hiperglicemia) para ser diagnosticados como síndrome metabólico (5).

En este documento se reconocen las diferencias étnicas para la obesidad abdominal (Tabla 3.3.). Así se considera que la población con perímetro abdominal limítrofe (hombres 94-102 cm y mujeres 80-88 cm) pueden presentar características de resistencia a la insulina como la presencia de diabetes mellitus tipo 2 en familiar de primer grado de comienzo en 60 años, síndrome de ovario poliquístico, hígado graso, proteína C reactiva (PCR) > 3 mg/dL, microalbuminuria, glicemia post-carga alterada o Apo B elevada (7).

Tabla 3.3. Cifras de perímetro abdominal según diferencias étnicas

Grupo étnico/región	Género	Perímetro abdominal (cm)
Europeos	Hombres	≥ 94
	Mujeres	≥ 80
EUA	Hombres	≥ 102
	Mujeres	≥ 88
Asia sudeste/chinos	Hombres	> 90
	Mujeres	≥ 80
Latinoamericanos	Hombres	> 90
	Mujeres	≥ 80

El diagnóstico precoz del síndrome metabólico debe ser un objetivo prioritario de los profesionales sanitarios para reducir la morbilidad y mortalidad por enfermedad cardiovascular.

En Atención Primaria es importante considerar los datos antropométricos y bioquímicos que permiten detectar estadios iniciales del síndrome metabólico.

Las medidas antropométricas simples, como la medición de la circunferencia de la cintura, que sólo requiere una cinta métrica y un fácil adiestramiento a tal efecto, aportan al clínico una información de gran valor diagnóstico. Un aumento del perímetro de la cintura, hipertrigliceridemia y valores elevados de Apo B, son importantes en la clínica para valorar el estado de riesgo cardiovascular individual (8).

Cuando los valores de los parámetros referidos anteriormente sean indicativos de un probable cuadro de RI, el médico de familia debe realizar una interconsulta multidisciplinar con los distintos especialistas (cardiología, endocrinología, etc.) para la valoración diagnóstica del síndrome metabólico, y en particular de las consecuencias vinculadas a la eventual existencia de RI (9).

3.2. FISIOPATOLOGÍA

El síndrome metabólico constituye una condición patológica de riesgo múltiple para el desarrollo de enfermedad cardiovascular de origen

aterosclerótico. Los componentes del síndrome metabólico son la dislipemia aterogénica hipertrigliceridemia, cifras patológicamente bajas de HDL-c en plasma y niveles plasmáticos elevados de lipoproteínas ricas en apolipoproteína B, elevación de la presión arterial y la glucemia plasmática, y un estado protrombótico y proinflamatorio (10, 11).

Las alteraciones genéticas que afectan a determinados componentes del síndrome metabólico suelen ser responsables a lo largo de la evolución de la patología de las diferentes expresiones del mismo. El síndrome metabólico se asocia frecuentemente con otras condiciones patológicas, principalmente esteatosis hepática, cálculos biliares de colesterol, síndrome de apnea obstructiva del sueño, gota, depresión y poliquistosis ovárica (Tabla 3.4.).

Una gran mayoría de individuos que cumplen criterios de síndrome metabólico presentan un cuadro de resistencia a la insulina, lo que les predispone a desarrollar prediabetes o DM2. La obesidad y la inactividad física pueden ser consideradas como causa inicial determinante del síndrome metabólico. Sin embargo, son necesarias una serie de anomalías metabólicas para que el síndrome metabólico sea evidente. Todas estas anomalías o susceptibilidades comprenden alteraciones del tejido adiposo manifestadas de forma típica por la obesidad abdominal, factores genéticos, raciales, desórdenes endocrinos y envejecimiento (12).

Se sugiere que el aumento de los ácidos grasos puede provocar disminución de la captación periférica de glucosa al inhibir la unión de los glucotransportadores (Glut-4) a la membrana celular, disminuye la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas (efecto lipotóxico) y se lleva a cabo un aumento de la síntesis de triglicéridos hepáticos y VLDL, que condicionan la generación de LDL pequeñas y densas (13).

Un estudio longitudinal reciente alude a una correlación positiva entre la presencia de factores socio ambientales, como el estrés crónico y la depresión, con la aparición posterior del síndrome metabólico. También hay otros aspectos importantes relacionados con el síndrome metabólico, como son la enfermedad inflamatoria y la posible participación del sistema inmunológico en esta patología. Dentro de los factores fisiopatológicos del síndrome metabólico podríamos clasificar dos grupos: a) los metabólicos (obesidad, DM2, dislipemia,

hiperglucemia) y b) los no metabólicos (hipertensión arterial, inflamatorios y protrombóticos) (14, 15).

Tabla 3.4. Patologías asociadas al síndrome metabólico

Sistema afectado	Patología
Endocrinas/Metabólicas	Prediabetes Diabetes mellitus tipo 2 Resistencia insulínica Dislipemia Síndrome de ovario poliquístico
Cardiovasculares	Hipertensión arterial Enfermedad coronaria Insuficiencia cardiaca congestiva Arritmias Hipertensión pulmonar Ictus isquémico Enfermedad tromboembólica venosa
Gastrointestinales	Litiasis biliar Pancreatitis Esteatohepatitis y cirrosis hepática Reflujo gastroesofágico
Musculoesqueléticas	Osteoartritis Gota
Ginecológicas	Alteraciones menstruales Infertilidad
Genitourinarias	Incontinencia urinaria
Oftalmológicas	Cataratas
Neurológicas	Pseudotumor cerebral
Oncológicas	Cáncer de esófago, colon, vesícula biliar, próstata, mama, útero, cérvix, riñón
Respiratorias	Síndrome de apnea obstructiva del sueño Síndrome de hipoventilación

3.3. RIESGO CARDIOVASCULAR EN EL SÍNDROME METABÓLICO

Los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) son signos biológicos o hábitos adquiridos que se presentan con mayor frecuencia en pacientes con una determinada enfermedad. Las características principales de un factor de riesgo son la relación independiente y cuantitativa con la enfermedad y la existencia de un mecanismo causal que explique la enfermedad.

La enfermedad cardiovascular tiene origen multifactorial y es un factor de riesgo que se debe considerar en el contexto de los otros factores del síndrome metabólico. El riesgo cardiovascular determina la probabilidad de padecer una enfermedad cardíaca en un determinado periodo de tiempo, generalmente entre 5 o 10 años y existen diferentes escalas para la estratificación de ese riesgo.

Los factores de riesgo cardiovascular se dividen en dos grandes grupos:

1. No modificables (edad, sexo, antecedentes familiares)
2. Modificables (tabaquismo, diabetes, obesidad, hipertensión arterial, e hiperlipemia)

En el síndrome metabólico aumenta el riesgo cardiovascular, es posible que este riesgo se deba a la suma de factores ya que cada uno de ellos constituye un riesgo independiente (16).

3.3.1. Obesidad y síndrome metabólico

La obesidad es un problema sanitario de primer orden y es el trastorno nutricional más frecuente en los países desarrollados. Aunque la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de DM2 y resistencia a la insulina y un factor de riesgo significativo que eleva el riesgo cardiovascular, no todos los pacientes obesos son insulinoresistentes ni tienen alto riesgo de DM2 o enfermedad cardiovascular (17).

Esto explica porqué la obesidad ha sido considerado un factor de riesgo modificable al igual que la HTA, dislipemia o el tabaquismo. Así mismo el grupo de individuos con un exceso selectivo de tejido adiposo intraabdominal o visceral, se encuentran en una situación de riesgo cardiovascular sustancialmente notable al tener mayor probabilidad de presentar síndrome metabólico (18, 19).

Aunque el exceso de grasa visceral se relaciona con diversas alteraciones aterogénicas y diabetogénicas, existe debate sobre si la obesidad abdominal es un factor causal o simplemente el marcador de un perfil dismetabólico. Al evaluar la fisiopatología de la obesidad visceral observamos que el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados o libres (AGL) puede contribuir al estado de resistencia a la insulina que presenta este colectivo. Los adipocitos hipertróficos intraabdominales se caracterizan por un estado de lipólisis volviéndose resistentes al efecto antilipolítico de la insulina (20, 21).

El flujo resultante de AGL hacia la vía hepática puede generar un aumento de gluconeogénesis. Se ha propuesto que la elevación de AGL puede ser el estímulo para la secreción de insulina y podría tener un papel crucial en la etiología de la resistencia a la insulina, particularmente en lo que concierne al metabolismo hepático de los carbohidratos y los lípidos. La resistencia insulínica hepática se asocia con una reducción de la degradación de las moléculas de Apo B y un aumento de la producción de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Sin embargo existen otros factores que ayudan a explicar estas alteraciones del perfil metabólico de los pacientes con obesidad abdominal (22).

3.3.1.1. Obesidad, síndrome metabólico e inflamación

Aunque se había considerado al tejido graso como un depósito de células pasivo, diversas evidencias han demostrado que el tejido adiposo no solo tiene como función el almacenamiento y movilización de grasas, sino que se debe considerar un importante órgano endocrino que tiene la capacidad de liberar, entre otras, numerosas citoquinas, moléculas inflamatorias como la interleuquina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Estas citoquinas pueden ser la base de varios de los componentes de la resistencia a la insulina, de una disfunción endotelial y de un potencial riesgo cardiovascular. Los pacientes obesos presentan infiltración por macrófagos en el tejido adiposo, que podría contribuir al perfil proinflamatorio que presentan (23, 24).

Es evidente que el adipocito tiene un papel importante en las manifestaciones clínicas de la resistencia a la insulina. Se han identificado una gran variedad de sustancias bioactivas producidas por el adipocito, como son leptina, adiponeptina, resistina, factor de necrosis tumoral alfa, proteína C

reactiva, renina y angiotensinógeno; a través de las cuales el adipocito tiene un papel protagonista en el desarrollo de la resistencia a la insulina y en la enfermedad vascular.

El nivel plasmático de proteína C reactiva -marcador inflamatorio considerado predictor de riesgo de cardiopatía isquémica-, está elevado en los pacientes con obesidad abdominal. La PCR es un reactante de fase aguda que aumenta en el plasma en estados de inflamación crónica subclínica, puede disminuir la angiogénesis, favorecer la apoptosis de las células endoteliales, disminuir la supervivencia y diferenciación de dichas células endoteliales, progenitoras, e incrementar la expresión en el endotelio de las moléculas de adhesión (24, 25).

Actualmente la PCR se considera un excelente marcador de predicción de SM y riesgo cardiovascular, con independencia de la edad, tabacosis, obesidad, presión arterial, perfil lipídico o etnia. Todos los componentes del síndrome metabólico recogidos en la definición ATP III se asocian a niveles elevados de PCR en plasma, lo que hace de esta molécula un parámetro que puede ayudar a predecir y cuantificar el riesgo de enfermedad cardiovascular, útil en la consulta de Atención Primaria: < 1mg/L -indicativo de riesgo bajo-, 1-3 mg/L -riesgo moderado-, > 3 mg/L -riesgo alto-. Debe considerarse que los puntos de corte de estos parámetros están sometidos a una variabilidad étnica (26, 27, 28).

El TNF- α sintetizado y liberado por el músculo esquelético, el cardíaco, y el tejido adiposo, por un lado es capaz de inhibir en el adipocito la actividad y la expresión de la lipoproteinlipasa, y por otro favorece la activación de la insulina a través de la fosforilación de la molécula de serina del receptor de insulina. El TNF- α aumenta la lipólisis y favorece el desarrollo de la RI porque interfiere en la vía de señalización de la insulina y en la actividad del sustrato receptor estimulado por la insulina (IRS-1).

La IL-6 es un importante marcador de infección y estados inflamatorios, actúa como un potente regulador de la producción hepática de PCR y otros reactantes de fase aguda (26).

Sin embargo, el nivel plasmático de adiponectina, polipéptido derivado del tejido adiposo, al contrario que las citoquinas proinflamatorias, está reducido en pacientes con síndrome metabólico (29).

La adiponectina liberada por el adipocito es una citoquina inflamatoria, cuya principal función es estimular la oxidación de ácidos grasos, disminuir los niveles plasmáticos de triglicéridos y mejorar el metabolismo de la glucosa, aumentando la sensibilidad a la insulina. Está involucrada en el control del balance energético, siendo una señal al igual que la leptina de adiposidad (2, 30, 31, 32, 33, 34).

La adiponectina tiene numerosos efectos favorecedores sobre la fisiología metabólica y vascular, mejorando la respuesta a la acción insulínica y generando una protección potencial contra la aterosclerosis. El nivel reducido de adiponectina puede ser un factor favorecedor de los efectos deletéreos metabólicos y aterogénicos, favorecidos por la elevación de la PCR que desarrollan los pacientes con obesidad abdominal (35).

Los pacientes con obesidad abdominal que cumplen criterios de SM tienen elevadas las cifras de la PCR en plasma, acompañadas de IL-6 y TNF- α , mientras que existe un descenso significativo de la concentración de adiponectina (36, 37).

3.3.2. Resistencia a la insulina y síndrome metabólico

La insulina es la principal hormona anabólica del organismo y sus efectos metabólicos afectan al músculo, al tejido adiposo y al hígado. Se cree que la RI es el principal factor patogénico del síndrome metabólico y se define como la pérdida de la respuesta fisiológica de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, produciendo alteraciones metabólicas y hemodinámicas, que predisponen al desarrollo de aterosclerosis y por tanto de enfermedad cardiovascular. Este defecto en la acción de la insulina resulta de una hiperinsulinemia compensatoria para mantener los niveles de glucemia dentro de la normalidad. Así se consigue alcanzar la normogluceemia, aunque prolongado en el tiempo este mecanismo compensador se deteriora y se produce la intolerancia a los hidratos de carbono y diabetes mellitus tipo 2. (38, 39).

El punto inicial de la resistencia a la insulina suele ser el exceso de ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo provenientes del aumento de la movilización de triglicéridos del tejido adiposo sometido a la lipasa, dependiente de adenosín-monofosfato cíclico (AMPc) o a la lipoproteinlipasa (28).

Este aumento de los AGL, no solo inhibe el efecto antilipolítico de la insulina, sino que se altera el sistema de señales que regulan el metabolismo de la glucosa, lo que genera un incremento de los niveles de glicemia. Dichos niveles pueden derivar en las anormalidades que caracterizan el síndrome metabólico. Con frecuencia la resistencia a la insulina progresa a diabetes mellitus tipo 2, la cual incrementa los riesgos de complicaciones cardiovasculares (40, 41, 42).

Aunque el principal factor que contribuye a la resistencia a la insulina es el exceso de AGL circulantes en el torrente sanguíneo, el origen del problema es más complejo. El TNF- α en la obesidad aumenta distorsionando la unión de la insulina a sus receptores por una disminución de la actividad tirosinquinasa que puede alterar la expresión génica de GLUT-4 (43, 44, 45).

Al mismo tiempo va aumentando la producción de insulina como respuesta a la glucosa tanto a corto como a largo plazo, dando lugar a un estado hiperinsulinémico (46, 47).

Los AGL compiten con la glucosa por el denominado mecanismo Randle, su aumento lleva a la hiperglucemia, a su vez se disminuye la captación de glucosa dependiente de la insulina y es aquí donde interviene el mecanismo de toxicidad de la glucosa, estimulado por la elevación de los AGL. De esta manera surgen dos conceptos, glucotoxicidad y lipotoxicidad (48).

Aunque no está claramente definida la patogenia de estos factores moleculares en humanos, empiezan a aparecer claves importantes y todas apuntan a la participación de múltiples factores (3).

El factor más habitual, pero aun no del todo aceptado, es la predisposición genética. A este respecto, previamente se ha demostrado que los polimorfismos en ciertos grupos étnicos de ciertos genes (IRS-1, IL-6, PPrg, PC-1, UCP-2) predisponen a la RI y a la DM2. Estudios epidemiológicos de gemelos, familiares de primer grado en indios americanos afectados indican la importancia de los factores genéticos (4, 5, 6, 7).

La edad avanzada también puede potenciar la resistencia a la insulina. Este efecto se explica en parte por los cambios en la composición corporal que se producen con la edad, como pérdida de masa muscular y aumento del contenido adiposo total y visceral (49).

La reducción de la actividad física que suele acompañar al envejecimiento es un importante factor de riesgo independiente de resistencia a la insulina a cualquier edad. A nivel subcelular se ha observado que la menor síntesis de ATP que se produce por una degradación mitocondrial relacionada con la edad, altera la función de la insulina (26, 27, 28).

3.3.2.1. Resistencia a la insulina e hipertensión

La RI tiene una prevalencia importante entre los pacientes hipertensos y se asocia al daño vascular e HTA. La insulina tiene efectos sobre la presión arterial a través de la estimulación del sistema nervioso simpático y la facilitación de la absorción de sodio a nivel del túbulo contorneado proximal del riñón (50).

También influye sobre la presión arterial a través de la hiperreactividad del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal, aumentando el intercambio de Na^+/H^+ y aumento en la absorción tubular de Na^+ . Existe también una alteración secundaria del músculo liso vascular que tiende a la hipertrofia debido a la acción mitógena de la insulina sobre el transporte iónico a través de las membranas, lo que aumenta los niveles de calcio en el citoplasma (51).

3.3.2.2. Otros trastornos asociados a la resistencia a la insulina: hígado graso y dislipemia aterogénica

La asociación del hígado graso no alcohólico con el SM está sujeto a constantes discusiones en la última década, dado a que la insulina, su órgano diana es al hígado, por lo que cualquier trastorno en la tolerancia de la insulina genera un fuerte impacto en el hígado. Además el detonante fisiopatológico es la obesidad, en especial la de distribución central. De esta manera el hígado graso en individuos obesos está sincronizado con la patogénesis de la obesidad, el SM y la DM2 debido a un efecto sinérgico entre los mediadores proinflamatorios característicos de estas condiciones (3).

El hígado graso se asocia a un aumento en la concentración plasmática de insulina circulante así como de ácidos grasos, lo que genera un aumento de la síntesis hepática de triglicéridos. Aún cuando la fisiopatología de esta enfermedad es confusa, la esteatosis hepática ha sido relacionada al aumento de masa grasa visceral y abdominal, la cual contiene adipocitos con alta actividad

metabólica (lipólisis, lipogénesis). Esto se traduce en que los pacientes producen y liberan cantidades elevadas de ácidos grasos hacia el hígado, generando una mala utilización de la glucosa hepática. Esta condición promueve la oferta de ácidos grasos cuyo destino es la formación de lipoproteínas de baja densidad VLDL, beta oxidación peroxisomal y activación de los receptores activadores de la proliferación de los peroxisomas (PPAR) a nivel nuclear, para inducir la expresión de las enzimas de la beta oxidación (39, 52).

El hígado es afectado por la IR, lo que disminuye el metabolismo de los lípidos, causando acumulo de triacilglicéridos. Todo ello desencadena procesos inflamatorios que conllevan a la fibrosis hepática (28, 38).

La mitocondria del hepatocito es el orgánulo más afectado por esta situación, el exceso de ácidos grasos promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), contribuyendo al proceso de apoptosis y estimulando la fibrosis (citoqueratosis) (4).

Entre los mediadores inflamatorios y humorales implicados con la fisiopatología de la esteatosis hepática están, el FNT- α y la IL-6, además se destaca la hiperleptinemia como consecuencia de la resistencia a la leptina, junto con el descenso de adiponeptina entre otras adipoquinas que son afectadas por el fenómeno de hipertrofia e insulinoresistencia causadas por el tejido adiposo (27).

Estos mediadores fisiopatológicos desencadenan reacciones que alteran el funcionamiento hepático por la oferta de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, incrementando el proceso de filtración grasa y fibrosis del tejido hepático; sin embargo en la obesidad la insulinoresistencia desempeña un rol central en el desarrollo de la misma y al mismo tiempo en la patogénesis de la esteatosis hepática, lo que puede desencadenar problemas importantes como fibrosis e insuficiencia hepática (32, 49).

Los estados de resistencia a la insulina como el síndrome metabólico, están frecuentemente relacionados con una alteración del metabolismo de los lípidos que favorece la dislipemia aterogénica, lo que contribuye a la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular. Estas alteraciones pueden provocar lipogénesis de novo, que al unirse al exceso de ácidos grasos libres exógenos, estimulan la producción hepática de partículas VLDL-c ricas en Apo B (53).

Cuando coexisten niveles elevados de VLDL-c y TG, se produce una

transferencia de TG a LDL-c y HDL-c, haciendo a estas partículas ricas en TG, y se provoca un circuito inverso para generar más moléculas de VLDL-c, por consiguiente las moléculas de VLDL-c se rompen en pequeñas partículas aterogénicas y las moléculas de LDL-c ricas en TG son también lisadas por la lipasa hepática para producir pequeñas partículas densas de LDL-c. Las moléculas de HDL-c ricas en TG son lisadas hacia pequeñas partículas de HDL-c, las cuales son fácilmente transportadas para su excreción renal, reduciendo las partículas de HDL-c libre en plasma. La sobreproducción de VLDL-c subyace bajo el perfil de los factores incluidos en la dislipemia aterogénica del SM y demás situaciones de resistencia insulínica.

La combinación de hipertrigliceridemia, niveles bajos de HDL-c y la presencia de partículas pequeñas densas de LDL-c se ha relacionado con enfermedad cardiovascular (ECV). Especialmente la producción de estas pequeñas moléculas aterogénicas muestra una relación lineal con el riesgo de eventos clínicos adversos. Por estas razones, el análisis de LDL-c en plasma no resulta la medida más exacta para evaluar las partículas aterogénicas en pacientes con SM. Esta situación ha llevado a algunos autores a postular el criterio de colesterol no-HDL o el nivel de ApoB para la estratificación de riesgo cardiovascular (RCV), por incluir la presencia de partículas LDL-c, VLDL-c e IDL-c (54, 55).

3.3.2.3. Estado protrombótico

Este factor de riesgo se caracteriza por una elevación del fibrinógeno, (inhibidor del activador del plasminógeno PAL-1), además de otros factores de la coagulación. El plasminógeno es la globulina que inicia la fibrinólisis, por lo que un aumento en la concentración de su principal inhibidor aumenta el riesgo de ECV de origen trombótico.

La obesidad se asocia a un gran número de anormalidades en la coagulación y en la fibrinólisis que induce a un estado protrombótico. El factor de coagulación, factor de Von Willebrand, (IAP-1) está incrementado en la obesidad y realiza un papel importante en la génesis de las anormalidades vasculares. Este estado protrombótico en el SM está caracterizado por un aumento del IAP-1 y aumento en los niveles plasmáticos de fibrinógeno, siendo estos dos componentes

los más relevantes como factores de riesgo para la aterosclerosis (2, 56, 57).

El IAP-1 es producido por el tejido adiposo, siendo la grasa visceral abdominal la más activa en su síntesis. Igualmente se ha encontrado sobreproducción del IAP-1 por el hígado graso en pacientes con obesidad (35).

El SM parece favorecer la evolución de la enfermedad aterosclerótica en diversos niveles; la elevación de lipoproteínas ricas en Apo B puede promover la aterogénesis e iniciar el desarrollo de lesiones en el árbol vascular (58, 59, 60, 61).

El desarrollo y evolución de la placa de ateroma se encuentra acelerado en presencia de niveles bajos de HDL-c, elevación de la presión arterial, elevación de citoquinas inflamatorias y elevación de la glucemia (62).

Las placas evolucionadas tienden a ser más inestables (lo que las predispone para su rotura) y cuando ocurre el estado protrombótico y proinflamatorio favorecido por el síndrome metabólico promueve la extensión del trombo (63).

3.4. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia del síndrome metabólico a nivel mundial se ha incrementado de manera considerable en los últimos años, constituyendo uno de los principales problemas de salud pública en los diferentes países. De ser una enfermedad prácticamente exclusiva de la edad adulta y con mayor prevalencia en países industrializados, en la actualidad el síndrome metabólico se presenta cada vez en edades más tempranas y con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo. Aunque el origen del síndrome no está claro, evidencias experimentales, epidemiológicas y clínicas, sugieren que es un desorden multifactorial resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales, hormonales y de manera notable inmunológicos.

La OMS propone en 1998 la definición de síndrome metabólico y desde entonces las distintas organizaciones intentan unificar criterios para definirlo. En la actualidad existen diferentes definiciones para el síndrome metabólico, como ya se comentó anteriormente, en función de los componentes asociados, lo que conlleva a confusión y ausencia de consenso. Cualesquiera que sean los criterios utilizados, la prevalencia del SM en el mundo es muy elevada aunque varía según

el criterio diagnóstico que se utilice, condiciones geográficas, socioculturales, edad, raza y género. (Tabla 3.5.) (64).

Tabla 3.5. Prevalencia del SM en diferentes países.

ESTUDIO	SHARE	NHANES III	SAN ANTONIO HS	FRAMINGHAM OS	BOTINIA	MONICA
País	CANADA	EEUU	EEUU	EEUU	Finlandia/ Suecia	Francia
Año publicación	2003	2004	2003	2003	2001	2004
Rango edad (años)	35-75	>20	30-79	30-79	30-70	30-65
Nº sujetos	1276	6436	4315	3224	4483	4607
Criterio	ATPIII	ATPIII	ATPIII/OMS	ATPIII/OMS	OMS	OMS/EGIR
Prevalencia global (%)	25.5	23.7	23/20.95	24.15/24.2	12.5	23.5/16.4
Prevalencia en hombres (%)	27.3	24	24.7/24.7	26.9/30.3	15	23.5/16.4
Prevalencia en mujeres (%)	23.7	23.4	21.3/17.2	21.4/18.1	10	9.67710

El mayor estudio sobre la prevalencia del desarrollo del síndrome metabólico en los últimos años fue llevado a cabo por el National Center for Health Statics, en EEUU (NHANES III), donde se hallaron prevalencias globales del 24%, siendo similar en hombres y mujeres, con valores del 6,7% en sujetos con edades comprendidas entre 20 y 29 años y el 43,5% en edades entre 60 y 69 años, marcando la más elevada en individuos latinos (4, 5, 11).

Un estudio realizado en 2002 por Ford y col. (5) sobre RI, utilizando tanto la definición de la OMS como la del National Cholesterol Educación Program Adult Treatment Panel (NCEP/ATP III), observó una prevalencia del 34,1% utilizando la definición de la OMS, y del 26,9% con la definición del NCEP/ATP III (5).

En Europa, y siguiendo los criterios de la OMS (excluyendo pacientes

diabéticos), la prevalencia global de SM es del 23%, en hombres se posiciona entre los límites del 7 y el 33% según edad, y en mujeres en un 12% con límites entre el 5 y 22% para edades de 40 a 45 años.

En 2006, Gogia y col. muestran variaciones en la prevalencia del síndrome metabólico entre las que destacan países como India (8% en hombres y 16% en mujeres), Francia (entre el 7% y el 12%), Japón (13%), China (41%), Marruecos (16%), España (19%, aumentando al 41% en pacientes con cardiopatías isquémicas, entre 40% y 64% en pacientes con intolerancia a la glucosa, entre el 78% y el 84% en pacientes con DM2), Grecia (24%), Turquía (33%), Maorí -Nueva Zelanda- (53%), y Corea (29%) (6, 49).

La presencia de síndrome metabólico aumenta con la edad en todas las poblaciones estudiadas. Comparando resultados de estudios realizados en Norteamérica con otros realizados en España, podemos observar como la prevalencia del síndrome metabólico, según la definición de la ATPIII, va aumentando con la edad de forma similar en ambos casos, hallando una prevalencia de 39% en la población americana (edades entre 70-79 años), y en la española de 46.2% (edades entre 65-74 años) (64, 65, 66).

En España los datos referentes al síndrome metabólico no son abundantes y se cuenta con pocos estudios de seguimiento. Uno de los primeros datos fue aportado por la Encuesta Nutricional de Canarias, sobre 578 adultos con edades entre 18 y 74 años. La prevalencia de síndrome metabólico fue datada en el 24,4%, sin diferencias entre sexos.

Comparados los datos de la cohorte española, con los de la de San Antonio Heart Study, observamos que la prevalencia de síndrome metabólico en varones es superior en la cohorte americana (28,9% vs. 20,8%), mientras las mujeres españolas presentan mayor prevalencia de síndrome metabólico respecto de las americanas (30,9% vs. 27,1%). Además los autores muestran que la obesidad, y especialmente el perímetro abdominal, explican estas diferencias y advierten que el aumento de la obesidad en ambos países conducirá al incremento de la prevalencia del síndrome metabólico. Estos datos coinciden con los del último informe de la SEEDO, en que la obesidad es más prevalente en mujeres (15,75% vs. 13,39%) (67)

La Sección de Cardiología Preventiva, de la Sociedad Española de

Cardiología, promovió el Registro Nacional de Síndrome Metabólico (Registro MESYAS: Metabolic Syndrome in Active Subjects) con la idea de analizar la prevalencia de síndrome metabólico en una amplia muestra española. En el mismo se han incluido sujetos laboralmente activos para abarcar la franja de edad en la que tienen mayor incidencia las enfermedades cardiovasculares.

Los primeros resultados muestran una prevalencia global de síndrome metabólico es del 10.2% (7.256 trabajadores estudiados). La prevalencia ajustada a la edad y al sexo es del 5,8%, significativamente superior en varones (8,7%) que en mujeres (3,0%).

Todos los componentes del síndrome metabólico son significativamente más prevalentes en varones, excepto el criterio de valores bajos de lipoproteínas de alta densidad HDL, que corresponde a las mujeres.

En mayo del 2005 la prevalencia global del síndrome metabólico en España fue del 12% (16% en varones y 8% en mujeres). Existen diferencias en la distribución geográfica del SM, con menor prevalencia en las regiones del norte de España (Figura 3.1.).

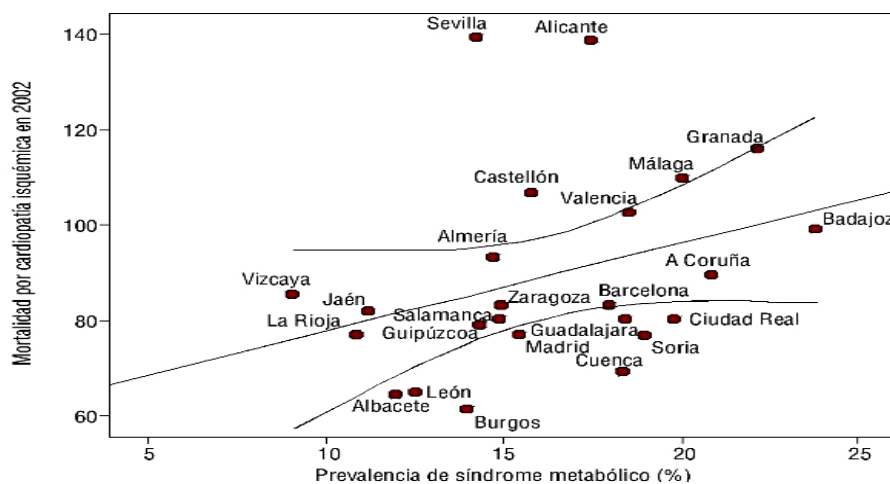


Figura 3.1. Asociación entre la prevalencia de SM en provincias españolas (%) y la mortalidad por cardiopatía isquémica (67).

La mitad de los pacientes con síndrome metabólico presenta una tríada de criterios: presión arterial elevada, hipertrigliceridemia e índice de masa corporal elevado en el caso de los varones e índice de masa corporal elevado, colesterol

HDL bajo y presión arterial elevada en el caso de las mujeres (67).

Los valores del estudio DARIOS (2012) indican que la prevalencia del síndrome metabólico en España es del 31% (25% al 33% en mujeres, 29% al 35% en varones), lo que duplica los datos encontrados en 2005. (Figuras 3.2., 3.3., 3.4., 3.5.) (68).

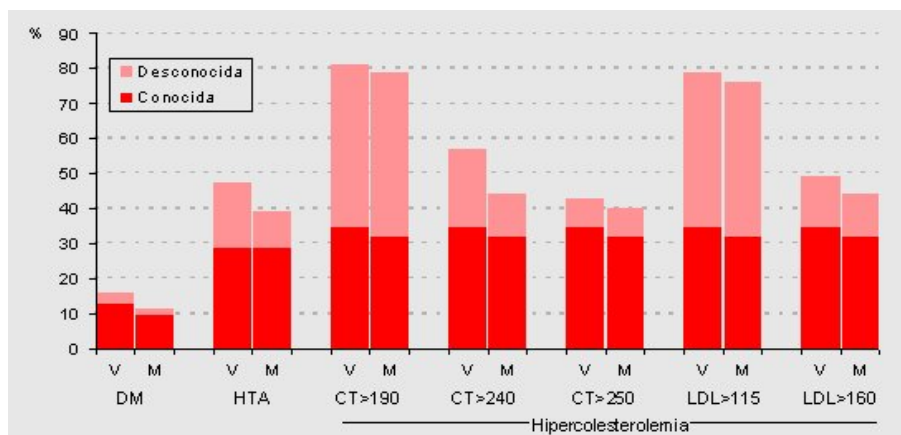


Figura 3.2. Prevalencias estandarizadas reales y conocidas de diferentes factores de riesgo.

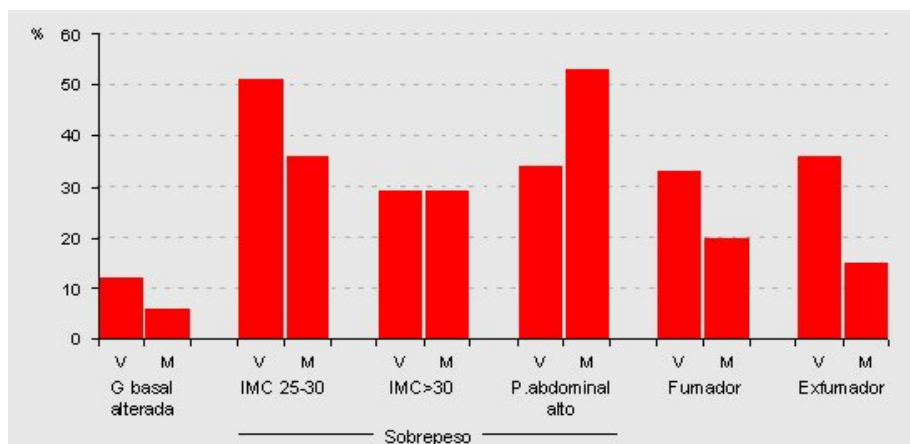


Figura 3.3. Prevalencias estandarizadas conocidas de diferentes factores de riesgo, en pacientes con sobrepeso.

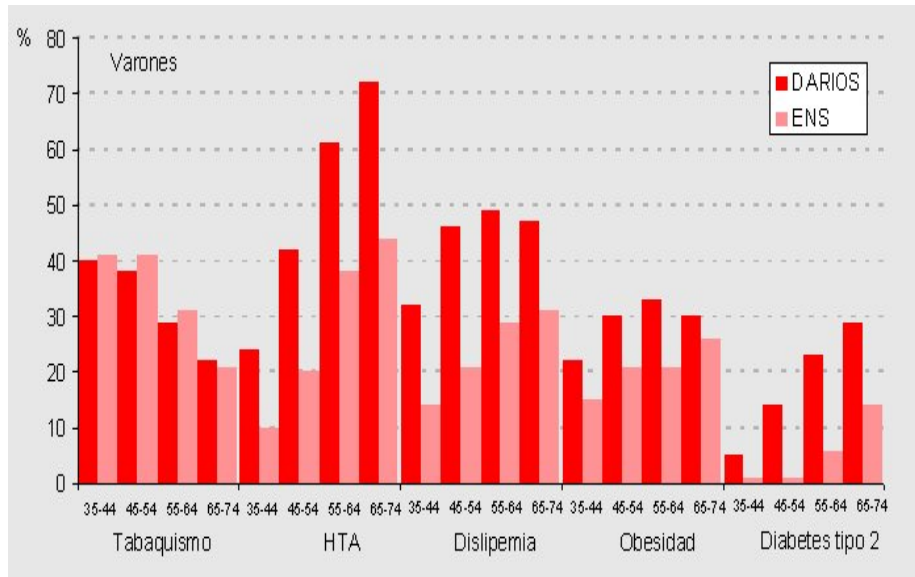


Figura 3.4. Prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en varones observados en el estudio DARIOS y en la ENS 2006.

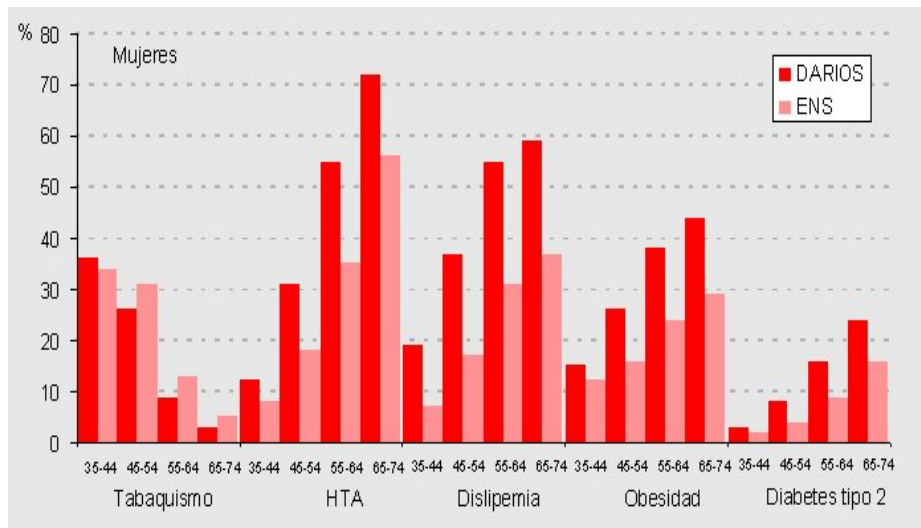


Figura 3.5. Prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en mujeres observados en el estudio DARIOS y en la ENS 2006.

3.5. ESTRÉS OXIDATIVO

3.5.1. Radicales libres. Tipos

Un radical libre (RL) es una especie química (átomo, molécula o parte de ésta) capaz de existir de forma independiente, pudiendo tener uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo.

Los electrones tienden a estar emparejados en su orbital correspondiente, para conseguir una configuración lo más estable posible. El RL tiende a conseguir su estabilidad cediendo un electrón, agente reductor, o captando un electrón, agente oxidante. Así el RL se estabiliza a costa de desestabilizar aquella molécula a la que le ha sustraído o donado un electrón, convirtiéndose estas en radicales libres (69, 70).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) pueden ser RL y no radicales. Los RL poseen un electrón desapareado en uno de sus orbitales más externos, mientras que los no radicales tienen todos sus electrones apareados.

Las ERO, sean o no radicales libres, se expresan con un símbolo [\bullet] como exponente a la derecha de la reacción. Según la naturaleza del elemento que participa en la acción oxidante se distinguen especies químicas reactivas de oxígeno (ERO), de nitrógeno (ERN), de carbono (ERC), de azufre (ERS), de halógenos y de manera especial de cloro (ERCl) (71).

Las ERO y de ERNs más importantes son los radicales superóxido ($O_2\bullet$), hidroperóxilo ($H_2O\bullet$) hidróxilo ($HO\bullet$), alcoxi ($RO\bullet$) y el peroxi ($ROO\bullet$) peróxido de hidrógeno (H_2O_2) óxido nítrico ($NO\bullet$) y dióxido de nitrógeno (NO_2). Estas especies reactivas de origen endógeno surgen como reacciones secundarias no deseadas entre biomoléculas. La reactividad de cualquier RL depende de su naturaleza química, siendo más reactivos los RL de menor volumen, aunque tengan igual carga eléctrica (72).

3.5.1.1. Especies reactivas derivadas del oxígeno

A las especies reactivas dependientes de oxígeno, a los RL relacionados con el oxígeno, a sus moléculas precursoras y a los derivados de estos, se les denomina especies reactivas de oxígeno ERO. Unas son verdaderos RL como el

hidroxilo y otras son fuente de RL, como el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno no es RL porque tienen completo su último orbital (electrones apareados). La Tabla 3.6. identifica las especies reactivas dependientes del oxígeno y el nitrógeno.

Tabla 3.6. Especies reactivas dependientes del oxígeno y el nitrógeno

Radicales libres		Especies reactivas no radicales	
Superóxido	$O_2^{\bullet-}$	Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Hidroxilo	HO^{\bullet}	Hidroperóxido	$ROOH$
Alcoxi	RO^{\bullet}	Hipoclorito	ClO^-
Peroxi	ROO^{\bullet}	Oxígeno singlete	1O_2
Carbonato	CO_3	Ozono	O_3
Oxido nítrico	NO	Peroxinitrito	$ONOO^-$
Dióxido nítrico	NO_2		

3.5.1.1.1. Oxígeno molecular

El oxígeno se encuentra en la naturaleza en forma molecular o diatómica (O_2). El oxígeno diatómico contiene 16 electrones distribuidos en orbitales moleculares. El oxígeno molecular es un RL por tener dos electrones desapareados en sus orbitales más externos. Ambos electrones tienen el mismo sentido de giro, por lo que son electrones desapareados con el mismo espín. El oxígeno sólo va a interactuar con aquellos radicales cuyos electrones tengan sus espines complementarios con el oxígeno, por esta razón el O_2 es un birradical de muy baja reactividad.

3.5.1.1.2. Oxígeno singlete

La molécula de oxígeno puede presentar diferentes configuraciones electrónicas en los últimos orbitales. Si los dos electrones de los últimos orbitales se configuran como espines opuestos se forma el oxígeno singlete (1O_2). (Figura 3.6.).

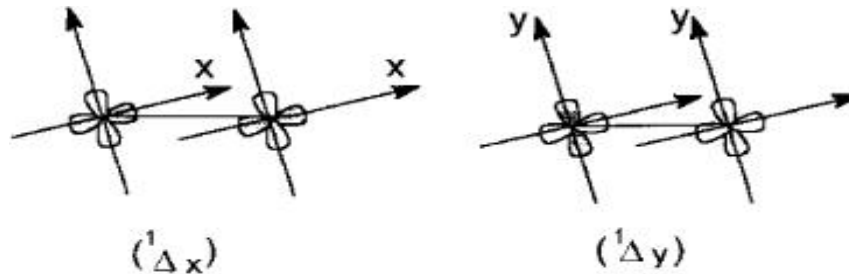


Figura 3.6. Representación de los orbitales moleculares p_x y p_y relativos a las formas Δ_x y Δ_y del oxígeno singlete: los lóbulos correspondientes a los ejes cartesianos nombrados representan el orbital molecular antiliante que posee el par de electrones.

Este oxígeno no es un RL aunque su forma excitada reacciona fácilmente con otras moléculas. El $^1\text{O}_2$ se produce por la absorción de energía electromagnética a partir del oxígeno molecular. La energía hace que un electrón del último orbital cambie el sentido de giro (spín). El oxígeno necesita absorber gran cantidad de energía para generar el $^1\text{O}_2$ y estas cantidades de energía se producen en los procesos fotoquímicos. También puede formarse en reacciones enzimáticas o en reacciones de oxidación de las diferentes especies (73).

El $^1\text{O}_2$ tiene la capacidad de interactuar con otras moléculas transfiriéndoles la energía de excitación que posee, o combinarse con ellas.

3.5.1.1.3 Radical Superóxido

Este radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) se genera al reducirse una molécula de O_2 . Se produce en todas las células eucariotas animales, principalmente en el retículo endoplasmático y en la mitocondria (74, 75, 76).

Entre el 1% y el 2% de los electrones que llegan a la mitocondria en la cadena respiratoria dan lugar al radical superóxido. También se forma el $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante el estallido respiratorio de las células fagocíticas y como producto de diferentes reacciones enzimáticas, como las de la enzima xantina oxidasa, o las del citocromo p450 a nivel del retículo endoplasmático y por autooxidación de otras moléculas (flavinas, compuestos tiólicos, catecolaminas, xantinas y hemoproteínas en presencia de cantidades traza de metales) (77, 78).

3.5.1.1.4. Peróxido de Hidrógeno

El peróxido de hidrógeno no es un RL como tal, dado que sus electrones están apareados (Figura 3.7.). Se considera una especie reactiva de oxígeno precursora de otros radicales libres.

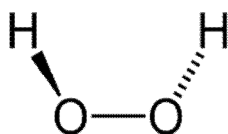
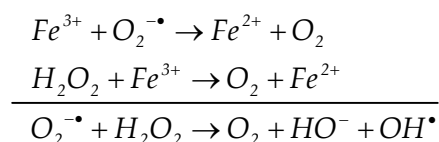


Figura 3.7. Molécula de peróxido de hidrogeno. (H_2O_2)

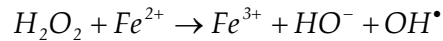
Esta forma es la menos reactiva de las ERO. Su importancia es debida a la capacidad de atravesar las membranas biológicas, por lo que puede generar reacciones de oxidación en puntos de la célula alejados de su lugar de producción, participando en reacciones que dan lugar a la producción de RL.

Aunque el peróxido de hidrógeno no es tóxico en concentraciones fisiológicas, puede convertirse en otro radical, el radical hidroxilo (OH^\bullet) por la reacción de Fenton/Haber-Weiss. El daño que puede producir dependerá de la disponibilidad que tenga de hierro (Fe^{2+}) y cobre (Cu^{2+}) (79, 80).

El radical superóxido no posee reactividad suficiente para atacar directamente a las macromoléculas, sin embargo, en presencia de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre, y en combinación con el peróxido de hidrógeno, se produce el radical hidroxilo, que es mucho más dañino que el radical superóxido, por la reacción de Haber-Weiss



Al igual que sucede con el radical superóxido, en presencia de metales de transición, el peróxido de hidrógeno se descompone generando el radical hidroxilo de elevada reactividad, en la que se conoce como reacción de Fenton.



3.5.1.1.5. Radical Hidroxilo

El radical hidroxilo (OH^\bullet) es el más perjudicial de los radicales libres por su alta reactividad. Su vida media es muy corta, de un nanosegundo ($1ns=1*10^{-9}s$), pero reacciona con todas las macromoléculas de su entorno (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos) (81, 82, 83, 84).

3.5.1.1.6. Radical Perhidroxilo

Este radical perhidroxilo (HO_2^\bullet) se genera a partir del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Es un radical libre liposoluble y un importante inductor de la oxidación de los lípidos de membranas biológicas (85).

3.5.1.1.7. Radicales Alcoxilo y Peroxilo

Estos radicales alcoxilo (RO^\bullet) y peroxilo (ROO^\bullet), aunque no son tan reactivos como el hidroxilo, son muy importantes en la fase de inicio y propagación de la peroxidación lipídica. Se generan durante la oxidación de lípidos, cuando otros radicales libres actúan sobre las cadenas carbonadas de los ácidos grasos de las colas de los fosfolípidos que forman las membranas celulares (85).

3.5.1.2. Especies reactivas derivadas del nitrógeno

Estas especies reactivas dependientes de nitrógeno (ERN) engloban a los radicales dependientes del nitrógeno y a las especies que generan dichos radicales.

3.5.1.2.1. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO^\bullet) es un gas liposoluble e hidrófilo que se produce en diversos tipos de células, catalizado por presencia de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS).

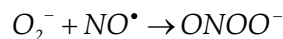
El NO^\bullet es vasodilatador, antiagregante plaquetario, neuromodulador, segundo mensajero y mediador del neurotransmisor excitador glutamato.

Reacciona con el hierro de las proteínas intracelulares,

fundamentalmente en las mitocondrias, inactivando enzimas del grupo hemo. Reacciona con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y rupturas en el ADN. El NO^\bullet es poco reactivo y no puede nitrar las proteínas, aunque puede reaccionar con otros compuestos intermediarios como el anión superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito (ONOO^-), que es un potente oxidante y responsable de la toxicidad del NO^\bullet (86, 87).

3.5.1.2.2. Anión Peroxinitrito

El peroxinitrito (ONOO^-) se forma "*in vivo*" por la reacción del óxido nítrico (NO^\bullet) y el anión superóxido (O_2^-) (88, 89, 90).



El peroxinitrito puede protonarse y formar ácido peroxinitroso (HONOO), que a su vez se descompone en el radical hidroxilo (OH^\bullet) y en dióxido de nitrógeno (NO_2) altamente tóxicos (91, 92).

El peroxinitrito puede inducir la peroxidación lipídica en lipoproteínas, degradar carbohidratos, nitrar y oxidar guanoxina, y fragmentar el ADN. Otras posibles interacciones serían con el CO_2 en las mitocondrias de las células durante la práctica de ejercicio. Todos estos procesos convierten al peroxinitrito en una molécula muy perjudicial para la célula y sus funciones (93).

3.5.1.2.3. Dióxido de Nitrógeno

El dióxido de nitrógeno (NO_2) es un radical libre que se genera a partir de la producción del óxido nítrico atmosférico. Es muy contaminante y uno de los compuestos que inician la peroxidación lipídica (94).

3.5.1.3. Radicales de átomos derivados del carbono

Los radicales libres centrados en un átomo de carbono son el resultado del ataque de un radical oxidante a una molécula biológica. Estos radicales son muy inestables y reaccionan rápidamente con el oxígeno, dando lugar al radical peroxilo (ROO^\bullet). Además participan en otras

reacciones formando otros radicales (95).

3.5.1.4. Radicales de átomos derivados del azufre

Los átomos de azufre también pueden ser diana de los radicales libres (RS^*). Si se forman a partir de una cisteína, esta se autooxida y da lugar a la formación de radicales tiilo o hidroxilo (96).

3.5.2. Producción de radicales libres en los seres vivos

Los radicales libres en los seres vivos pueden producirse en fuentes endógenas o exógenas, referidas a continuación.

3.5.2.1. Fuentes endógenas de radicales libres

La fuente principal de radicales libres son las mitocondrias de las células. Es sabido que los radicales libres en los sistemas biológicos proceden siempre, en último término, del metabolismo del oxígeno por la vía univalente. Las mitocondrias de las células son responsables de más del 90% del consumo del oxígeno celular. De los cuatro complejos responsables del transporte electrónico en la cadena respiratoria, se ha observado producción de radicales libres en mitocondrias aisladas en los complejos I y III (97, 98).

En el caso de los complejos I los candidatos más probables como generadores de RL parecen ser los centros ferro-sulfurados, mientras que en el caso de los complejos III se ha debatido intensamente sobre si podría corresponder a la semiquinona o al citocromo b (99, 100).

La segunda fuente en importancia de RL son los fagocitos del sistema inmunitario. Al encontrarse con un agente infeccioso, las células polimorfonucleares y los macrófagos experimentan un aumento muy acusado de consumo de oxígeno, llamado "estallido respiratorio".

Dicho consumo ocurre principalmente en la membrana plasmática, donde un complejo enzimático, la NADPH oxidasa, se activa y produce radicales de oxígeno a partir del oxígeno basal y electrones derivados de la vía de las proteínas.

Estos RL contribuyen de forma acusada a la destrucción o inactivación del

agente infeccioso de modo directo, o por combinación con halógenos como el cloro (Cl) para generar agentes extremadamente reactivos como el hipoclorito o las monocloramias (101, 102, 103).

Otro papel relevante de los RL en relación con los procesos patológicos es su producción durante el síndrome de isquemia-reperfusión. La comprensión de este fenómeno es primordial, ya que las isquemias cerebrales y de miocardio son las principales causas de muerte en las sociedades avanzadas. El daño irreversible durante la isquemia se debe fundamentalmente a la falta de oxígeno, que da lugar a la caída de la concentración de ATP, degradación de AMP y acumulación de hipoxantina, a la vez que se estimula la glucólisis anaerobia con la consiguiente acidificación del tejido.

Muchos de los procesos anteriores relacionan a los RL con procesos perjudiciales para el organismo. De todos modos, cuando sus niveles se controlan adecuadamente, los RL también intervienen en procesos útiles para el individuo. Esto es quizá lo que ha impedido su eliminación en el curso de la evolución (104).

Entre los efectos beneficiosos se incluyen procesos muy variados como la defensa frente a la infección, la detoxificación de xenobióticos, la reducción de ribonucleóxidos, las acciones de hidroxilasas y dioxigenasas, la carboxilación del glutámico, la señalización celular por óxido nítrico (NO[•]), la detección de la pO₂ en el cuerpo carotideo, la transducción intracelular de señales a través de factor nuclear kappa-B y los productos génicos c-fos y c-jun, la modulación de segundos mensajeros como el GMP cíclico, las acciones de prostaglandinas y leucotrienos, la agregación plaquetaria, la coagulación sanguínea, el potencial de membrana, la elevación antipolispérmica de la membrana de fecundación, la defensa interindividual en los insectos, o la bioluminiscencia. Se ha descrito también el papel de los radicales libres durante la generación de calor mediante termogénesis sin escalofrío (105, 106).

El hierro es un estimulador de la peroxidación lipídica, pudiendo participar en las reacciones de iniciación o propagación. De acuerdo con esto, la desferroxiamina es un potente inhibidor de la peroxidación lipídica estimulada por el hierro.

La peroxidación lipídica inducida por hierro se estimula mediante bajas concentraciones de un reductor como el ascorbato (peroxidación no enzimática), ó

tiene lugar con la participación de NADPH como reductor y de cadenas de transporte electrónico como la microsomal (peroxidación enzimática). La peroxidación lipídica puede también ser estimulada por el oxígeno singlete, el ozono, o radicales halógenos (107).

3.5.2.2. Fuentes exógenas de radicales libres

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan:

- Los factores ambientales (contaminantes aéreos, fitoquímicos, hiperoxia, pesticidas, solventes, anestésicos, hidrocarburos aromáticos, óxidos de nitrógeno - NO_x- del humo del tabaco) ó bien poseen radicales libres como el humo del tabaco, o se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (108, 109).
- Agentes antineoplásicos (adriamicina, bleomicina, daunorrubicina) y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoidales o de la unión de metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a la capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (110).
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos (111, 112).
- La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones, partículas α y β) (113).
- Los alimentos que ingerimos a través de la dieta especialmente los de origen animal que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes (peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición) (114).

Los agentes oxidantes exógenos a los que está expuesto nuestro organismo son abundantes (Tabla 3.7.) (115).

3.5.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es un proceso patológico producido por una alteración de los mecanismos bioquímicos que controlan las reacciones de

oxidación-reducción. Se produce por la ruptura del equilibrio entre la producción y eliminación de especies reactivas de oxígeno ERO. En los procesos de óxido-reducción, la especie química oxidante sustrae uno o más equivalentes reductores a la otra especie reductora.

Tabla 3.7. Principales factores exógenos que incrementan la producción de ROS

Contaminantes	Drogas	Iones metálicos
Fibras de asbesto	Acetaminoceno	Hierro
Ozono	Coproflaxocino	Cobre
Monóxido de carbono	Antidepresivos tricíclicos	Cadmio
Óxido nítrico y dióxido de nitrógeno	Nitrofurantoínas	Níquel
Polvo de minerales	Antidiabéticos	Cromo
Sílice	Bleomicina	Mercurio
Solventes	Doxorrubicina	
Toxinas		
Hipocloritos		
Dióxido de sulfuro		
Bifenilos policlorados		
Paraquat y Diquat		

El EO puede deberse a un incremento en la síntesis de ERO, a una menor eficacia del sistema defensivo antioxidante (SDA) o a ambos, siendo la consecuencia la ruptura del equilibrio bioquímico (Figura 3.8.).

En determinadas condiciones, el aumento de ERO puede dañar moléculas orgánicas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos, causando daños en un principio limitados, hasta alcanzar una afectación sistémica, generándose así el EO, factor de riesgo muy importante para la salud. Para contrarrestar los posibles efectos nocivos de las especies químicas oxidantes (EQO) las células se defienden mediante el SDA (116).

Cuando los mecanismos defensivos se ven superados por las agresiones oxidativas entonces se produce el EO, que puede llegar a producir lesiones celulares, las cuales pueden ser reversibles o irreversibles.

El equilibrio oxidativo es esencial para la regulación del metabolismo, la producción de energía, la activación o inactivación de moléculas, la transducción de señales, el recambio celular y el control del tono vascular (117).

Las ERO son un producto del metabolismo celular, algunas de ellas desarrollan funciones importantes en el organismo. El anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrogeno son utilizados por los leucocitos polimorfonucleares en la fagocitosis; el óxido nítrico es determinante en la regulación de la tensión arterial y en la modulación de fenómenos reactivos (116).

Cuando las ERO se encuentran en pequeñas concentraciones actúan como segundos mensajeros responsables de la señal de transducción de moléculas de señalización extracelulares y sus receptores de membrana.

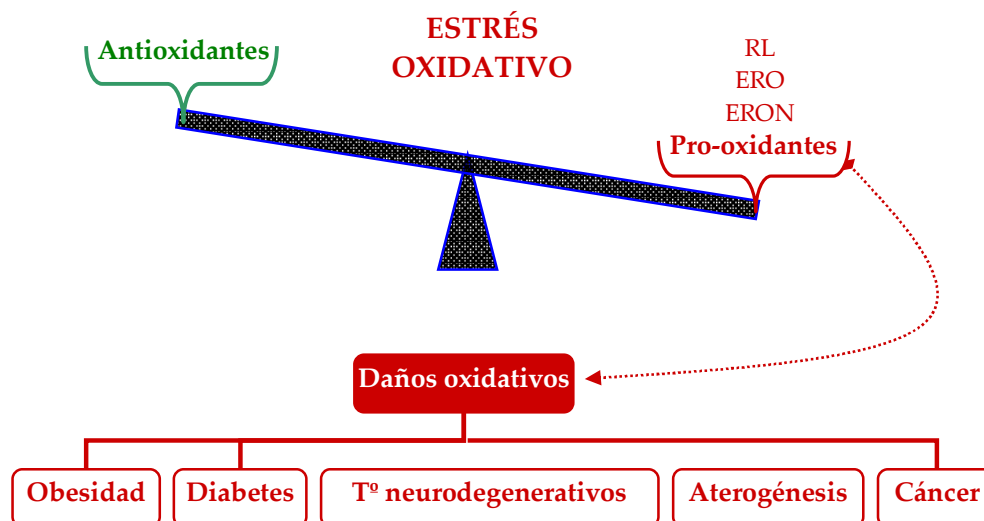


Figura 3.8. Esquema del desequilibrio entre los sistemas pro-oxidantes y los antioxidantes a favor de los primeros, favoreciendo la instauración del estrés oxidativo, caracterizado por la producción exacerbada de RL.

El aumento de las ERO puede deberse a factores tanto internos como externos del organismo. Por el contrario, un descenso del SDA puede estar

relacionado con un mayor o menor consumo o con una menor biodisponibilidad de antioxidantes, por lo que disminuye la actividad enzimática para poder neutralizar las ERO.

Cuando existe un desequilibrio entre ambos sistemas a favor del sistema oxidante, se produce una excesiva peroxidación de moléculas orgánicas de interés biológico (glúcidos, lípidos, proteínas, nucleótidos), un aumento de subproductos de la peroxidación (hidróxidos, cloraminas entre otros) y/o una reducción de las concentraciones o actividades de los antioxidantes glutathion peroxidasa (GPx), ácido ascórbico, en tejidos o líquidos extracelulares.

El análisis de marcadores en líquidos extracelulares sirve para valorar el estrés oxidativo. Actualmente se conoce que el EO juega un papel importante no solo en la aceleración del proceso de envejecimiento, sino también en favorecer una serie de patologías degenerativas como la aterosclerosis, la HTA, diabetes, obesidad, dislipemia, cáncer. (Figura 3.8.) (118).

3.5.4. Estrés oxidativo y síndrome metabólico

Tanto en la obesidad como en los estilos de vida caracterizados por el sedentarismo y combinados con excesos en la alimentación, se han observado aumentos en la producción de ERO en el tejido adiposo principalmente, así como en células musculares y pancreáticas. Este aumento es debido al aumento en la expresión de la enzima NADPH oxidasa en el tejido adiposo, al exagerado almacenamiento de glucosa y AG intracelular y a la disminución tanto en la concentración como en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutathion peroxidasa en el organismo, junto a la superproducción de ERO, fundamentalmente a través de la cadena de transporte de electrones.

El estrés oxidativo generado, bien por una disminución de los sistemas antioxidantes o por el aumento de ERO, estimula la producción de citocinas IL-6, FNT α , IL-8, IL-18 entre otras, que inician una respuesta inflamatoria y con ello una alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas.

El incremento de ERO en el torrente sanguíneo puede ser el responsable de la generación de resistencia a la insulina en el músculo esquelético, en el tejido

adiposo y de la alteración en la secreción de insulina por las células del páncreas (119).

3.5.4.1. Alteraciones en la cascada de señalización de la insulina

Con la exposición prolongada de los adipocitos a las ERO se produce una alteración en la cascada de señalización de la insulina y en las demás células insulino-dependientes. Se produce una inactivación de la enzima fosfatidilinosito-3 cinasa (PI-3K) y de Akt o PKB proteína cinasa B, inactivación de la lipogénesis, utilización de la glucosa y de la traslocación del transportador de glucosa GLUT 4 a la membrana celular, así como de la síntesis de glucógeno y de la activación de la enzima óxido nítrico (NO sintasa).

Existe otra vía de señalización de la insulina, que a pesar de existir RI en los tejidos insulino-dependientes, permanece con sensibilidad normal a la hormona. Esta vía de las proteínas cinasas, activadas en la mitosis (MAPK), es un proceso de fosforilación con activación de varias cinasas hasta la formación de MEK-1, ERK1 y ERK2.

Estas cinasas median en los efectos mitogénicos, crecimiento, proliferación y migración de las células del músculo liso y de otros factores vasculares, así como en la migración de monocitos al subendotelio. Esta vía en condiciones normales se mantiene en balance con la vía de la PI-3K, favoreciéndose la última. No obstante, en condiciones de estrés oxidativo y de resistencia a la insulina, es la vía de la MAP-K la que predomina (120).

3.5.4.2. Pérdida en el control de la lipólisis

Al estar bloqueada la vía de la PI-3K, la insulina pierde el control sobre la supresión de la lipólisis en el tejido adiposo. Debido a esto se produce un incremento de la concentración de los AG en el plasma sanguíneo, inicialmente de forma nocturna. Los AG son transportados vía portal al hígado, favoreciendo la esteatosis hepática no alcohólica, hígado graso, y como consecuencia el hígado inicia la producción de glucosa.

Al concurrir la RI, tanto en el músculo como en el tejido adiposo, aunado a la mayor producción de glucosa hepática, se produce un incremento en los niveles de glucosa, acrecentando la hiperglucemia preexistente.

Tanto la hiperglucemia como el incremento de los AG en el plasma, estimulan la síntesis hepática de TAG. Este aumento de la síntesis de TAG genera a un incremento del diacilglicerol y la acilcoenzima A, compuestos que activan la proteína cinasa C (PCK). La citada enzima favorece la fosforilación en serina/treonina y no de la tirosina, que a su vez también interrumpe la vía de la PI-3K.

La excesiva producción hepática de TAG provoca la liberación en el torrente sanguíneo de lipoproteínas de muy baja densidad VLDL ricas en TAG. Las VLDL intercambian TAG con la HDL y éstas a su vez ceden su contenido de esteres de colesterol a las VLDL y a las LDL. Las HDL y LDL ricas en TAG son más sensibles a la lipólisis por acción de la lipasa hepática (enzima con mayor actividad en presencia de obesidad o resistencia a la insulina), las cuales se transforman en moléculas pequeñas y densas, más propensas a la oxidación. De esta manera las LDL pueden infiltrarse con facilidad en el endotelio de las arterias, iniciando el proceso aterosclerótico.

Por otro lado las HDL ricas en TAG y pequeñas son eliminadas de la circulación de manera rápida, y su principal proteína APO-A1 lo es por vía renal; esto ocasiona la disminución del transporte reverso de colesterol y de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las HDL, contribuyendo así al proceso aterosclerótico (121, 122).

3.5.4.3. *Disfunción endotelial*

El endotelio vascular es una estructura que reviste el interior de los vasos sanguíneos y posee diversas funciones, siendo una barrera selectivamente permeable entre la sangre y los tejidos. Este endotelio detecta señales, presión sanguínea, radicales libres, hipoxia y puede responder a ellas mediante la expresión de moléculas que participan en la regulación de la trombosis, la inflamación, el tono vascular y la remodelación vascular, funciones que se realizan con la participación de diversas moléculas, como la prostaciclina, la endotelina y el NO entre otras.

El NO es el vasodilatador endógeno más importante, jugando un papel central en la regulación endotelial del tono vascular. El NO tiene propiedades

antiateroscleróticas:

- Inhibe la oxidación de las LDL
- Impide el proceso inflamatorio en la aterosclerosis al inhibir la liberación de moléculas endoteliales de adhesión leucocitaria, inhibiendo así la adhesión de monocitos y leucocitos al endotelio
- Inhibe también la proliferación celular y contracción vascular
- Actúa bloqueando la agregación plaquetaria y la producción de endotelina.

De tal forma que si se produce un deterioro en la biodisponibilidad del NO, como sucede en la aterosclerosis, se genera un estado que precipita un evento clínico.

Se ha observado que en pacientes con hiperglucemia aparecen simultáneamente un aumento en la producción de NO y una disminución de su biodisponibilidad.

El anión superóxido resultante ($O_2^{\bullet-}$) del estado de hiperglucemia e hipertrigliceridemia, activa al factor nuclear de transcripción NF- κ B, el cual incrementa la expresión de la NO sintasa inducible (NOSi), lo que ocasiona un aumento en la concentración de NO. Sin embargo, cuando el $O_2^{\bullet-}$ se encuentra en altas concentraciones, reacciona rápidamente con el NO para formar ONOO $^-$. Como resultado final, se tiene una disminución en la biodisponibilidad del NO $^{\bullet}$ en el endotelio y un efecto altamente tóxico del ONOO $^-$.

Además, con la disminución en la biodisponibilidad del NO $^{\bullet}$, también se ve afectada la vasodilatación endotelial, que conduce al desarrollo de múltiples complicaciones microvasculares y macrovasculares. El ONOO $^-$ formado actúa oxidando las proteínas, inicia la lipoperoxidación y la nitración de los aminoácidos.

Sumado a lo anterior, la hipoglucemia junto con la hipertrigliceridemia aguda posprandial contribuye a la disfunción endotelial al promover a través del estrés oxidativo la expresión de moléculas de adhesión. Así, en el plasma de pacientes con diabetes se han encontrado niveles elevados de ICAM-1, de VCAM-1 y de selectina E (123, 124).

3.5.4.4. *Disfunción de las células β*

Recientes investigaciones han propuesto que durante todo el desarrollo de patologías como el SM y sus complicaciones, existe un estado de EO. Las ERO no solo afectan a células musculares del tejido adiposo o del endotelio, sino también a las células β del páncreas.

La disfunción de estas resulta de la exposición prolongada a altas concentraciones de glucosa, AG y ERO. Las células β son muy sensibles a las ERO y ERN, puesto que son pobres en antioxidantes como las catalasas, GPx y SOD.

Se ha podido observar que cuando las células β están expuestas a las ERO hay una disminución de ARNm de la insulina, ATP citosólico, flujo de calcio, tanto en el citosol como en la mitocondria, existe una alteración en el control de la proliferación y apoptosis celular, así como la activación de diferentes factores que activan la respuesta inflamatoria (NF-B entre otros) (125).

3.5.4.5. *Formación de productos finales de la glicación avanzada (AGEs) y productos de lipoxidación avanzada (ALEs)*

Elevadas concentraciones de glucosa en sangre contribuyen a la glicación de proteínas y lípidos, dando lugar a la formación de moléculas conocidas como productos finales de glicación avanzada (AGEs) como N-carboximetil-lisina, pentosidina y pirrolina. Los receptores para los AGEs (llamados RAGE) se encuentran en diferentes tejidos y células incluyendo células endoteliales, células de músculo liso vascular y macrófagos.

La unión de AGEs a su receptor conduce a la generación intracelular de ERO y con ello la activación del NF-B. Dicho factor promueve la presencia de citocinas (TNF- α y β , IL-1, 6, 8, 18) y del interferón (INF-), que lo sitúa como el primer responsable de la respuesta inflamatoria. Este factor tiene una regulación positiva, puesto que los productos de los genes que activa, influyen en la activación de la expresión del gen de NF-B, regulación que perpetúa y amplifica la respuesta inflamatoria local.

La producción de citocinas -principalmente de TNF- α e IL-6- estimula la síntesis hepática de proteína PCR, amiloide sérico, fibrinógeno, inhibidor 1 del activador del plasminógeno. PAL-1- y lipoproteína a. Se ha propuesto que la

modificación química de las lipoproteínas y otras moléculas orgánicas puede deberse a la glicación/glicoxidación. Esta modificación ocurre de manera no enzimática, puesto que el azúcar se une a grupos amino libres de la lipoproteína.

Este compuesto sufre un reajuste posterior, conduciendo a estructuras AGE irreversibles. Las modificaciones se dan en ausencia, glicación o presencia, glicoxidación de oxígeno. Una consecuencia de gran importancia de esta modificación es el cambio en la estructura y función de las moléculas.

Otra modificación que pueden sufrir las lipoproteínas es la formación de productos finales de lipoxidación avanzada (ALEs).

La producción de ERO tiene como consecuencia, entre otros procesos, la iniciación de la lipoperoxidación. Los peróxidos lipídicos formados pueden unirse químicamente a proteínas dando lugar a los ALEs, y ocurriendo así la propagación de la lipoxidación y el daño celular. Las LDL que contienen ALEs presentan efectos proaterogénicos al inducir incrementos en la proliferación de células del músculo liso, en la apoptosis de las células del endotelio, la inducción de células espumosas a partir de macrófagos, los incrementos de endotelina-1 y de la producción de la matriz, la activación de la PCR, y la inhibición de enzimas antioxidantes (126, 127).

3.5.5. Sistema de defensa antioxidante

Decimos de una sustancia antioxidante que es aquella que, encontrándose en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retarda o inhibe la oxidación del mismo (128).

El organismo humano dispone de dos sistemas antioxidantes: un sistema endógeno y un sistema exógeno. La primera línea de defensa incluye enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la glutatión-peroxidasa, la glutatión-transferasa y la catalasa entre otras.

En ocasiones las defensas antioxidantes endógenas no son efectivas y precisan de la colaboración de antioxidantes exógenos como la vitamina C, la vitamina E, los carotenos y polifenoles que son, principalmente, compuestos donadores de hidrógeno, quelantes de metales implicados en la oxidación y captadores de RL. En general, la capacidad antioxidante de un compuesto está

relacionada con las siguientes funciones:

- Captar radicales libres del medio evitando el proceso oxidativo. En el caso de los fenoles se formaría el radical flavílico que es menos reactivo y es más estable por causa de la deslocalización del electrón en su estructura.
- Evitar la formación de radicales libres. Por ejemplo quelando iones de transición y evitando la formación de radicales libres de la reacción de Fenton. Esta acción requiere la presencia de grupos hidroxilos cercanos en el anillo aromático.
- Modular la actividad de enzimas antioxidantes.

Además, dichas funciones se ven afectadas por la interacción entre antioxidantes. Así el ácido ascórbico o la epicatequina aumentan el potencial captador de radicales del tocoferol, mientras que los diversos polifenoles de la dieta pueden interactuar entre sí en ambos sentidos, Por lo tanto, el sistema antioxidante exógeno es un eslabón clave en la prevención del daño oxidativo y de sus consecuencias (129, 130, 131).

3.5.5.1. Clasificación de la acción de los antioxidantes

La acción de los antioxidantes la podemos clasificar en cinco fases o niveles:

1. Primer nivel: evitando la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción del oxígeno tetravalente consecutiva, sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto es posible gracias al sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, que es responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno del organismo humano. En este proceso están implicadas enzimas como la GPx y la GR, capaces de constituir la primera línea de defensa contra las ERO (132).
2. Segundo nivel: formado por enzimas especializadas en captar el radical anión superóxido como la SOD.
3. Tercer nivel: constituido por un grupo de enzimas que neutralizan el peróxido de hidrógeno (catalasa).
4. Cuarto nivel: formado por el α -tocoferol y la vitamina C.
5. Quinto nivel: incluye todos aquellos antioxidantes que una vez producido el daño molecular intervienen en la reparación.

La forma más común de clasificar el sistema de defensa antioxidante es en antioxidantes enzimáticos (SOD, catalasa, peroxidasas y reductasas) y no enzimáticos, que pueden ser de origen exógeno (Vitaminas A, E, y C, β carotenos), o endógeno (glutation, albúmina, ácido úrico, bilirrubina, melatonina) (Tabla 3.8.) (133).

Tabla 3.8. Clasificación de los antioxidantes

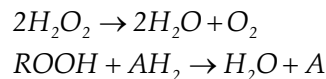
Origen	Acción
Exógenos	
Vitamina E	Neutraliza el oxígeno singlete Captura radicales libres de hidroxilo Neutraliza peróxidos
Vitamina C	Neutraliza al oxígeno singlete Captura radicales libres de hidroxilo Captura O ₂ Regenera la forma oxidada de la vitamina E
β -carotenos , licopenos	Neutralizan el oxígeno singlete
Polifenoles	
Endógenos	
Enzimáticos	Cofactor
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio, magnesio
Catalasa (CAT)	Hierro
Glutation Peroxidasa (GPx)	Selenio
No enzimáticos	
Glutation	Barreras fisiológicas que enfrentan el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
Coenzima Q	Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina)

(Modificada a partir de Relli et al., 1990)

3.5.5.1.1. Antioxidantes enzimáticos

3.5.5.1.1.1 Catalasa

Se localiza a nivel celular en las mitocondrias, en los peroxisomas y en el citosol. La catalasa participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a una molécula de agua y a una de oxígeno. La catalasa por un lado, cataliza la reducción de peróxido en agua, y por otro lado oxida los donantes de grupos de hidrógeno, como el metanol y el etanol, con el consumo de un mol de peróxido, por lo que esta enzima presenta actividad catalítica y peroxidica.



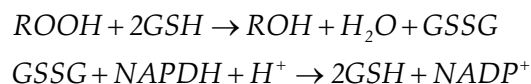
3.5.5.1.1.2. Glutation reductasa (GR)

La GR es una flavoproteína-NAPDH-dependiente que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH), en presencia de NAPDH y actúa conjuntamente con otras enzimas (134).

3.5.5.1.1.3. Glutation peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa es una enzima antioxidante presente en todos los tejidos. Se localiza en el citosol (eritrocitos), lisosomas (neutrófilos, macrófagos y en células del sistema inmunitario). Existen dos isoenzimas: una selenio-dependiente y otra con acción independiente.

Esta enzima cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos orgánicos a agua y alcohol respectivamente. Para ello utiliza el glutatión reducido como donante de electrones. Esta enzima juega un papel importante en la detoxificación de lipoperóxidos que se generan en las células (133, 135).



3.5.5.1.1.4. Superóxido-dismutasa (SOD)

La SOD cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido, convirtiéndose en la primera barrera defensiva frente a este. Existen tres isoenzimas, cada una de ellas ligada a un grupo prostético diferente: una se asocia con el cobre y el cinc (Cu-Zn-SOD), y las dos restantes con hierro y manganeso (Fe-SOD, Mn-SOD).

Esta enzima se localiza en el citosol del hígado y el cerebro. También se encuentra en menor cantidad en los hematíes del pulmón, en las mitocondrias, el líquido intersticial y en el plasma. La SOD elimina el radical superóxido convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno. En presencia de hierro libre puede presentar una acción pro-oxidante, por lo que tiene que complementar su acción con otros antioxidantes como la GPx y la catalasa que eliminan el peróxido generando oxígeno y agua (Figura 3.9.) (136).

3.5.5.1.2. Antioxidantes no enzimáticos

3.5.5.1.2.1. Antioxidantes no enzimáticos endógenos

Entre los antioxidantes no enzimáticos endógenos, destacan compuestos como el alopurinol, ácido úrico, ácido lipoico, N-acetilcisteína, glucosa y algunos elementos traza, como cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio.

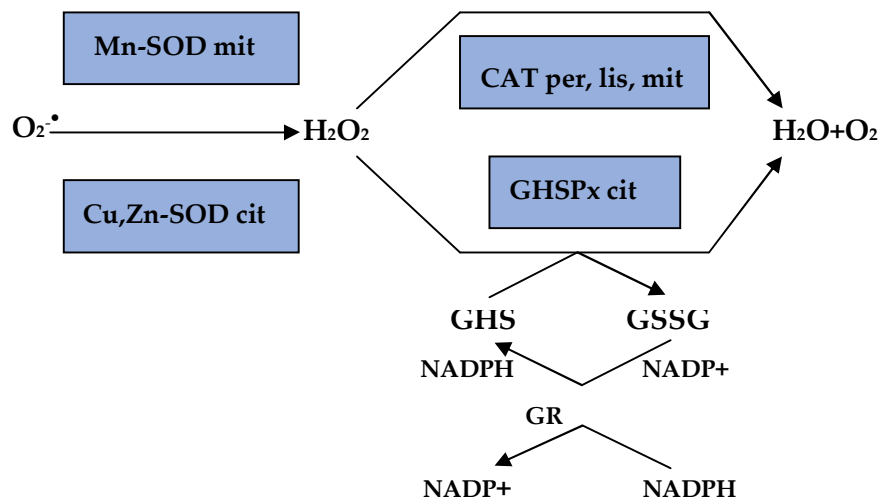


Figura 3.9. Asociación de la SOD con los grupos prostéticos liberando agua y oxígeno

Uno de los antioxidantes más importantes es el GSH, que puede encontrarse en dos formas diferentes según su estado de oxido-reducción: como glutathion reducido GSH, o como glutathion oxidado GSSG.

El GSH o glutathion reducido está implicado en funciones metabólicas muy importantes: proteger a la célula contra los radicales libres, los peróxidos y otros compuestos tóxicos, intervenir en múltiples procesos celulares incluyendo la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis (137).

Algunas de las alteraciones en el equilibrio del GSH pueden estar implicadas en la generación o en la progresión de gran número de enfermedades, como las ECV, enfermedades que afectan al sistema inmunológico, enfermedades inflamatorias y metabólicas.

El estado de oxidación del GSH, así como los niveles mantenidos en plasma, pueden ser debidos a la interacción de diversos factores, heredados o adquiridos, en los que intervienen enzimas, transportadores, moléculas de señalización y factores de transcripción. La deficiencia de GSH se manifiesta a través de la susceptibilidad al EO, resultando en daño celular y relacionado con determinadas patologías. Niveles de GSH bajos disminuyen la capacidad antioxidante de las células; cuando aumentan las concentraciones en plasma se incrementa la capacidad antioxidante y la resistencia al EO (137).

3.5.5.1.2.2. Antioxidantes no enzimáticos exógenos

Los antioxidantes no enzimáticos exógenos que se describen son los mayoritarios en la bebida empleada en este estudio: la vitamina C y los polifenoles.

a) Ácido ascórbico o Vitamina C.

La vitamina C o Acido ascórbico es considerada uno de los biomarcadores más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (138).

La vitamina C es hidrosoluble y se encuentra ampliamente distribuida en los fluidos intra y extracelulares.

De su poder antioxidante destaca su capacidad para reducir a los radicales hidroxilo, hidroperóxido y superóxido, además de diversos hidroperóxidos

lipídicos (139).

Reacciona con el radical tocoferol para reconvertirlo en α -tocoferol. El aumento celular de vitamina C debe proteger contra el daño producido por los radicales. Sin embargo la vitamina C en altas concentraciones y en presencia de Fe^{3+} o Cu^{2+} actúa como un potente pro-oxidante. La concentración de vitamina C en la bebida de estudio es 0.0105 mg/100 g (138, 140).

b) Polifenoles

Los polifenoles son un amplio grupo de metabolitos secundarios abundantes en el reino vegetal. Se encuentran en todas las plantas superiores, localizándose en frutos y órganos aéreos jóvenes, por lo que se consumen frecuentemente en la dieta en cantidades significativas (141).

Estos compuestos son importantes para la fisiología de las plantas pues contribuyen a la resistencia frente a microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad frente a la continua exposición a factores ambientales adversos. Además muchos de ellos son en parte responsables de las propiedades organolépticas de los alimentos de origen vegetal, y por tanto tienen una importancia considerable en la calidad de los mismos (142).

Sus estructuras químicas son muy diversas, encontrándose desde ácidos fenólicos simples hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular, como los taninos hidrolizables y condensados.

Habitualmente se encuentran unidos a uno o más residuos de azúcar por grupos hidroxilos. También existen uniones directas del sacárido a un átomo de carbono aromático. Los azúcares asociados pueden estar presentes como monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. La glucosa es el azúcar más común, aunque también se pueden encontrar polifenoles unidos a la galactosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, así como a ácidos glucorónidos, galacturónico y otros tipos. (143). La Figura 3.10. delimita la clasificación de los polifenoles.

▪ Flavonoides

Se encuentran en niveles elevados en el té, vino tinto, frutas y

hortalizas verdes. Los frutos rojos son ricos en antocianos, los cereales en taninos y ligninas, los cítricos en flavonas, la soja en isoflavonas, etc. Las cantidades de ingesta y biodisponibilidad de los flavonoides en frutos está muy influenciada por factores climáticos, el estado de madurez y por el procesado que sufran estos alimentos tanto a nivel industrial como doméstico (144, 145).

Forman el grupo de los compuestos fenólicos más importantes por su gran variabilidad estructural y su presencia en la mayoría de los alimentos de origen vegetal. Están implicados en el color y en el sabor de las frutas y hortalizas (142) además de ser responsables de numerosas propiedades beneficiosas para la salud (146, 147, 148).

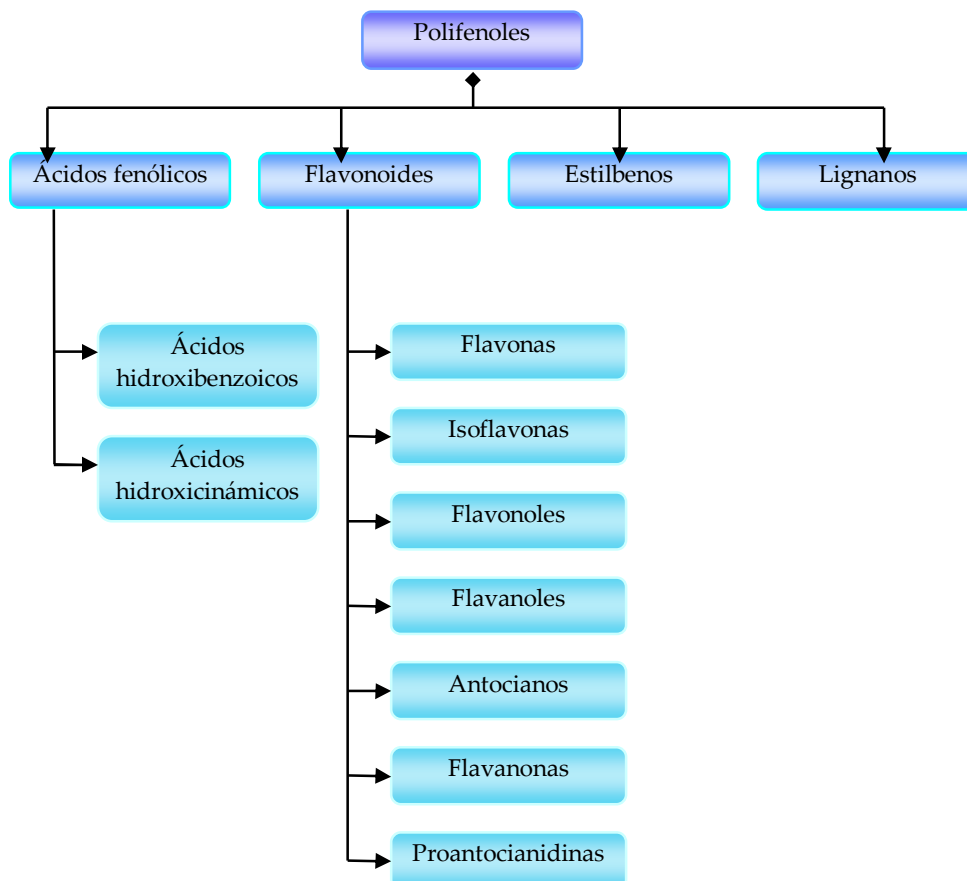


Figura 3.10. Clasificación de los compuestos fenólicos

Forman el grupo de los compuestos fenólicos más importantes por su gran variabilidad estructural y su presencia en la mayoría de los alimentos de origen vegetal. Están implicados en el color y en el sabor de las frutas y hortalizas (142) además de ser responsables de numerosas propiedades beneficiosas para la salud (146, 147, 148).

Los flavonoides se caracterizan por un sistema específico C_{15} ($C_6-C_3-C_6$) de tres anillos, dos de ellos aromáticos y un tercero tipo pirano (Figura 3.11.). Pueden aparecer en las plantas como agliconas, aunque por lo general se encuentran glicosilados (a veces acilados), y como polímeros por condensación. Los diferentes grados de oxidación y sustituciones en el anillo C definen los distintos tipos de flavonoides. Las distintas sustituciones en el anillo B definen los diferentes compuestos dentro de cada grupo. Normalmente las sustituciones son de hidroxilos en posición 4, y de hidroxilos o metaxilos en posición 3 y/o 5 (149).

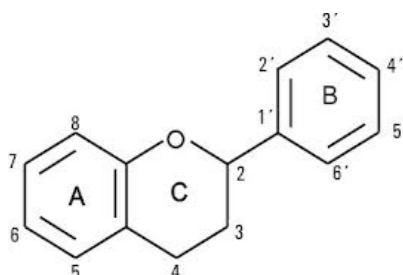


Figura 3.11. Estructura básica de los flavonoides.

- Flavanoles

Los flavanoles mayoritarios son la catequina y su isómero epicatequina, la galocatequina y su isómero epigalocatequina. Los flavanoles glicosilados son poco frecuentes. La Figura 3.12. muestra su estructura general.

La catequina se encuentra principalmente en frutas como el albaricoque (250 mg/kg de fruta fresca) ó en el vino tinto (300 mg/L) y el chocolate (610 mg/L), pero el mayor contenido está en el té verde (hasta 800 mg/L). La presencia de galocatequina y epigalocatequina sólo es relevante en legumbres, granadas, uvas, vino, cerveza, té y la mayoría de las bayas (150, 151, 152, 153).

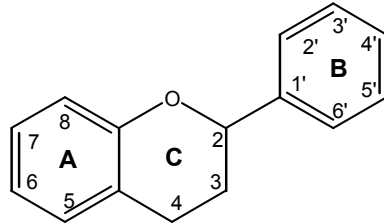


Figura 3.12. Estructura general de los flavan-3oles

- Flavonoles

Los flavonoles se caracterizan por la presencia de un doble enlace en el C2 y de un grupo hidroxilo en el C3 en el heterociclo. Se conocen aproximadamente 450 tipos de agliconas y 900 tipos de glucósidos de los cuales la gran mayoría se presentan como *o*-glucósidos unidos en las posiciones 3^a y/o 7^a (Figura 3.13.) (154). Los flavonoles están presentes en baja concentración (15-30 mg/kg de peso fresco). Las principales fuentes son la cebolla, la col, el brócoli, los arándanos y el vino tinto (155). La concentración total de flavonoides en la bebida empleada en este estudio experimental es de (26.70 ± 0.35) mg/100 mL, siendo todos derivados de la quercetina (Tabla 4.4.).

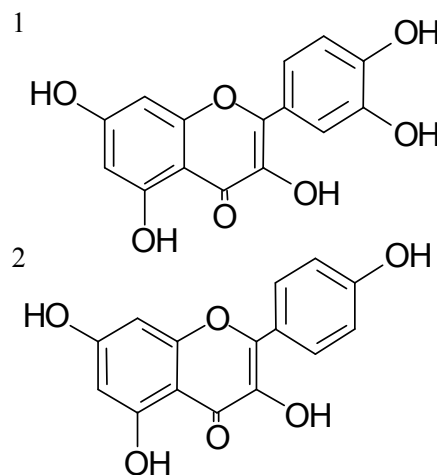


Figura 3.13. Estructura de los flavonoles quercetina (1) y kaempferol (2)

- Flavonas

Las flavonas se caracterizan porque tienen un doble enlace en el heterociclo en la posición 2-3 y el C4 es un grupo carbonilo. El grupo hidroxilo del C3 de los grupos anteriores no se presenta en estas moléculas (Figura 3.14.)

Las flavonas son mucho menos comunes en frutas y vegetales. La fuente más importante dentro de los alimentos son el perejil y el apio. Además la piel de los cítricos posee importantes cantidades de flavonas polimetoxiladas. (156).

La concentración total de flavonas en la bebida de este estudio experimental es de (8.59 ± 0.21) mg/100 mL, habiéndose identificado la vicenina-2, diosmetina 6-8 diglucosido y diosmina (Tabla 4.4.).

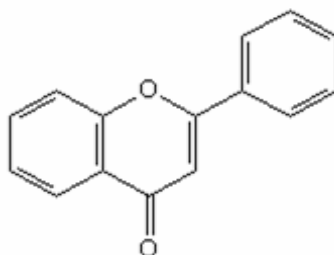


Figura 3.14. Estructura básica de las flavonas

- Isoflavonas

Las isoflavonas son sustancias diferentes a los esteroides endógenos humanos con capacidad de unirse a los receptores estrogénicos. Las más importantes son la genisteina y la daidzeina. Su estructura (similar a la de los estrógenos) se observa en la Figura 3.15. Las flavonas presentan un anillo fenólico en la posición 2 mientras que las isoflavonas lo tienen sustituido en la posición 3. Su mayor fuente son las legumbres, principalmente la soja cuyo contenido es de 580-3800 mg isoflavona/kg de peso fresco (157).

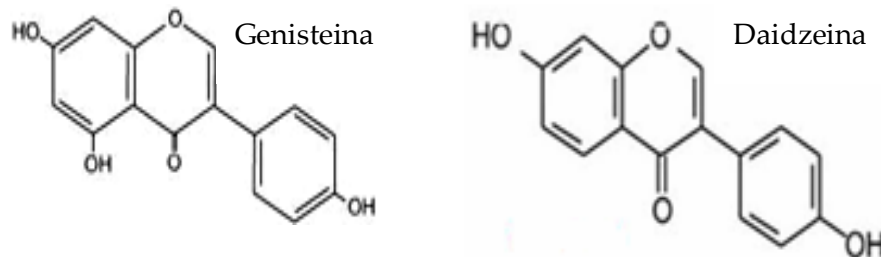


Figura 3.15. Estructura básica de las isoflavonas principales, genisteina y daidzeina

- Flavanonas

Se diferencian de las flavonas en que la insaturación del heterociclo no está presente.

Las más importantes son la hesperetina, la naringenina y sus glicosilados correspondientes. Otra flavanona muy frecuente es la taxifolina. La estructura de las flavanonas se observa en la Figura 3.16.

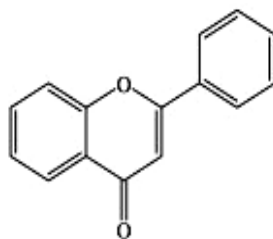


Figura 3.16. Estructura de las flavanonas.

Los cítricos son los alimentos más ricos en este grupo de flavonoides, aunque también están presentes en los tomates y ciertas hierbas aromáticas como la menta. El principal aglicón existente en el pomelo es la naringenina, en la naranja la hesperetina y en el limón el eriodictiol. El zumo de naranja contiene entre 200 y 600 mg de hesperidina/L; un único vaso de zumo de naranja dispondría entre 40 y 140 mg de flavanonas glicosiladas. Las flavanonas identificadas en la bebida de este estudio son la hesperidina y la eritrosina (Tabla 4.4.), siendo la concentración total de flavanonas de (24.9 ± 0.22) mg/100 mL (158).

- Proantocianidinas

De acuerdo al número de unidades de flavanol elementales que entran a formar parte de su estructura, se suele distinguir entre proantocianidinas oligómeras (hasta cinco unidades) y polímeras (más de cinco unidades).

Los enlaces interflavánicos más usuales son los que se establecen entre el C4 de una unidad de flavanol (considerada sub-unidad superior o de extensión) y los C8 ó C6 de otra unidad (denominada sub-unidad inferior). Los mejor representados son los dímeros denominados de tipo B (Figura 3.17.) con enlaces C4→C8 (dímeros B1 a B4) o C4→C6 (dímeros B5 a B8).

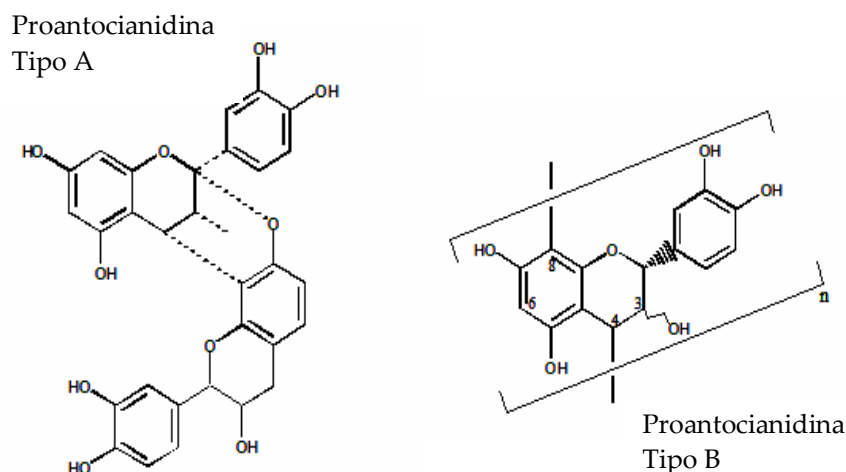


Figura 3.17. Enlaces interflavánicos en proantocianidinas de tipos A y B.

Aunque menos frecuentes, existen también proantocianidinas que, además de la unión C4→C8 ó C6, presentan un enlace adicional de tipo éter entre las posiciones C2→C7 ó C5 (unión de tipo A). Este último tipo de compuestos se presentan más raramente en partes comestibles de vegetales.

Entre los oligómeros lo normal es la existencia de proantocianidinas homogéneas, es decir, compuestos formados únicamente por catequinas o por galocatequinas; aunque también se han descrito oligómeros no homogéneos, constituidos por unidades de catequina y galocatequina conjuntamente.

Estos compuestos son los responsables de la astringencia de ciertas frutas (uvas, melocotones, caquis, bayas) y bebidas (vino, cerveza, sidra, té) o del amargor del cacao (159).

- Antocianos

Los antocianos son pigmentos que están disueltos en la savia vacuolar de los tejidos epidérmicos de flores y frutas, donde confieren una gama de colores como el rojo, púrpura o azul. Por ello, el término antociano deriva de las palabras griegas: “*anto*” que significa flor y “*kyanos*” azul oscuro. Como son pigmentos, en las flores son capaces de atraer a los insectos para llevar a cabo la polinización y en los frutos a otros animales para dispersar la semilla. Además, tienen funciones protectoras, antioxidantes y de defensa en la planta como otros polifenoles (160).

Químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio y un anillo fenólico; el flavilio normalmente funciona como un catión.

Las agliconas libres raramente existen en los alimentos, excepto posiblemente como componentes traza de las reacciones de degradación. De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aprox. 20), las más importantes son la pelargonidina, la delfinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los hidratos de carbono que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, la xilosa y la arabinosa y, ocasionalmente, la gentiobiosa, la rutinosa y la soforosa, habitualmente unidos en las posiciones 3 y también 5, formando 3-*o*-glucósidos y 3,5-di-*o*- glucósidos.

Las antocianidinas se caracterizan por la presencia de dos dobles enlaces, uno en la posición 1 y otro en el C3 y de un grupo hidroxilo en el C3 del heterociclo. Las estructuras de las antocianidinas más importantes se observan en la Figura 3.18.

La concentración total de antocianos en la bebida de estudio es de (26.70 ± 0.35) mg/100 mL, siendo todos derivados glicosilados (Tabla 4.4.).

- No flavonoides

Forman un extenso grupo dentro de los polifenoles, poseen generalmente una estructura química más sencilla que la de los flavonoides. Al igual que los anteriores están ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

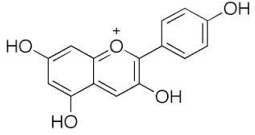
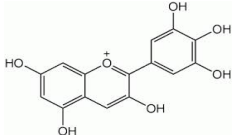
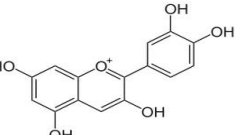
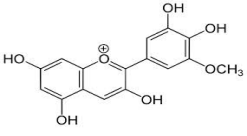
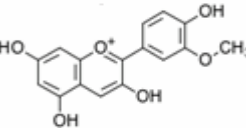
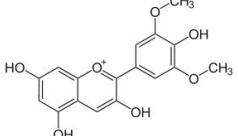
Pelargonidina	Delfinidina	Cianidina
$C_{15}H_{11}O_5$	$C_{15}H_{11}O_7$	$C_{15}H_{11}O_6$
		
Petunidina	Peonidina	Malvidina
$C_{16}H_{13}O_7$	$C_{16}H_{13}O_6$	$C_{17}H_{15}O_7$
		

Figura 3.18. Estructura de las principales antocioninas.

- Ácidos hidroxibenzoicos

Poseen una estructura C6-C1 derivada del ácido benzoico propiamente dicho, sobre el que se producen reacciones de hidroxilación y metilación para dar lugar a los distintos ácidos hidroxibenzoicos. Los más frecuentes son los ácidos: gálico elágico (dímero del ácido gálico), *p*-hidroxibenzóico, vanílico, sirínico y procatéuico.

Los ácidos gálico y elágico son a su vez constituyentes de los taninos hidrolizables, apareciendo en frutas como la frambuesa, la zarzamora o la granada, y en el vino por hidrólisis de los anteriores. Los ácidos *p*-hidroxibenzóico y vanílico se encuentran en numerosas frutas como la cereza, la

uva, el melón o la fresa. El ácido siríngico puede detectarse en la uva, y por último, el protocatéquico se detecta en forma glucosilada en muchos frutos como la grosella, la zarzamora, la frambuesa, la fresa, etc. (161, 162).

- Ácidos hidroxicinámicos

Poseen una estructura C6-C3 y son muy abundantes, proviniendo todos del ácido cinámico a través de la ruta biosintética de los compuestos fenólicos. Básicamente son cuatro: ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico y sinápico. Las cumarinas son ácidos hidroxicinámicos ciclados, pero no se incluyen dentro de este grupo. El ácido *p*-cumárico es muy abundante en los cítricos, la frambuesa y la piña. El ácido caféico y sus derivados son los más abundantes de todos, y se encuentran principalmente en la lechuga, la alcachofa, la manzana y las ciruelas. El ácido ferúlico se encuentra en los cítricos y la uva. Por último se incluye el ácido sinápico, que se ha descrito en el brócoli, en algún cítrico, la piña y el tomate, aunque de forma minoritaria (163).

Los ácidos hidroxicinámicos son el tercer grupo de polifenoles más abundantes en la uva y los mayoritarios en el zumo y el vino blanco. Son fácilmente oxidables y por tanto responsables en parte del pardeamiento de los vinos (164).

3.5.6. Daño oxidativo a biomoléculas

Cuando se producen daños oxidativos en biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN), se generan ciertas sustancias de descomposición y metabolitos secundarios los cuales son empleados como biomarcadores de daño oxidativo (165).

3.5.6.1. Daño a lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados, ácido linoleico, linolénico y el ácido araquidónico son las biomoléculas más sensibles al ataque de las ERO debido a la presencia de sus dobles enlaces conjugados. Esta lesión oxidativa se denomina peroxidación lipídica y resulta especialmente relevante cuando se afectan los lípidos constitutivos de las membranas biológicas, ya que se ven alteradas propiedades como la fluidez, el potencial y la permeabilidad iónica de la

membrana conduciendo finalmente a una pérdida de la integridad de la misma (166, 167, 168).

Además los productos de oxidación lipídica también pueden alterar proteínas funcionales como transportadores y enzimas, provocando roturas que liberan el contenido de las células y organelas, como las enzimas hidrolíticas lisosomales (169, 170, 171, 172). Los peróxidos lipídicos (LOOH) y/o sus derivados carbonílicos citotóxicos pueden bloquear la acción de los macrófagos, inhibir la síntesis de proteínas, destruir bacterias, activar enzimas, agregar proteínas, generar trombinas y actuar como agentes quimiotácticos para la fagocitosis (173, 174).

Por otra parte, está ampliamente descrito que los productos finales de la peroxidación lipídica, tales como el malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-nonetal (HNE) y peróxidos lipídicos producen, lesiones en las proteínas al interactuar con restos de lisina, cisteína e histidina (31, 34). Esta lesiones producen alteraciones graves en las proteínas, hecho que ha sido corroborado tanto en estudios "*en vivo*" como "*in vitro*" (175, 176, 177, 178).

La detección y medida de la peroxidación lipídica ha sido muy estudiada en la influencia del estrés oxidativo en las distintas patologías (179).

Para determinar el grado de oxidación lipídica de un tejido se puede cuantificar el contenido en sustancias reactivas con ácido tiobarbitúrico (TBARS). Sin embargo la medida de TBARS puede resultar bastante imprecisa como indicador de peroxidación de lípidos, ya que el MDA que forma aductos con el ácido tiobarbitúrico, no solo se deriva de reacciones de este tipo, lo cual produce una sobreestimación de la medida (180).

Actualmente se están utilizando como marcadores de la peroxidación lipídica los isoprostanos F₂, isómeros de las prostaglandinas que se producen como productos finales de la peroxidación del ácido araquidónico mediado por ERO, siendo el más utilizado el 8-epiPGF_{2a} (182).

3.5.6.2. Daño a proteínas

Las proteínas son las moléculas más propensas al daño ocasionado por las ERO, más que los lípidos y el ADN. Son por tanto los compuestos celulares más oxidados: un 68%. El estrés oxidativo puede dañar las proteínas de manera

similar a como ocurre con otras macromoléculas (183).

Estudios con radiaciones ionizantes muestran que el OH^\bullet es el causante de la oxidación de las proteínas, aunque el curso del proceso oxidativo está determinado por la disponibilidad de $^1\text{O}_2$ y $\text{O}_2^{\bullet-}$. Investigaciones posteriores ponen de manifiesto que el daño a proteínas inducido por las ERO se debe a factores como la velocidad de reacción y la concentración de las mismas. El sitio o sitios específicos donde pueden ser oxidadas las proteínas son el esqueleto carbonado α -por la oxidación del hidrógeno donador de electrones-, las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos, los residuos alifáticos y aromáticos, así como los del azufre, metionina y cisteína (184).

La oxidación de las proteínas produce derivados carbonilos. Las cadenas de prolina, arginina, lisina y treonina pueden ser convertidas mediante la oxidación en grupos aldehídos o cetonas, carbonilos, causando la inactivación, el entrecruzamiento y la ruptura de las proteínas en la célula. No hay evidencias de que el proceso de carbonilación sea reversible (185).

3.5.6.3. Daño sobre el ADN

El daño oxidativo al ADN se produce por su interacción con especies reactivas al oxígeno o con especies reactivas al nitrógeno. El HO^\bullet y el H^\bullet son los principales radicales libres que reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN, ya que tienen la capacidad de oxidar tanto las bases púricas como las pirimidínicas y el azúcar desoxirribosa (186).

De la misma manera, los radicales N^\bullet y peroxinitrito (ONOO^\bullet) también pueden reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN, provocando la ruptura y entrecruzamiento de las cadenas de nucleótidos (187).

El ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo, no solamente por su cercanía al sitio de generación de ERO (cadena de transporte de electrones), sino también por su menor capacidad de reparación del daño oxidativo. Se ha estimado que de manera normal ocurren entre 104 y 105 alteraciones del ADN diariamente en las células de los mamíferos (187, 188).

Entre los productos de oxidación del ADN que se han identificado, el 8-hidroxi-2desoxiguanoxina (8-OHdG) es un metabolito relevante, que se utiliza para evaluar el grado de daño oxidativo al ADN (188).

Cuando el daño oxidativo es moderado, el ADN puede activar mecanismos de reparación que aseguran la integridad del mismo. Sin embargo, cuando el sistema de reparación del ADN falla o el daño oxidativo es excesivo, las modificaciones oxidativas ocasionarían cambios funcionales que podrían dar inicio a cambios permanentes del material genético, debido a las mutaciones y deleciones que se producen en el ADN nuclear o mitocondrial (189).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTRA POBLACIONAL

La muestra poblacional está constituida por 53 individuos de ambos sexos (24 hombres y 29 mujeres) con una edad comprendida entre los 50 y los 65 años, media (57.3 ± 4.3 años). 33 de los pacientes presentan síndrome metabólico (62.26%) y cumplen tres de los requisitos establecidos por la Adult Treatment Panel (ATPIII). El grupo control está formado por 20 voluntarios sanos (37.73%) en el mismo rango de edades. (ATPIII) (190). (Tabla 4.1., Tabla 4.2.).

Tabla 4.1. Criterios diagnósticos según el NCEP-ATP III

Diagnóstico: tres o más criterios
Obesidad abdominal:
<ul style="list-style-type: none">Perímetro abdominal: > 102 cm (hombre)Perímetro abdominal: > 88 cm (mujer)
Dislipidemia:
<ul style="list-style-type: none">Hipertrigliceridemia: triglicéridos ≥ 150 mg/dLColesterol-HDL: < 40 mg/dL (hombre)Colesterol-HDL: < 50 mg/dL (mujer)
Presión arterial: $\geq 130/85$ mmHg
Glucemia basal en plasma: ≥ 110 mg/dL

La muestra poblacional fue seleccionada en el Centro de de Salud San Andrés; Murcia. Los participantes en el estudio fueron informados de manera individual y todos ellos firmaron el documento de consentimiento y conformidad (Anexo 1).

El estudio cumple con las normas deontológicas reconocidas por la declaración de Helsinki (revisión de Hong-Kong, Septiembre de 1989), las recomendaciones de la buena práctica clínica de la CEE (documento 111/3976/88

de julio de 1990) y la normativa legal vigente española que regula la investigación clínica en humanos (R.D. 561/1993, sobre Ensayos Clínicos) (Anexo 2).

Tabla 4.2. Descripción de la muestra poblacional

	Grupo control		Pacientes con SM		Total	
	Uds.	%	Uds.	%	Uds.	%
N	20	37.73	33	62.26	53	100
Hombres	8	33.33	16	66.66	24	100
Mujeres	12	41.37	17	58.62	29	100
Edad media	55.9 ± 4.3		58.8 ± 4.4		57.3 ± 4.3	

Los criterios de exclusión de la selección de la muestra fueron:

- a) Padecer enfermedades infecciosas de cualquier índole
- b) Consumir suplementos multivitamínicos
- c) Padecer una enfermedad renal, hepática o sistémica grave
- d) Presentar hábitos dietéticos que no siguen patrones estándar (p.e: dietas alimentarias sin frutas ni verduras, sin legumbres ni hortalizas, dietas vegetarianas, veganas, macrobióticas, proteinadas, etc.)
- e) Presentar un IMC superior a 40 kg/m²

4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se utiliza un modelo de estudio transversal, con un muestreo representativo de la población con y sin síndrome metabólico de la Ciudad de Murcia (Figura 4.1.).

El muestreo se ha realizado por selección entre los voluntarios que se ofrecieron a participar. A cada sujeto seleccionado se le han realizado tres encuestas recordatorio 24 horas para valorar nutricionalmente su ingesta dietética y se han recogido sus medidas antropométricas de

peso, talla y perímetro de la cintura (Anexo 3). Se hizo extracción de sangre y recogida de orina. Se les ha practicado una extracción de sangre de la vena antecubital en diferentes tubos, con EDTA o heparina. La sangre fue centrifugada a 3500 r.p.m. durante 10 min. a temperatura ambiente para obtener suero o plasma y los viales fueron almacenados a -80°C hasta su posterior análisis.

Las muestras sanguíneas fueron procesadas entre los laboratorios del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (HUVA) y los laboratorios de Nutrición Humana y Dietética de la UCAM.

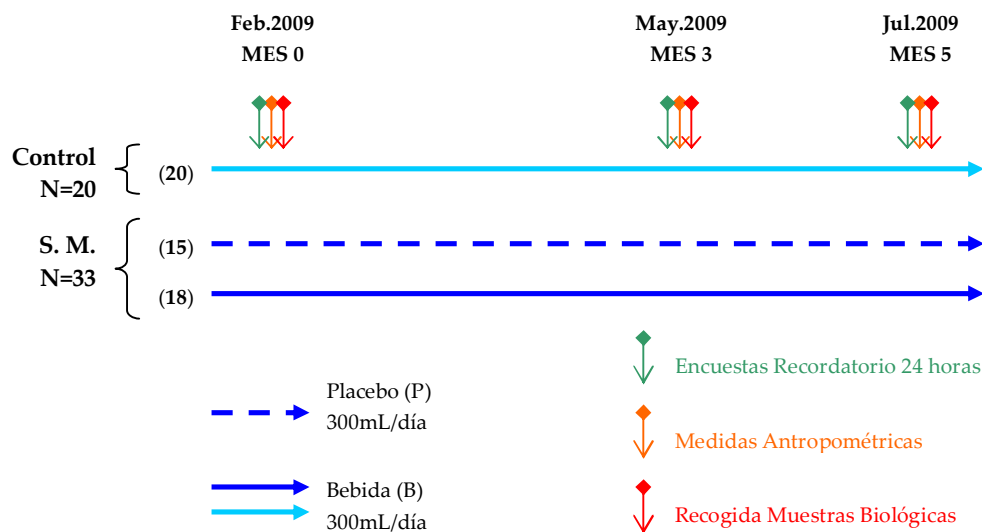


Figura 4.1. Esquema del ensayo clínico

Los análisis bioquímicos se han realizado sobre plasma, suero, eritrocitos u orina según el parámetro analizado. La Tabla 4.3. muestra los marcadores analizados en los pacientes con síndrome metabólico y a los individuos del grupo control, cuya metodología será descrita en el capítulo en el que se detallan los resultados de la misma.

Tabla 4.3. Marcadores analizados

Marcadores del estado antioxidante	Biomarcadores de estrés oxidativo	Marcadores de inflamación
Actividad antioxidante total (Equiv mmol Trolox)	Isoprostanos (ng/mL)	Proteína C-reativa
Glutación peroxidasa (U/L)	8-hidroxi-2-desoxiguanosina (ng/mL)	Homocisteína
Glutathion reductasa (U/L)	Proteínas oxidadas ($\mu\text{mol/mg}$)	
Superóxido dismutasa (U/g Hg)	LDL oxidada (U/L)	
	GSH/GSSH μM	

Para ver el efecto de la bebida antioxidante (B), sobre el perfil lipídico, marcadores de inflamación, el estado antioxidante y los biomarcadores de estrés oxidativo analizados, a los pacientes con síndrome metabólico se les dividió en dos grupos: un grupo de 18 pacientes que consumieron diariamente 300 mL de la B durante cinco meses y 15 pacientes que consumieron una bebida placebo (P). El grupo control está constituido por 20 individuos sanos que consumieron diariamente durante cinco meses la bebida de estudio (B).

4.3. DISEÑO DE LA BEBIDA ANTOXIDANTE CON ZUMO DE LIMÓN Y ARONIA

La composición de la bebida antioxidante está basada en la mezcla de zumo de limón (95%) con un 5% de extracto de aronia (*Aronia Melanocarpa*). La Tabla 4.4. indica la composición de la bebida de estudio (B), basada en un modelo de bebida desarrollado y publicado por González Molina et al. (173).

El desarrollo de la bebida se ha realizado en una planta piloto (Hero-España, Alcantarilla; Murcia) y se le han ido optimizando las características organolépticas en función de su aceptación por un panel de catadores.

En la bebida antioxidante el 68% del contenido fenólico son flavonoides (principalmente flavanonas, flavonas y antocianos), el 28% son hidroxicinamatos y un 2% de concentración de catequinas. El contenido total de compuestos fenólicos en la B es 1.25 mg/mL.

Tabla 4.4. Contenido de flavanonas, flavonas, antocianos, derivados hidroxicinámicos y flavonoles (derivados de quercetina) de la bebida con zumo de limón y aronia (B).

	B	mg/100 mL
Flavanonas	Eriocitrina	11.45 ± 0.08
	Hesperidina	13.54 ± 0.14
Flavonas	Vicenina-2	0.59 ± 0.02
	Dt	7.75 ± 0.19
	Diosmina	< 0.25
Antocianos	Ci 3-gal	15.08 ± 0.10
	Ci 3-glc	1.31 ± 0.02
	Ci 3-arab	9.19 ± 0.20
	Ci 3-xil	1.11 ± 0.03
	T. Antocianos	26.70 ± 0.35
Ác.	ANC	19.72 ± 0.17
Hidroxicinámicos	CA	14.69 ± 0.13
Derivados de quercetina	Σ Quercetinas	4.31 ± 0.04

Los datos se expresan como media ± desviación estándar de la media (n = 3), en mg por cada 100 mL de zumo

Dt: diosmetina 6-8 diglucosido, Ci 3-gal: cianidina 3-galactosido, Ci 3-glc: cianidina 3-glucosido, Ci 3-arab: cianidin 3-arabinoide, Ci 3-xil: cianidina 3-xilosido, T.Antocianos: Antocianos totales, ANC: Ácido neoclorogénico, AC: Ácido clorogénico, Σ Quercetinas: suma de quercetina 3-galactosido, 3-glucosido y 3-rutinosido

La Tabla 4.5. informa de la composición nutricional de la bebida antioxidante.

Tabla 4.5. Composición nutricional de la bebida antioxidante (B)

Composición nutricional/100 mL. de bebida antioxidante	
Energía	38 Kcal
Hidratos de carbono	9 g
Lípidos	0.03 g
Proteínas	0.45 g

4.4. DISEÑO DE LA BEBIDA PLACEBO

La bebida placebo está compuesta por una mezcla de agua, colorante rojo autorizado, saborizante y edulcorante. Los métodos se describirán en los capítulos correspondientes.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables cuantitativas se describieron mediante la media, la desviación típica y los valores mínimo y máximo. Esta descripción se realizó para la muestra total y estratificada por grupo del estudio.

Las variables cualitativas se presentaron en forma de tabla incluyendo las frecuencias relativas y absolutas, tanto para los grupos de tratamiento como para la población global.

Las condiciones de aplicación de los análisis estadísticos se verificaron previamente a los mismos. La normalidad se contrastó mediante el test de Kolmogorov-Smirnoff y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene. En caso de incumplimiento de alguna de las condiciones se procedió al análisis mediante pruebas no paramétricas.

Para las variables cuantitativas se desarrollaron comparaciones de t-Student en caso de normalidad y pruebas no paramétricas de U-Mann-Whitney en caso contrario.

Las variables cualitativas fueron analizadas mediante test de homogeneidad

basados en la distribución Chi-cuadrado cuando los valores esperados lo hicieron posible y mediante test exactos de Fisher en caso contrario.

La evolución de estas variables se analizó mediante pruebas paramétricas (t-Student o AN.O.VA.), no paramétricas (Wilcoxon o Friedman) ó con el test de McNemar según características propias de las variables en estudio.

En el conjunto de pruebas estadísticas el nivel de significación utilizado fue $\alpha= 0.05$.

El análisis estadístico se realizó con el software informático SPSS, versión 18.0.

5. VALORACION NUTRICIONAL

5. VALORACIÓN NUTRICIONAL

La inclusión de la obesidad, y particularmente la abdominal, como riesgo principal del SM y su actuación como desencadenante de la asociación de los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en personas susceptibles, se debe al NCAP-ATP III y especialmente a la Internacional Diabetes Federation (IDF) (191, 192, 193).

Existe acuerdo generalizado en que cada uno de los componentes del SM se relaciona con cambios en el estilo de vida. El sedentarismo, el desequilibrio entre la energía ingerida y la consumida, y la ingesta elevada de alimentos con exceso de grasas saturadas y grasas trans, en menoscabo de los de alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, poliinsaturados, fibra, frutas y vegetales, se asocian con la presencia de cada uno de los componentes.

Por ello, resulta apropiado comenzar el apartado de resultados relacionando los hábitos dietéticos de los pacientes con algunos componentes del SM.

5.1. METODOLOGÍA DE LA VALORACIÓN NUTRICIONAL

5.1.1. Medidas antropométricas.

La valoración de las medidas antropométricas tiene por objeto determinar las modificaciones que se van presentando en la constitución y composición corporal. Tiene las siguientes ventajas:

- Constituye un método objetivo y no invasivo de medir la constitución y composición del individuo.
- Las medidas son relativamente sencillas, rápidas y económicas de tomar.
- Los datos antropométricos son capaces de reflejar cambios en la encuesta nutricional producidos a largo plazo.
- Los resultados obtenidos deben evaluarse comparándolos con estándares, la edad y género, aunque puede tomarse el propio individuo como referencia.

Los parámetros antropométricos utilizados en el presente estudio han sido

el peso, la talla y el perímetro de la cintura. Para ello se han utilizado una báscula y un tallímetro telescópico.

5.1.1.1. *Peso.*

Para la medida del peso se utilizó una báscula modelo TANITA BC-418 MA (Body Composition Analyzer), con precisión de ± 100 g (rango 0.1 - 150 kg). La báscula se situó sobre una superficie plana y horizontal, en una habitación habilitada para ello, y comprobando el cero antes de cada pesada.

5.1.1.2. *Talla.*

Para la medida de la talla se tomó la distancia entre el vertex y las plantas de los pies del sujeto medida en cm, utilizando un tallímetro modelo Seca 221. Se posicionó al individuo de pie, descalzo, con los pies juntos, rodillas estiradas, talones, nalgas y espalda en contacto con el aparato medidor, con la cabeza de forma que el plano de Frankfurt (que une el borde de la órbita de los ojos y el superior del meato auditivo externo) sea horizontal. El individuo mantuvo los brazos extendidos paralelamente al tronco mientras se realizaba la medición.

5.1.1.3. *IMC.*

Aunque de modo independiente estos parámetros poseen valor propio y pueden indicarnos alteraciones nutricionales.

Lo más frecuente es utilizar diferentes índices que se obtienen a partir de ellos. En nuestro caso se calculó el Índice de Masa Corporal (IMC) o Índice de Quetelet.

El IMC constituye uno de los índices más utilizados en la actualidad, fundamentalmente en personas adultas en las que se encuentra mejor estandarizado. El IMC constituye actualmente el índice más comúnmente empleado para determinar el grado de sobrepeso y obesidad en las personas adultas (194).

$$IMC = \frac{\text{peso (kg)}}{\text{talla (m}^2\text{)}}$$

Se valoró la fiabilidad intra e inter-observador de las medidas antropométricas realizadas. Los resultados fueron satisfactorios en todos los

casos, ya que la fiabilidad intra-observador fue siempre superior al 95% y la fiabilidad inter-observador superior al 90%.

5.1.1.4. *Perímetro de la cintura.*

La circunferencia o perímetro de cintura se midió con cinta métrica en un punto medio entre la arcada costal inferior y cresta iliaca superior a nivel de la línea axilar anterior.

5.1.2. Encuesta recordatorio de 24 horas

La encuesta-recordatorio de 24 es un método retrospectivo y cuantitativo de valoración del consumo alimentario mediante entrevista.

Este método valora la ingesta real del individuo en las 24 horas anteriores a la encuesta. Para ello el encuestador solicita al individuo recordar todos los alimentos e ingredientes consumidos el día anterior a la entrevista. El entrevistador debe ser una persona entrenada en la forma de conducir la entrevista y la estimación de las cantidades reales de alimentos consumidos.

En el presente estudio y con el fin de minimizar la variabilidad que se pudiera generar como resultado de la intervención de varios entrevistadores, las entrevistas siempre fueron realizadas por la misma persona y durante los momentos siguientes al periodo del desayuno de los sujetos.

La entrevista duró aproximadamente 15 minutos. El individuo debía recordar los alimentos ingeridos el día anterior (recordar varios días de ingesta anteriores a la fecha de la entrevista disminuye la exactitud del método).

El encuestador formuló preguntas generales evitando influir en las respuestas (preguntas abiertas). Para facilitar el recuerdo de lo ingerido, las preguntas se referían a las principales comidas del día, desde la mañana a la noche, y posteriormente se interrogaba sobre lo consumido entre horas.

En el recordatorio de 24 horas, figuran datos personales del entrevistado, fecha y un espacio para registrar la ingesta del desayuno, almuerzo, comida, merienda, cena y colación.

En el estudio se realizaron tres encuestas recordatorio de 24 horas a cada individuo durante tres días no consecutivos, incluyendo en ellos un día festivo o

un fin de semana.

5.1.3. Programa informático de la valoración nutricional

La valoración nutricional de los recordatorios dietéticos de 24 horas se llevaron a cabo mediante el uso del programa informático “Valoración y soporte nutricional del paciente hospitalizado y ambulatorio”, DietSource v.2.0.1, elaborado por Novartis Consumer Health S.A., 2003.

5.2. RESULTADOS DE LA VALORACIÓN NUTRICIONAL

Ambos grupos (control y pacientes con SM) fueron medidos antropométricamente tomando como referencia los valores de peso y talla para el cálculo del IMC, y el perímetro de la cintura como reseña, para valorar el riesgo de enfermedad cardiovascular.

Los valores obtenidos se reflejan en la Tabla 5.1. En ella podemos observar que tanto los valores del peso como los del IMC, son superiores en los pacientes con síndrome metabólico respecto a los obtenidos en el grupo control, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) para ambos valores entre los dos grupos.

Los valores medios de IMC del grupo control se categorizan como sobrepeso, mientras que los valores de IMC obtenidos para el grupo de pacientes con síndrome metabólico, se categorizan como obesidad, según la valoración establecida por la (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad) (SEEDO) y la Sociedad Española de Epidemiología (SEE). Otros estudios, también encuentran valores de IMC y de obesidad en pacientes con SM, que algunos autores han asociado con un mayor riesgo de ECV (195, 196, 197,198).

Sin embargo, esta medida (IMC) no tiene en cuenta la variación en la distribución de grasa corporal y la masa grasa abdominal, que puede variar sustancialmente dentro de un estrecho rango de IMC. El exceso de grasa intra-abdominal se asocia con un mayor riesgo de morbilidad relacionado con la obesidad, que la adiposidad general. Así, la medida de la circunferencia de la cintura se utiliza como alternativa al IMC (199, 200, 201).

Tabla 5.1.- Descripción de la muestra poblacional

	GC	Pacientes con SM
N (total)	20	33
Hombres	8	16
Mujeres	12	17
Edad (años)	55.9 ± 4.3	58.8 ± 4.4
Peso (kg)	73.1 ± 4.3*	83.62 ± 14.8
IMC (kg/m ²)	27.4 ± 5.2*	32.1 ± 14.8
Perímetro cintura (cm)	89.3 ± 10.0*	102.8 ± 13.6

Valores expresados como media ± desviación estándar de la media.

(*)Diferencias significativas entre el GC vs. pacientes con SM, ($p < 0.05$)

El perímetro de la cintura medio de los pacientes con SM es significativamente superior ($p < 0.05$) que en el GC (Tabla 5.1.), siendo superior en hombres que en mujeres tanto en el grupo de pacientes con SM (109.7 ± 14.0 cm y 96.2 ± 9.6 cm, respectivamente) como en el grupo control (93.5 ± 8.1 cm y 88.1 ± 11.1 cm, respectivamente). La determinación del perímetro de la cintura representa una primera prueba de detección del SM, considerando valores superiores a 88 cm en las mujeres y 102 cm en los hombres, un factor de riesgo de ECV (202, 203, 204, 205).

La circunferencia de la cintura se ha demostrado que es la mejor medida simple del tejido adiposo, tanto del subcutáneo abdominal como del intraabdominal (204). Nosotros hemos encontrado valores del perímetro de la cintura en el grupo de pacientes con síndrome metabólico considerados como valores de riesgo cardiovascular. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros estudios sobre pacientes con SM (196, 206).

El aumento progresivo de peso, incluso de forma leve a lo largo de los años, favorece el desarrollo de SM y de cada uno de sus componentes por separado. También se ha demostrado que el control ponderal, independientemente del

índice de masa corporal inicial, puede reducir la incidencia de síndrome metabólico (207).

Al aplicar la t-Student para muestras independientes se observan diferencias significativas en el IMC, en el peso y en el perímetro de la cintura, entre el grupo control y los pacientes con síndrome metabólico.

5.2.1. Valoración de la ingesta

Tras el análisis de la ingesta de los pacientes, no encontramos diferencias significativas en cuanto al consumo energético en ambos grupos de estudio. La ingesta calórica media en el grupo de pacientes con síndrome metabólico es de $(2132.5 \pm 372.9 \text{ Kcal/día})$, similar al consumo medio de energía del grupo control que es $(2056.5 \pm 225.2 \text{ Kcal/día})$. En los dos grupos el consumo energético es mayor en los hombres que en las mujeres (Figura 5.1.) y cercano a la recomendación de ingesta para la población general española (2400 Kcal en varones y 1875 Kcal en mujeres). Valores similares de ingesta encontramos en la población general española incluida en el estudio PREDIMED, realizado sobre una muestra de pacientes con síndrome metabólico (208).

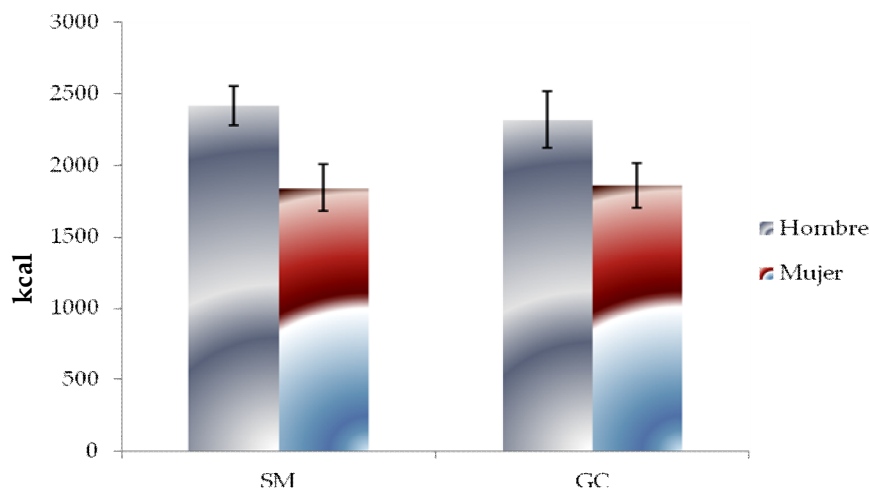


Figura 5.1. Ingesta calórica del GC y de los pacientes con SM

5.2.1.1. Macronutrientes

El consumo de carbohidratos corresponde a un 37-45% de la energía total de la dieta para el grupo de pacientes con SM y del 40-46% para el GC (Figura 5.2.). En ambos, grupos la ingesta de hidratos de carbono es inferior a las recomendaciones establecidas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y por la OMS, que estiman que la ingesta de este grupo en macronutrientes debería ser del 45-60% y del 55-75% respectivamente (209, 210).

La mayoría de estudios epidemiológicos muestran una asociación inversa entre el consumo de hidratos de carbono y el IMC, esto se corrobora en nuestro estudio en el que observamos valores de IMC compatibles con sobrepeso y un consumo de carbohidratos inferior a las recomendaciones. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios en los que también observan una aportación de hidratos de carbono inferior a las recomendaciones en pacientes con SM que presentan obesidad (208, 211, 212, 213).

La EFSA señaló en 2010, tras analizar varios estudios de intervención a largo plazo, que las modificaciones dietéticas que promueven una mayor ingesta de hidratos de carbono (> 50% de la energía) "ad libitum", se asocian con un menor riesgo de ganancia de peso en varios grupos de población, en los que se incluían sujetos con normopeso, sobrepeso u obesidad (209).

La ingesta de fibra dietética es de 20 ± 1.2 g/día en el GC y de 13 ± 3.2 g/día en la población con SM respectivamente, encontrando diferencias significativas entre ambos grupos. Este consumo de fibra se encuentra por debajo de las recomendaciones que se establecen en más de 25 g/día para la población adulta. Aunque el GC se acerca más a dichas recomendaciones, el consumo de fibra del grupo de pacientes con SM supone prácticamente la mitad del recomendado. Otros estudios realizados en pacientes con SM coinciden con el nuestro en un consumo de fibra inferior a las recomendaciones (208, 214, 213).

Este resultado es inquietante, teniendo en cuenta, que son numerosos los estudios epidemiológicos que muestran una relación inversa entre la cantidad de fibra consumida la RI y el RCV (215, 216, 217).

Tal y como acabamos de mencionar, el consumo de hidratos de carbono en ambos grupos no es adecuado pero aún lo es menos en el grupo de pacientes con síndrome metabólico, si tenemos en cuenta que dietas con un alto contenido en

fibra tienen un efecto positivo sobre la reducción de los niveles de colesterol plasmáticos y los valores de triglicéridos plasmáticos (218, 219, 220).

De la misma forma que con el consumo de hidratos de carbono totales, no encontramos diferencias significativas en el consumo de proteínas entre los dos grupos (Figura 5.2.), con una ingesta proteica media del 16-20% del aporte calórico total de la dieta en el GC, frente a un 17-19% en el grupo de pacientes con SM. La ingesta proteica en ambos grupos es superior a las recomendaciones, tanto de la OMS 10-15%, como de la SENC (13%). (221, 222).

Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores y superiores a los encontrados en otros estudios (208, 213, 223). Las evidencias referidas al consumo de proteína total y su efecto sobre la variación de peso en adultos son insuficientes para establecer ninguna recomendación (209, 224).

El papel de las proteínas en el peso corporal es en cualquier caso controvertido. Pese a que se ha sugerido que la mayor ingesta de proteínas podría incrementar la saciedad a corto plazo y por lo tanto, disminuir la aportación energética, existen estudios que no sustentan esta asociación (225, 226, 227).

También el consumo medio de lípidos en la población control y en los pacientes con SM es superior a las recomendaciones siendo del 35-42% en el GC y un 35-45% en pacientes con SM, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 5.2.). (209, 210, 221, 222).

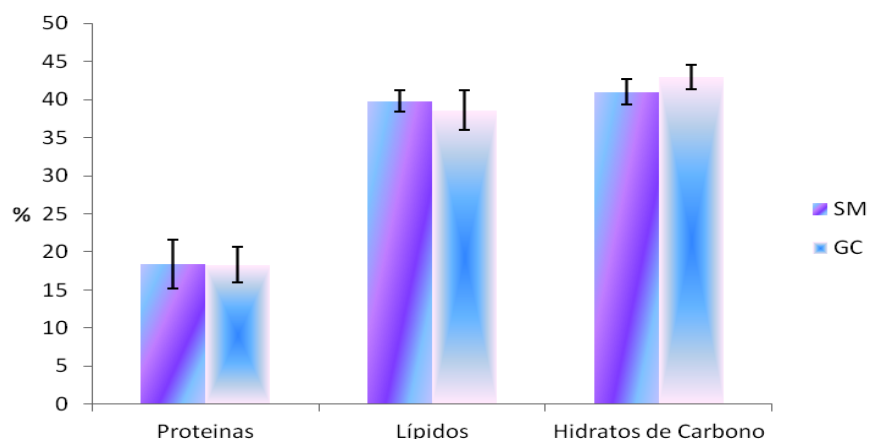


Figura 5.2. Ingesta de macronutrientes en la población con síndrome metabólico y en el grupo control

El consumo de ácidos grasos saturados en el GC es de un 8-12% de la ingesta calórica total con una media de $(22.84 \pm 2.3 \text{ g})$, un 15-17% de ácidos grasos monoinsaturados $(36.55 \pm 2.5 \text{ g})$ y un 4-7% de ácidos grasos poliinsaturados $(12.5 \pm 0.16 \text{ g})$. Siendo el consumo de ácidos eicosapentanoico (EPA $0.24\text{-}0.26 \text{ g}$) y de ácido docosahexanoico (DHA $0.38\text{-}0.45 \text{ g}$) respectivamente, valor muy por debajo de las recomendaciones, que se establecen en una media de entre 1.6 g y 1.1 g.

Estos valores nos indican que la población control cubre las recomendaciones en cuanto a ácidos grasos monoinsaturados, las grasas saturadas se encuentran al límite de las recomendaciones ($\leq 10\%$) y los ácidos grasos poliinsaturados son bajos, si bien cumplen las recomendaciones en cuanto que es inferior a un 10%. El cociente $(AGPI + AGMI)/AGS$ es de 2.2 g, valor que indica que el perfil lipídico es adecuado.

$$\text{Cociente} = \frac{AGPI + AGMI}{AGS}$$

Condición: Si cociente ≥ 2 perfil adecuado.

Siendo:

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados.

AGS: ácidos grasos saturados.

El consumo de ácidos grasos en la población con SM se corresponde con un 11-15% de ácidos grasos saturados $(30.80 \pm 8 \text{ g})$, un 15-17% de ácidos grasos monoinsaturados $(37.9 \pm 7 \text{ g})$ y un 4-6% de ácidos grasos poliinsaturados $(11.85 \pm 3.5 \text{ g})$. Siendo el consumo de ácidos eicosapentanoico (EPA: $0.15 \pm 0.16 \text{ g}$) y de ácido docosahexanoico (DHA: $0.30 \pm 0.3 \text{ g}$) respectivamente, valores muy por debajo de las recomendaciones.

El cociente $(AGPI + AGMI)/AGS$ es de 1.8 g valor que indica que el perfil lipídico no es el adecuado ya que presenta un exceso de ácidos grasos saturados en la dieta (Figura 5.3.).

Los resultados obtenidos para la ingesta total de grasa y para los ácidos grasos saturados en ambos grupos (coincidiendo con otros estudios realizados en la población española), constatan que se encuentran unos valores de ingesta

lipídica aproximadamente del 40%, cifra por encima del límite superior establecido por la EFSA (35%) y unos valores de ingesta de ácidos grasos saturados de un 12%, valores superiores al 10% que recomienda la OMS (228, 229).

Por el contrario, el consumo de ácidos grasos poliinsaturados en nuestros grupos de estudio es inferior al encontrado en otros estudios también en población española y claramente inferior a las recomendaciones establecidas en 2003 por la OMS y por la EFSA, del 6-10% (228, 230).

El consumo medio de colesterol dietético es superior en el grupo control (302 ± 20.5 mg) que en los pacientes con síndrome metabólico (288 ± 16.6 mg) no observándose diferencias significativas entre ambos grupos.

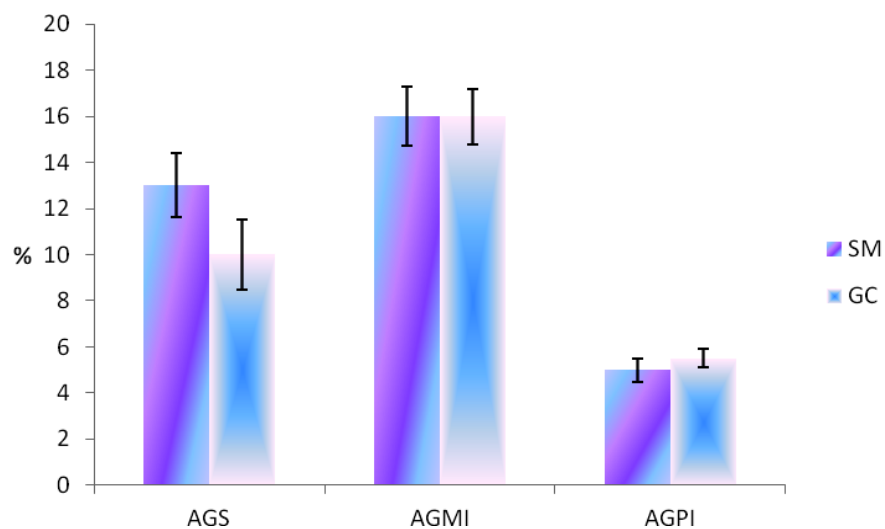


Figura 5.3. Perfil lipídico en la población con síndrome metabólico y en el grupo control

5.2.1.2. Micronutrientes.

5.2.1.2.1. Vitaminas

El consumo de tiamina y de riboflavina tanto en el grupo control como en el grupo de pacientes con síndrome metabólico es superior a las recomendaciones

de ingesta para la población española (Tabla 5.2.) en el rango de edad de nuestros pacientes (231), por lo que, al tratarse de vitaminas hidrosolubles con una escasa o nula toxicidad no supone ningún problema. Sin embargo, si que encontramos diferencias significativas en la ingesta de ambas vitaminas entre los grupos de estudio siendo superior en el caso del grupo control que en el de pacientes con síndrome metabólico. La Tabla 5.2. muestra la ingesta de vitaminas en pacientes con síndrome metabólico y en el grupo control.

Tabla 5.2. Ingesta de vitaminas del grupo control y de los pacientes con síndrome metabólico

	GC	Pacientes con SM
Vitamina C (mg)	123.8 ± 5.74	154.9 ± 3.94
B ₁ (mg)	1.3 ± 0.5*	1.1 ± 0.3
B ₂ (mg)	1.5 ± 0.5*	1.1 ± 0.3
B ₆ (mg)	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1
Vitamina A (µg)	2095.5 ± 79.9	1788.9 ± 95.4
Vitamina D (µg)	4.3 ± 0.7	6.5 ± 0.7*
Vitamina E (mg)	6.4 ± 0.3	5.7 ± 0.2
B ₁₂ (µg)	6.2 ± 0.3	6.3 ± 0.6
Ácido Fólico (µg)	172.8 ± 4.5	150.9 ± 4.9

(*) Diferencias significativas entre GC vs. pacientes con SM, (p < 0.05)

Estas diferencias son interesantes, si tenemos en cuenta que la tiamina está directamente implicada en el metabolismo de la glucosa y sus derivados se relacionan con una mejora de la función endotelial y un descenso del estrés oxidativo (232, 233). También la riboflavina está involucrada en la regulación de los niveles de homocisteína plasmática y ejerce un efecto protector contra el daño tisular asociado con la isquemia-reperfusión (234, 235).

Se observa que el consumo medio de piridoxina en la dieta de los dos

grupos de estudio (Tabla 5.2.) es inferior a las recomendaciones para la población española (1.8 mg hombres y 1.6 mg en mujeres) (331). Este consumo deficitario de vitamina B₆ es un hecho a tener en cuenta si consideramos que un déficit de B₆ se asocia con procesos inflamatorios y un mayor estrés oxidativo. Diversos estudios, sugieren que la vitamina B₆ puede tener influencia sobre la aparición de ECV a través de la regulación de los niveles de homocisteína junto con el ácido fólico y la vitamina B₁₂ (236, 237).

La ingesta de vitamina B₁₂ (Tabla 5.2.) en ambos grupos es superior a las recomendaciones de ingesta, sin embargo, la ingesta de ácido fólico en los dos grupos de estudio es inferior a los 400 µg/día establecidos por la FAO/OMS (338). Estos resultados concuerdan con los datos de ingesta obtenidos para la población española (339). Esta baja ingesta de folato es especialmente preocupante en el grupo de pacientes con síndrome metabólico, puesto que existen estudios que establecen la relación entre vitamina B₁₂ y folato con la obesidad, la hipertensión arterial, el RCV y el SM (240). Otros estudios encuentran que la suplementación con folato y vitamina B₁₂ mejora la RI y la disfunción endotelial y descende los niveles de homocisteína plasmática en pacientes con SM (241).

En cuanto a la ingesta de vitaminas liposolubles A, D y E encontramos una ingesta adecuada de vitaminas A y D en ambos grupos respecto a las recomendaciones, aunque, se observa deficiencia en la ingesta de vitamina E en ambos grupos (Tabla 5.2.) (231).

Esta ingesta de vitamina E por debajo de las recomendaciones es especialmente preocupante si tenemos en cuenta el papel de la vitamina E en la estabilización de las membranas plasmáticas protegiéndolas de la oxidación lipídica, en la regulación de los procesos inflamatorios y en la agregación plaquetaria (242). De hecho, el consumo de vitamina E se ha asociado con un menor riesgo de padecer ECV y DM2 (243, 244).

5.2.1.2.2. Minerales

La ingesta de calcio en el GC y en los pacientes con SM es inferior a las recomendaciones (Tabla 5.3.), no observándose diferencias significativas cuando se comparan los dos grupos de estudio y sí se observan diferencias significativas cuando se comparan con los valores de referencia ($p < 0.05$) (231).

Esta baja ingesta de calcio es preocupante por varios motivos: En primer lugar por la edad de la población estudiada y el papel del calcio en la prevención de la osteoporosis y en segundo lugar por la asociación de la ingesta de calcio dietético con la menor prevalencia de varias patologías relacionadas con el SM como la hipertensión arterial, la RI, y las dislipemias (especialmente en el grupo de pacientes con SM) (245, 246, 247, 248).

La ingesta de hierro es superior en el grupo de pacientes con SM que en el GC, encontrando diferencias significativas entre ambos (Tabla 5.3.). También en el grupo con SM el consumo de hierro es superior a las recomendaciones para la población en este rango de edad (231), y aunque se conoce poco acerca de los efectos de la ingesta de hierro sobre el riesgo CV y la DM, existen algunos estudios que encuentran que una alta ingesta de hierro hemo está asociada con un mayor riesgo de ECV y que anomalías metabólicas relacionadas con la DM tales como dislipidemia pueden potenciar los efectos perjudiciales de la sobrecarga de hierro (249, 250, 251).

En cuanto al consumo de zinc, no encontramos diferencias significativas en el consumo de este mineral entre el GC y los pacientes con SM, (Tabla 5.3.) aunque sí que encontramos ingestas significativamente menores a las recomendadas.

El posible efecto del consumo de zinc sobre las patologías relacionadas con el SM es controvertido, ya que mientras algunos estudios sugieren una modesta relación inversa entre la ingesta de zinc y el riesgo de padecer DM2, otros estudios encuentran que una menor ingesta de zinc se asocia con un incremento de triglicéridos plasmáticos y un descenso de los niveles de HDL-c y otros por el contrario no encuentran una relación entre el estado nutricional respecto al zinc y los marcadores bioquímicos del síndrome metabólico (252, 253, 254).

La ingesta de magnesio es menor en el grupo de pacientes con SM que en el grupo control, (Tabla 5.3.) encontrando diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$). Algunos estudios epidemiológicos y ensayos clínicos recientes indican que la ingesta de magnesio está relacionada inversamente con los componentes individuales del síndrome metabólico, especialmente con la mejora de la sensibilidad a la insulina (255, 256, 257).

El consumo de sodio es inferior a las recomendaciones (2 g), valor positivo

dada la relación entre el consumo de sodio y los valores de presión arterial. Se observan diferencias significativas cuando se comparan con los valores de referencia ($p < 0.05$).

En cuanto al selenio, micronutriente antioxidante, por ser cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, cubre las recomendaciones dietéticas (55 μg en mujeres y 70 μg en hombres).

Las necesidades de potasio quedan ampliamente cubiertas con la alimentación que proporciona (2644.7 ± 567.6 mg) en el grupo control y (2106.1 ± 561.4 mg) en pacientes con síndrome metabólico, observándose diferencias significativas.

En resumen, nosotros no encontramos diferencias suficientes en el patrón de ingesta de nutrientes de los dos grupos de población estudiados que justifiquen el que unos individuos padezcan síndrome metabólico y otros no, a pesar de que existen diferencias significativas en el consumo de algunos de los nutrientes entre ambos grupos.

Tabla 5.3. Ingesta de minerales del grupo control y de los pacientes con síndrome metabólico

	GC	Grupo con SM
Calcio (mg)	784.8 ± 237.2	679.9 ± 252.5
Hierro (mg)	9.4 ± 2.2	$11.1 \pm 2.7^*$
Zinc (mg)	8.7 ± 2.7	7.4 ± 2.1
Magnesio (mg)	$325.18 \pm 19^*$	263.12 ± 27
Sodio (mg)	1725.8 ± 944.8	1478.1 ± 742.7
Potasio (mg)	$2644.7 \pm 567.6^*$	2106.1 ± 561.4
Selenio (μg)	65.0 ± 28.7	80.1 ± 75.0

(*) Diferencias significativas entre el GC vs. pacientes con SM, ($p < 0.05$)

El estudio de los factores nutricionales en relación con las enfermedades crónicas es complejo: ya que los nutrientes no se consumen por separado sino como parte de una matriz alimentaria que interactúa con sus componentes (258) y la interacción entre nutrientes dentro de la matriz alimentaria hace que sea difícil atribuir efectos específicos a un nutriente con independencia de su relación con el resto. Por último, en la mayoría de los casos, la magnitud de las asociaciones entre los factores dietéticos y las enfermedades crónicas son moderadas, y la presencia de un error de medición puede atenuar medidas del efecto y reducir el poder estadístico para detectar esas asociaciones (259).

**6. INFLUENCIA DE UNA BEBIDA
ANTIOXIDANTE SOBRE FACTORES
DE RIESGO CARDIOVASCULAR**

6. INFLUENCIA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La relevancia clínica del SM se debe a diversos factores. Entre ellos, los que guardan relación con patologías cardiovasculares merecen una especial atención por ser la causa de una de las alteraciones más graves y de más rápido crecimiento en el mundo desarrollado en los últimos años.

El SM se caracteriza por una constelación de anormalidades metabólicas como la alteración del metabolismo de la glucosa, obesidad abdominal, dislipemia e hipertensión, que contribuyen a la aparición de enfermedad CV. En el contexto de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) clásicos es conocido que la hipertensión arterial (HTA), la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus (DM) y el tabaquismo, son los FRCV mayores, y la obesidad y el sedentarismo son FRCV condicionantes (260, 261, 262).

No es fácil separar el riesgo correspondiente al SM como tal entidad clínica, del riesgo inherente a cada uno de sus componentes; sin embargo, el papel del SM en el RCV está bien establecido (263, 264).

6.1. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

6.1.1. Toma de muestras

Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas de la vena antecubital de cada sujeto, mediante punción intravenosa por personal sanitario autorizado. Fueron procesadas en los laboratorios de Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (HUVA) y en los Laboratorios de Nutrición Humana y Dietética de la Universidad Católica San Antonio (UCAM).

Los análisis bioquímicos se han realizado sobre plasma, eritrocitos u orina según los parámetros analizados.

6.1.2. Parámetros bioquímicos

6.1.2.1. Glucosa.

El análisis de glucosa se realizó según el test descrito por Tiez, que emplea las enzimas hexoquinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Se trata de un test enzimático en el que la enzima hexoquinasa cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato por ATP. La enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa oxida la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP dando como resultado gluconato-6-fosfato. Por cada molécula de glucosa se forma una de NADPH, por lo que la velocidad de formación de NADPH durante la reacción es directamente proporcional a la concentración de glucosa y puede medirse espectrofotométricamente a 340 nm (265).

La oxidación es exclusiva para la glucosa, no produciéndose la oxidación de otros hidratos de carbono que pudieran interferir en el resultado.

6.1.2.2. Determinación de lípidos en plasma

Las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos, colesterol-HDL y colesterol-LDL, se determinaron en el servicio de análisis clínico del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, de Murcia, por un facultativo especialista. Para cada determinación se utilizó un kit de Roche, excepto para el colesterol-LDL, que se calculó aplicando la fórmula de Friedewald. A continuación se detalla la metodología seguida en cada test.

6.1.2.2.1. Colesterol Total.

La concentración de colesterol total se calculó utilizando un kit adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa.

Los ésteres de colesterol se desdoblan por acción de la colesterol esterasa (CE), a colesterol libre y ácidos grasos. La colesterol oxidasa (CO) cataliza luego la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-ona y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el fenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de colesterol, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula

automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

6.1.2.2.2. Triglicéridos

La concentración de triglicéridos se calculó utilizando un kit enzimático adecuado para el analizador automático de química clínica Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde los triglicéridos de la muestra se determinan enzimáticamente por las enzimas lipasa lipoproteica, glicerol kinasa y glicerol fosfato oxidasa.

Los triglicéridos se desdoblan, por la acción de la lipasa pancreática, a glicerol y ácidos grasos. En presencia de magnesio, el glicerol libre se fosforila por la glicerol kinasa (GK) a glicerol-3-fosfato y en presencia de oxígeno; el glicerol-3-fosfato se oxida por la glicerol fosfato oxidasa (GPO) a dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-aminofenazona y el 4-clorofenol para formar un colorante rojo cuya intensidad es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

6.1.2.2.3. Colesterol-HDL

La concentración de colesterol-HDL se calculó utilizando un kit adecuado para analizador automático de química Roche/Hitachi. El método se basa en un test colorimétrico, donde el colesterol-HDL de la muestra se determina enzimáticamente por las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa acopladas a polietilenglicol (PEG) a los grupos amínicos.

En presencia del sulfato de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos solubles en agua con las partículas HDL, VLDL y quilomicrones (selectivamente en ese orden) otorgándoles una mayor reactividad frente a las enzimas modificadas por PEG.

A continuación la PEG-colesterol esterasa (PEG-CE) provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol-HDL a colesterol-HDL libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol-HDL se oxida por la PEG-colesterol

oxidasa (PEG-CO) a $\Delta 4$ -colesteno y peróxido de hidrógeno.

Bajo la acción catalítica de la peroxidasa (PO), el peróxido de hidrógeno formado reacciona con la 4-amino-antipirina y el HSDA para formar un colorante azul-purpúreo. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol-HDL, que se puede medir fotométricamente. El analizador calcula automáticamente la concentración del analito en cada muestra (mg/dL).

6.1.2.2.4. Colesterol-LDL

Por último la concentración de colesterol-LDL se calculó aplicando la fórmula de Friedewald:

$$LDL = CT - HDL - \frac{TG}{5}$$

CT: colesterol total

HDL: colesterol HDL

TG: triglicéridos

6.1.2.2.5. Albúmina.

Se analizó mediante un test colorimétrico en que la albúmina reacciona con el colorante aniónico verde de bromocresol (BCG) formando un complejo azul verdoso a pH = 4.1.

La intensidad del colorante azul verdoso es directamente proporcional a la concentración de albúmina y se mide mediante la espectrofotometría (266).

6.1.2.2.6. Homocisteína.

La mayor parte de la homocisteína plasmática se encuentra unida a otros compuestos: unida a la albúmina, en forma homocisteína-disulfito, y en forma mixta de disulfito con cisteína. Antes de llevar a cabo la determinación de homocisteína es necesario generar homocisteína libre por reducción.

Los niveles de homocisteína se midieron en un analizador BN ProSpec® (de acuerdo con el protocolo suministrado en el kit de Siemens N Latex HCY

OPAX 03).

La homocisteína y las formas de homocisteína presentes en la muestra se reducen y forman homocisteína libre utilizando el ditioneitol (DTT). La homocisteína libre se convierte en SAH (S-adenosil-L-homocisteína) utilizando la SAH hidrolasa y exceso de adenosina. Por último, se produce la fase de inmunoprecipitación, con formación de inmunocomplejos solubles, cuya concentración es directamente proporcional a la concentración de homocisteína en la muestra (267).

6.1.2.2.7. Proteína C-Reactiva

La Proteína C-Reactiva se analizó mediante inmunoensayo turbidimétrico (PETIA) que utiliza partículas de látex recubiertas con un anticuerpo anti-Proteína C-Reactiva (AbPCR) que se agregan en presencia de esta molécula en la muestra.

El aumento de turbidez que acompaña a la agregación es proporcional a la concentración de PCR y se mide a 340 nm (268).

Los reactivos utilizados, listos para su uso, son:

- Pocillos 1-3 (líquido): partículas recubiertas con anti-PCR, glicina, SDS, inhibidores microbianos (0.3 mg/mL-origen cabra).
- Pocillos 4-6 (líquido): tampón, PEG, inhibidores microbianos-98 mM.

6.1.2.2.8. LDL oxidadas.

Las lipoproteínas LDL oxidadas fueron analizadas mediante un ensayo ELISA en muestras de suero sanguíneo. Ensayo: las muestras que contienen las LDL oxidadas se distribuyen en los pocillos de una microplaca que se encuentra recubierta con anticuerpos de alta afinidad. Durante el primer periodo de incubación, los anticuerpos inmovilizados en la pared de los pocillos capturan al antígeno que se encuentra en las muestras. Después de lavar, los componentes no ligados de las muestras son eliminados.

A continuación es añadido a cada uno de los pocillos un anticuerpo conjugado con peroxidasa. La tetrametilbenzidina (TMB) se utiliza como sustrato para la peroxidasa. Por último, se agrega una solución ácida para dar por finalizada la reacción.

La intensidad del color amarillo que se genera es directamente proporcional a la concentración de LDL oxidada de la muestra. Para finalizar la absorbancia se mide a 450 nm (269).

6.2. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UN BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y LA GLUCEMIA DE PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA

Cuando comparamos el perfil lipídico de los dos grupos de estudio, encontramos en los niveles basales diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores medios de triglicéridos del GC y los pacientes con SM, sin embargo, los niveles de HCL-c y LDL-c y colesterol total fueron similares en ambos grupos (Tabla 6.1.).

En algunos trabajos, de la misma manera que sucede en el nuestro, se ha observado una elevación de los valores de triglicéridos plasmáticos, en pacientes con SM respecto de la población control. Además, algunos investigadores han encontrado diferencias significativas en los niveles basales de HDL-c, LDL-c y los niveles de colesterol en plasma en pacientes con SM en comparación a la población sana (270, 271, 272, 273).

Sin embargo, en otros estudios, de la misma manera que en el nuestro, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de HDL-c, LDL-c y colesterol total en ambos grupos, control y pacientes con SM. Esta disparidad en los resultados puede ser debida a la gran variabilidad interindividual que existe, incluso dentro de un grupo de pacientes con la misma patología (271).

También se han hallado diferencias significativas en los niveles medios de glucosa plasmática entre ambos grupos al inicio del estudio (Tabla 6.1.), resultados que coinciden con los obtenidos por otros autores (272).

Llama la atención que los valores de glucosa plasmática, si bien en el GC están dentro de los límites de referencia para la población sana (73.8-100.08 mg/dL), en el grupo de pacientes con SM encontramos unos valores medios de glucosa plasmática muy superiores al valor límite superior del intervalo de referencia para individuos sanos (Tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Valores basales de los parámetros bioquímicos

Parámetros	GC	SM
Gluc	96.2 ± 3.1	129.0 ± 26.9*
CT	219.9 ± 15.1	220.0 ± 9.0
TG	108.7 ± 14.5	153.8 ± 12.1*
HDL	62.8 ± 6.7	57.5 ± 9.6
LDL	129.5 ± 10.1	139.9 ± 28.1

(*)Diferencias significativas entre el GC vs. pacientes con SM, ($p < 0.05$)

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, Gluc: glucosa plasmática (mg/dL), CT: colesterol plasmático (mg/dL), TG: triglicéridos (mg/dL), HDL: lipoproteínas de alta densidad (mg/dL), LDL: lipoproteínas de baja densidad (mg/dL)

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios que encuentran que el riesgo de padecer DM2 en pacientes con SM es de 3 a 5 veces superior que en pacientes sanos. No en vano, algunos autores definen el SM como una condición patológica asociada a RI e hiperinsulinemia que presenta un alto riesgo de desarrollar DM2 y ECV aterosclerótica (274, 275, 276).

La hiperglucemia es un factor de riesgo por sí mismo que se asocia no sólo a enfermedad microvascular, sino también a enfermedad vascular aterosclerótica, por mecanismos que incluyen la glucosilación de proteínas de la pared arterial, glucosilación de lipoproteínas, acumulación en los tejidos de los denominados productos terminales de la glucosilación, incremento de los procesos oxidativos de la pared arterial y alteraciones de la trombogénesis y de la función endotelial (277).

El consumo del zumo de limón enriquecido con aronia no hace variar los niveles de glucosa durante el periodo de estudio, no observándose modificaciones en los valores de glucosa plasmáticos ni a los 3 ni a los 5 meses de ingesta del zumo antioxidante en ninguno de los dos grupos de estudio (Figura 6.1.).

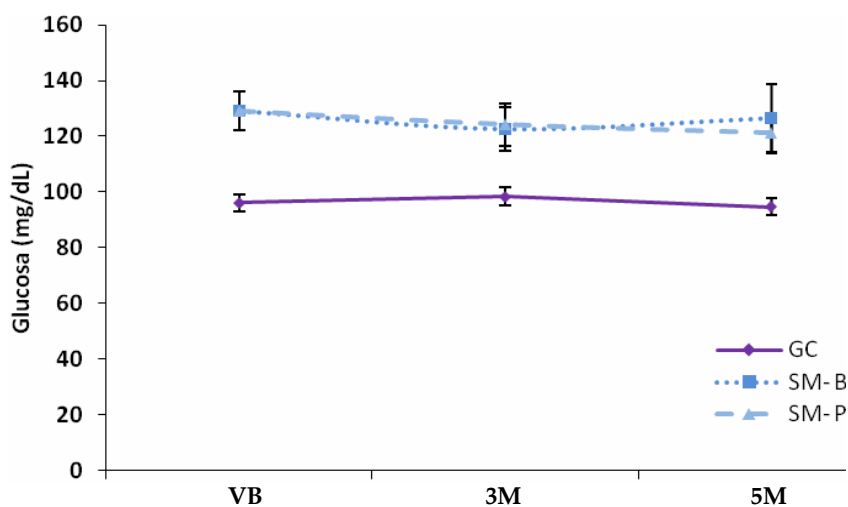


Figura 6.1. Variación de los valores de glucosa plasmática durante los cinco meses de estudio.

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

Sin embargo, después del consumo de la bebida antioxidante, sí que se ha observado una disminución significativa ($p < 0.05$) de los niveles plasmáticos medios de colesterol total, (Figura 6.2.) y LDL-c (Figura 6.3.) en pacientes con SM respecto a los valores basales, aunque estos cambios no se han encontrado ni en el GC, que también consumió la bebida antioxidante, ni en el grupo de pacientes con SM que consumieron la bebida placebo.

El consumo de la bebida antioxidante tiene, por tanto, un efecto beneficioso sobre los valores basales de colesterol plasmático en pacientes con síndrome

metabólico, encontrando tras los cinco meses de ingesta, diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de colesterol plasmáticos entre los pacientes con síndrome metabólico que toman la bebida placebo y los que toman la bebida antioxidante (Figura 6.2.).

Este efecto ha sido observado anteriormente, en pacientes también con SM tratados con antocianinas de "*Aronia Melanocarpa*" (278), sin embargo no se observan variaciones en los valores medios de colesterol plasmático en el grupo control durante el estudio, a pesar de que este grupo, de la misma manera que el grupo con síndrome metabólico, ingiere la bebida anterior. Tampoco se observaron variaciones en el grupo con síndrome metabólico que ingiere la bebida placebo.

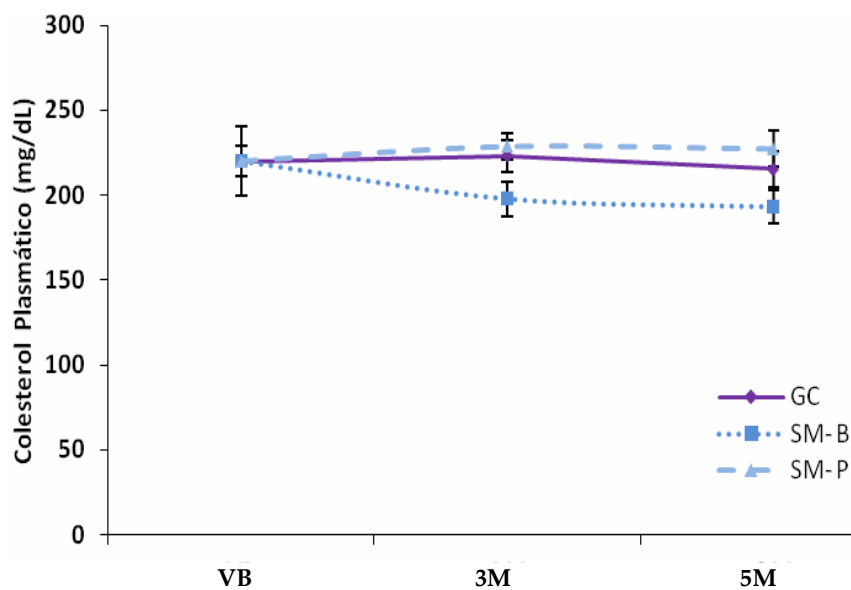


Figura 6.2. Variación de los valores de colesterol plasmático durante los cinco meses de estudio.

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

Este efecto ha sido observado anteriormente, en pacientes también con síndrome metabólico tratados con antocianinas de "*Aronia Melanocarpa*" (278), sin

embargo no se observan variaciones en los valores medios de colesterol plasmático en el grupo control durante el estudio, a pesar de que este grupo, de la misma manera que el grupo con SM, ingiere la bebida anterior. Tampoco se observaron variaciones en el grupo con SM que ingiere la bebida placebo.

Encontramos que el zumo antioxidante tiene un efecto beneficioso igualmente sobre los valores basales de LDL-c en pacientes con SM, aunque de la misma manera que sucedía con los valores de colesterol total, los valores de LDL-c, no se ven afectados por la ingesta del zumo antioxidante en el GC ni por la bebida placebo en el grupo de pacientes con SM. Al final del estudio se hallaron diferencias significativas en los valores de c-LDL entre los pacientes con SM que consume la bebida rica en antioxidantes y los que consumen la bebida placebo.

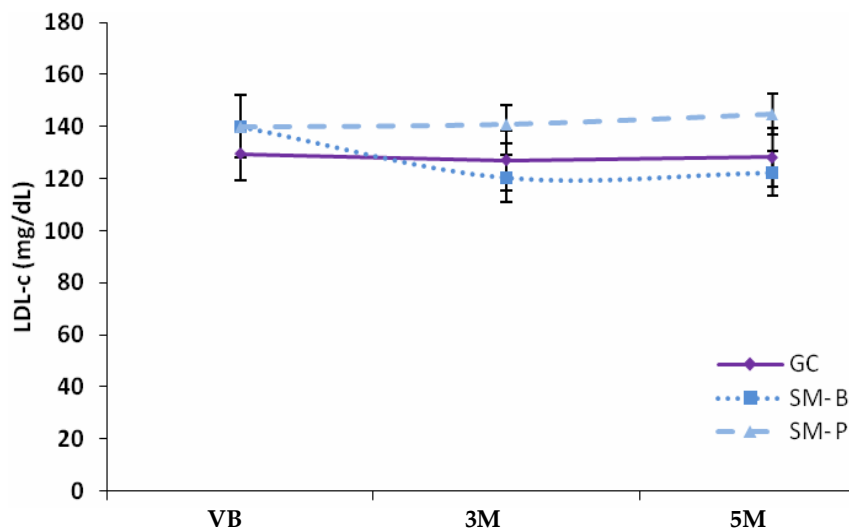


Figura 6.3. Variación de los valores de LDL-c durante los cinco meses de estudio.

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

Este efecto que nosotros observamos tras la ingesta del zumo antioxidante, ha sido observado anteriormente en pacientes también con SM tratados con

antocianinas de "*Aronia Melanocarpa*" (278). Estos autores también encontraron variaciones significativas en el resto de los parámetros del perfil lipídico y en los niveles de glucosa plasmática, aunque nosotros no encontramos estas variaciones significativas en los valores de c-HDL, en ninguno de los grupos de estudio (SM y GC), después del consumo de la bebida placebo o del zumo de limón enriquecido con aronia. (Figura 6.4.).

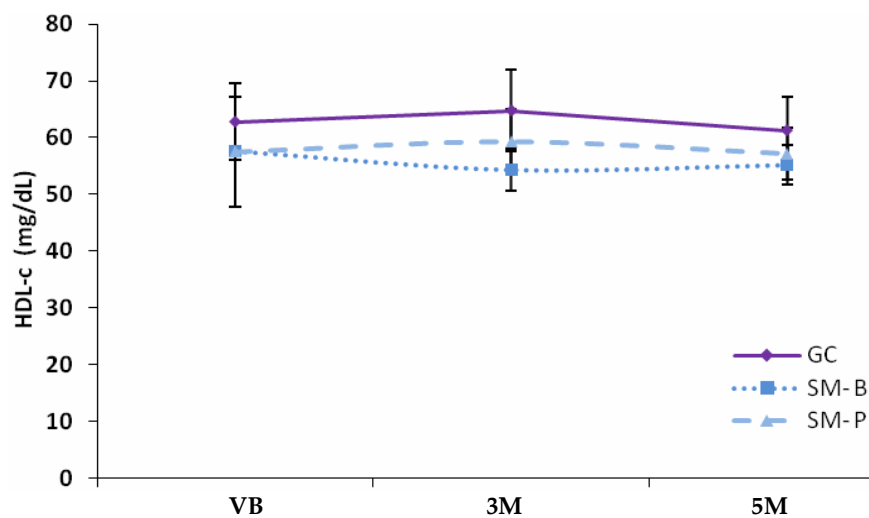


Figura 6.4. Variación de los valores de HDL -c durante los cinco meses de estudio.

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

Tampoco encontramos tras los cinco meses de estudio diferencias entre los niveles de triglicéridos basales y finales en ninguno de los dos grupos (GC y pacientes con SM) y con ninguna de las dos bebidas (bebida antioxidante y bebida placebo). Se mantienen así las diferencias significativas en los niveles de triglicéridos encontrados al comienzo del estudio entre el GC y los pacientes con SM. (Figura 6.5.).

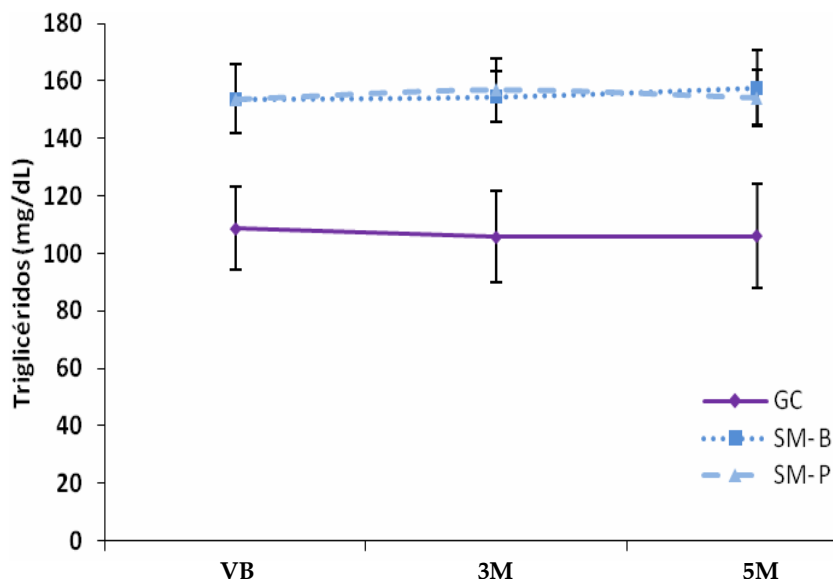


Figura 6.5. Variación de los valores de triglicéridos plasmáticos durante los cinco meses de estudio.

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

6.3. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LA OXIDACIÓN DE LAS LDL EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA

Aunque como se ha comentado anteriormente, los valores de LDL entre los dos grupos de estudio no mostraban diferencias significativas, si que encontramos que los valores de LDL oxidadas eran inicialmente mayores en pacientes con SM en comparación con el GC (96.0 ± 4.1 U/L vs. 86.2 ± 3.9 U/L) encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Las LDL oxidadas están implicadas en la iniciación y progresión de la aterosclerosis, y están elevadas en las personas con alto riesgo de enfermedad cardiovascular. La oxidación de las LDL aumenta la producción de triglicéridos mediante la inducción de la expresión de la lipoproteína lipasa y mediante la

inducción de la acumulación de ácidos grasos en los adipocitos (279, 280).

Después de cinco meses de consumo de la bebida antioxidante, los valores de LDL oxidadas descendieron significativamente ($p < 0.05$) respecto a los valores iniciales en el grupo de pacientes con SM (87.4 ± 5.0 U/L vs. 96.0 ± 4.1 U/L, respectivamente). Sin embargo, esta disminución no se produjo en los pacientes del GC que consumieron la bebida (Figura 6.1.), encontrando a los cinco meses de ingesta prácticamente los mismos valores de LDL oxidadas que al comienzo del estudio (85.18 ± 2.6 U/L).

Tampoco observamos ningún cambio en los valores de LDL oxidadas en el grupo de pacientes con SM que consumieron la bebida placebo durante los cinco meses de estudio (Figura 6.6.).

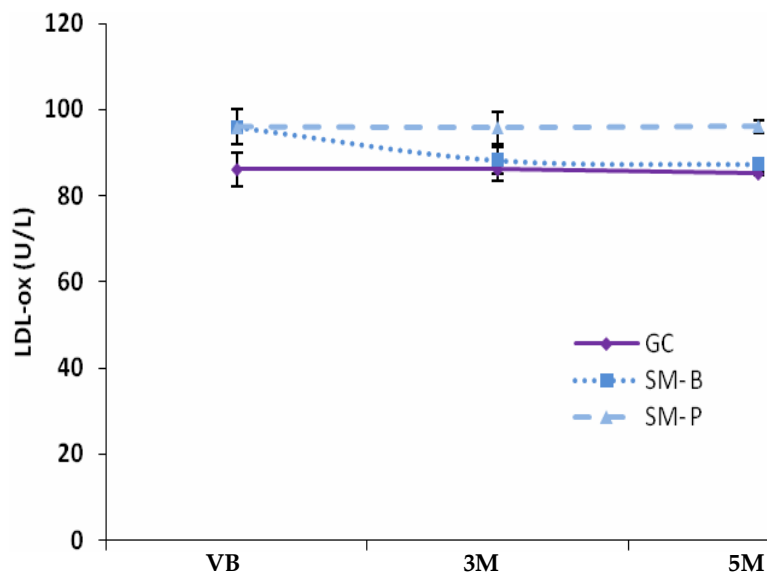


Figura 6.6. Variaciones de las LDL oxidadas tras el consumo de la bebida antioxidante

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

Algunos autores han constatado la presencia de valores de oxidación de las LDL más altos en pacientes con SM en comparación con la población sana, y nuestros resultados están de acuerdo con ellos (281, 282).

Existen estudios (283, 284, 285) que como en nuestro caso encuentran unos niveles superiores de LDL oxidadas en pacientes con hiperglucemia. Esta asociación entre las LDL oxidadas y la hiperglucemia podría ser debida a la reducción de las LDL oxidadas sobre la señalización de la insulina y la absorción de glucosa. Por otra parte, ox-LDL causa la muerte de β -células islote en el páncreas. La hiperglucemia asociada a un aumento de la oxidación de las LDL disminuye las propiedades antioxidantes de la albúmina de suero.

Las LDL oxidadas podrían producir al mismo tiempo un descenso en el almacenamiento de triglicéridos, lo que justificaría en parte las diferencias significativas encontradas también en la concentración de triglicéridos plasmáticos entre ambos grupos de estudio (286).

Chokeberry ("*Aronia Melanocarpa*") contiene compuestos fenólicos incluyendo procianidinas, antocianinas y ácidos fenólicos, y se afirma que es beneficioso en los trastornos o enfermedades asociadas con el estrés oxidativo. Estos beneficios han sido mostrados en estudios preclínicos tanto en condiciones "in vitro" como "in vivo". Estos compuestos presentes en las bayas de aronia constituyen una fuente natural de potentes antioxidantes y algunos trabajos describen los efectos de aronia sobre la oxidación de LDL y la implicación de la vitamina C en la protección de la oxidación de las LDL oxidación mediada por la homocisteína (287, 288, 289).

De la misma manera que nosotros hemos encontrado una disminución significativa del LDL oxidadas en pacientes con SM tras cinco meses de consumo, otros autores encuentran este descenso tras la administración de una dieta rica en antioxidantes (vitaminas E y C) en pacientes adultos mayores (272, 290).

6.4. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LOS NIVELES DE HOMOCISTEÍNA PLASMÁTICA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA

La hiperhomocisteinemia parece tener múltiples acciones que pueden tener efectos negativos sobre el sistema vascular, entre los que se incluyen:

citotoxicidad endotelial, aumento de la agregación plaquetaria, aumento de la activación del sistema de coagulación, y la estimulación de la proliferación de células del músculo liso vascular. La evidencia experimental y clínica sugiere que la hiperhomocisteinemia moderada puede predisponer además, a la disfunción endotelial a través de un mecanismo que implica la generación de especies de oxígeno reactivas. La elevación de la homocisteína plasmática está asociada, por tanto, al riesgo aterogénico y trombogénico (291, 292, 293).

Los niveles de homocisteína total (tHcy) fueron mayores inicialmente en el grupo con SM (11.12 ± 0.16 mmol/L) que en el grupo control (10.78 ± 0.6 mmol/L), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 6.7.). Estos resultados no coinciden con los encontrados por otros autores también en pacientes con síndrome metabólico, en los que encuentran niveles de homocisteína plasmáticos significativamente mayores en los pacientes con síndrome metabólico que en los voluntarios sanos, sin embargo, en nuestro estudio estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre ambos grupos.

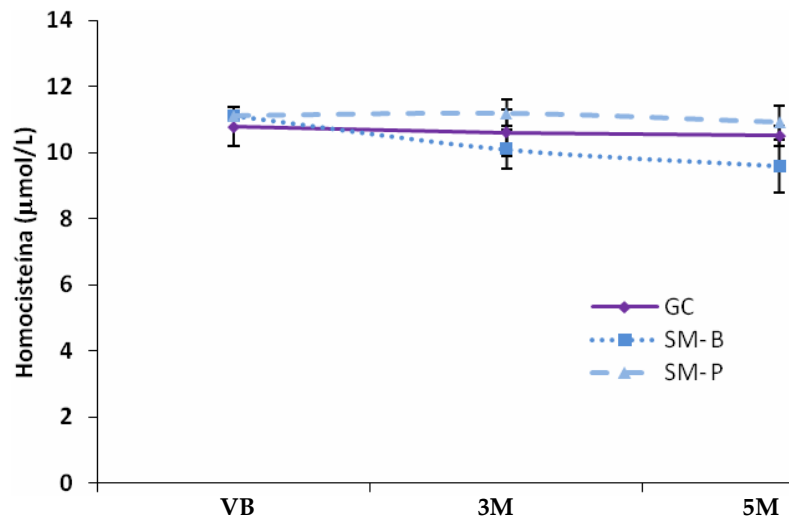


Figura 6.7. Variaciones de la homocisteína plasmática tras el consumo de la bebida antioxidante

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

En ambos grupos los niveles de homocisteína fueron mayores en hombres que en mujeres, encontrando diferencias significativas sólo en los pacientes con SM: hombres 11.9 ± 0.17 mmol/L, mujeres 10.3 ± 0.15 mmol/L. En el GC los niveles de homocisteína en los hombres son 11.7 ± 1.0 mmol/L y en las mujeres 10.36 ± 0.85 mmol/L.

En pacientes con SM después del consumo del zumo rico en antioxidante durante 3 y 5 meses se produjo una disminución significativa de la homocisteína plasmática respecto a los valores basales. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al comparar los valores basales de homocisteína con los obtenidos tras 3 y 5 meses de consumo de la bebida placebo. También se observa una ligera disminución en comparación con los valores basales en los niveles de homocisteína en el GC, aunque en este caso no se han observado diferencias significativas tras el periodo de 3 y 5 meses de ingesta de la bebida (Figura 6.2.).

Skoczynska et al 2007, encontraron una disminución moderada pero significativa de los valores de homocisteína en hombres con hipercolesterolemia leve después de la ingesta de zumo de aronia, y se observó un efecto beneficioso sobre los niveles de homocisteína en pacientes con SM después del consumo de la bebida antioxidante para 3 y 5 meses cuando se compararon con los obtenidos tras el consumo durante el mismo periodo de tiempo de una bebida placebo (294).

6.5. INFLUENCIA DE LA INGESTA DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE LA PROTEÍNA C-REACTIVA COMO MARCADOR DE INFLAMACIÓN EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO RESPECTO A UN GRUPO DE POBLACIÓN SANA

La asociación entre el SM y la inflamación está bien documentada. Actualmente, la proteína C-reactiva se considera un excelente marcador de predicción de SM y riesgo cardiovascular con independencia de la edad, hábito al tabaco, obesidad, presión arterial, perfil lipídico o etnia (295).

La PCR es una proteína de fase aguda, altamente sensible como un marcador de la inflamación general. La PCR induce la producción de otras células inflamatorias y la disminución de la expresión de la sintasa de óxido nítrico, de manera que desde el punto de vista biológico, la PCR está involucrada en el

proceso aterogénico, así como también con otros componentes del SM como la insulina en ayunas, la microalbuminuria, y la alteración de la fibrinólisis. En los adultos los valores de PCR detectados mediante técnicas ultrasensibles se asocian con factores de riesgo tradicionales y su concentración predice eventos cardiovasculares (296, 297).

Rao et al. (278) observaron que en pacientes con SM, de entre todos los biomarcadores inflamatorios y marcadores de estrés oxidativo estudiados, la PCR y los valores de LDL-ox fueron los dos parámetros que con mayor acierto identificaron los individuos con riesgo de desarrollar SM (298).

En nuestro estudio hemos encontrado diferencias significativas en los valores medios de PCR entre los dos grupos (CG y SM) con valores medios basales de 0.22 ± 0.09 mg/dL en pacientes del GC, y 0.53 ± 0.08 mg/dL en pacientes con SM (Figura 6.3.). Pese a que encontramos estas diferencias, en ninguno de los dos grupos, control y pacientes con SM, los valores encontrados para PCR se consideran indicativos de riesgo cardiovascular alto.

Otros estudios encontraron también valores más altos de PCR en pacientes con SM que en población sana (299, 300).

Después de cinco meses de consumo de bebida antioxidante se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de PCR (0.17 ± 0.01 mg/mL) en comparación con el valor basal en los pacientes con SM, sin embargo, no se observaron cambios significativos en el grupo control y en los pacientes con síndrome metabólico tras la ingesta de la bebida placebo después de cinco meses de estudio (Figura 6.8.).

Estudios anteriores han encontrado que la ingesta de antioxidantes parece tener un efecto positivo sobre los valores de PCR. Nosotros apoyamos estos resultados con los nuestros, ya que aunque los valores de PCR no eran indicativos de RCV al comienzo del estudio, tras la ingesta de la bebida antioxidante los valores de PCR que inicialmente eran mayores en el grupo con síndrome metabólico, se igualan a los del GC (301, 302).

La inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel crítico en las ECV. El SM se produce a menudo con coincidencia de ambas variables, aumentando el RCV de los pacientes. La administración de bebida antioxidante ha demostrado

tener efectos beneficiosos sobre algunos parámetros del perfil lipídico, con una reducción beneficiosa de colesterol plasmático, HDL-c y LDL-c en el SM respecto a los valores basales, también, encontramos mejoró ox-LDL, PCR y Hcys después de cinco meses de consumo.

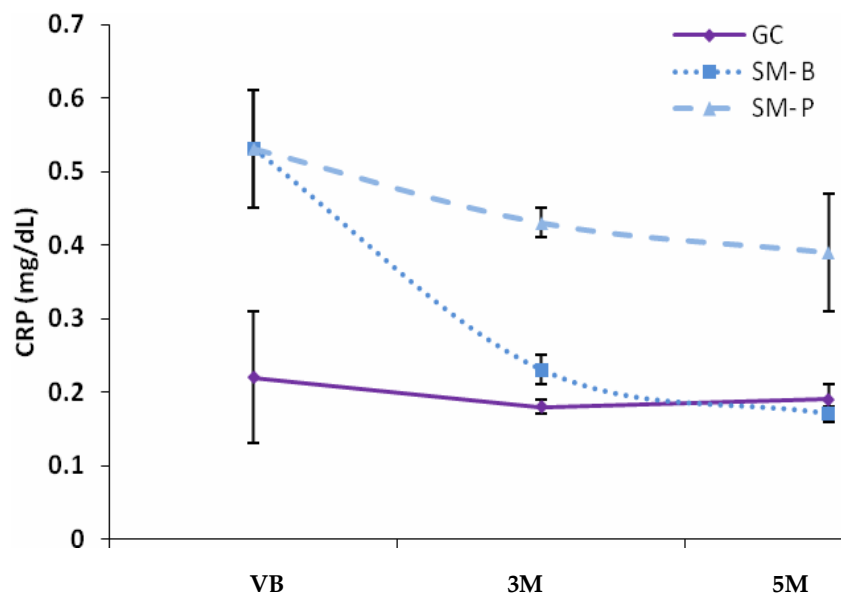


Figura 6.8. Variaciones de la PCR tras consumo de la bebida (B)

GC: grupo control, SM: pacientes con síndrome metabólico, P: bebida placebo, B: bebida de estudio, VB: valores basales, 3M: resultados a los 3 meses de estudio, 5M: resultados a los 5 meses de estudio.

Considerando que no se encontraron cambios significativos en estos parámetros cuando el grupo de pacientes con síndrome metabólico consumió la bebida placebo y en el grupo de voluntarios sanos (GC).

Aunque se necesitan más investigaciones en esta área, es interesante notar que el zumo de fruta natural puede tener un efecto beneficioso en el corto y medio plazo en los parámetros bioquímicos predictivos de ECV.

**7. EFECTO DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE
SOBRE EL ESTADO ANTIOXIDANTE
Y BIOMARCADORES DE
ESTRÉS OXIDATIVO**

7. EFECTO DE UNA BEBIDA ANTIOXIDANTE SOBRE EL ESTADO ANTIOXIDANTE Y BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

7.1. INTRODUCCIÓN

La vida sedentaria y el consumo elevado de calorías son las causas más importantes del incremento de la prevalencia del SM (303). El SM es uno de los mayores problemas de salud pública y se caracteriza por una alteración del estado oxidativo y por una inflamación subclínica, ambos responsables del desarrollo de la aterosclerosis (304, 305).

El estrés oxidativo se relaciona con la etiología de un gran número de enfermedades crónicas, entre las que se encuentra el SM y con el envejecimiento en general (306). Además el estrés oxidativo asociado al SM contribuye al desarrollo de la enfermedad (307). Sin embargo no todos los autores coinciden en la presencia de estrés oxidativo en el SM (308).

La insulinoresistencia está relacionada con el estrés oxidativo (EO) (309). Se plantea que el EO puede inducir insulinoresistencia al provocar fosforilación de los receptores de insulina (310). Otros autores han postulado que los mecanismos antioxidantes serían los responsables del deterioro de la acción de la insulina (311). Se señala el papel del EO sobre la insulinoresistencia a través de las citoquinas pro-inflamatorias, cuyos niveles se encuentran elevados en el SM. La activación del sistema renina, angiotensina, aldosterona también se involucra en la producción del EO y el consiguiente daño endotelial en el SM (312).

Esposito et al. (313) observaron que pacientes con SM presentan estrés oxidativo asociado con un incremento de la resistencia a la insulina y una disfunción endotelial. Estas alteraciones pueden aumentar los desórdenes metabólicos y vasculares (314, 315).

7.2. OBJETIVOS

- Analizar el estado antioxidante (superóxido dismutasa, glutathion peroxidasa y glutathion reductasa) y diferentes biomarcadores de estrés oxidativo (oxidación de DNA, oxidación de proteínas, oxidación de lípidos, LDL-oxidadas y cociente glutathion reducido/glutathion oxidado), en pacientes con SM comparados

con un grupo control.

- Analizar el efecto de una bebida con zumo de limón y aronia (B) sobre el estado antioxidante y los biomarcadores de estrés oxidativo descritos.

La muestra poblacional y el diseño del estudio se han descrito en el capítulo 4.

7.3. MATERIAL Y MÉTODOS

7.3.1. Marcadores del estado antioxidante

7.3.1.1. Estado antioxidante total.

El Estado Antioxidante Total (TAS) ha sido cuantificado por el método ORAC.

Es el único método que combina en un solo valor el tiempo y velocidad de inhibición del daño oxidativo y proporciona una orientación aproximada de la capacidad antioxidante de los alimentos en el organismo.

Con este ensayo se mide la degradación oxidativa de la fluoresceína al ser atacada por el 2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihidro-clorido (AAPH) (316). Este método se basa en la diferente emisión fluorescente de la β -PE en el proceso de oxidación inducido por el radical AAPH (317).

El método ORAC cuantifica la capacidad antioxidante como el área de protección neta en la curva de disminución de fluorescencia en presencia de un antioxidante. Por tanto, surge el concepto de integración al considerar esta área neta reflejando a la vez el tiempo (rapidez) y la extensión (cantidad) en la capacidad antioxidante (disminución de la emisión fluorescente).

La solución stock de fluoresceína (FL) (4 μ M) se realizó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4 y se conservó a -20 °C durante un máximo de cuatro semanas. La solución de FL se preparó en tampón fosfato sódico mediante una dilución de la disolución stock, a una concentración final de 6 mM.

La concentración de la disolución stock de ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox C) utilizada para la elaboración de la recta

patrón fue de 0.25 mM y se preparó en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4. El suero se diluyó en tampón fosfato sódico 75 mM pH 7.4.

El radical AAPH se preparó diariamente a una concentración 127 mM en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

Las medidas de capacidad antioxidante por el método ORAC-FL se llevaron a cabo en un lector de microplacas Synergy HT multi-detecmicroplatareader de Biotek Instruments, Inc (Winooski, VT, USA), utilizando placas de 96 pocillos de poliestireno con paredes negras y fondo transparente de Nalge Nunc International (Roskilde, Denmark). La fluorescencia de las muestras se leyó por el fondo claro de la placa, usando una longitud de onda de excitación de 485/20 nm, y un filtro de emisión de 528/20 nm. El lector de placas fue controlado por el software KC4, versión 3.4.

La capacidad de absorción del radical se determinó por el método descrito por Dávalos et al. (318) con ligeras modificaciones (319). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4, en un volumen final de 200 μ L, compuesto por 100 μ L de solución de FL (con una concentración final de 3 nM), 0-70 μ L de bebida antioxidante, 30 μ L de AAPH (con una concentración final de 19 mM) y el resto, hasta completar los 200 μ L, tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.4.

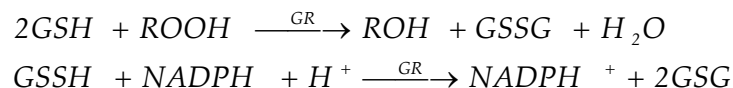
La mezcla de reactivos en ausencia del radical AAPH se incubó durante 30 minutos a 37 °C, dispensando inmediatamente después la solución del radical, usando para ello una pipeta multicanal. Seguidamente la microplaca se colocó en el lector y la fluorescencia fue registrada cada segundo y cada 14 segundos durante 2 horas. La microplaca se agitó automáticamente antes de cada lectura. En cada ensayo se realizó un blanco que contenía FL y AAPH con tampón fosfato sódico. Se realizó una recta de calibrado con 8 concentraciones diferentes de Trolox, resultando la ecuación $y = 1.427x + 0.04$ ($r^2 = 0.9959$).

7.3.1.2. Enzimas antioxidantes

7.3.1.2.1. Glutation peroxidasa

La glutacion peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del glutacion (GSH) por el hidroperóxido de cumeno. La glutacion reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertida en su forma reducida con una oxidación

concomitante de NADPH en NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm. (320). Para los análisis se utilizó el kit RS 504 (laboratorios Randox).



Se utiliza sangre heparinizada por lo que se recomienda el reactivo de Drabkin para su dilución debido a que la presencia de peroxidasas en la sangre humana puede conducir a falsos resultados (más elevados). La adición de cianuro sirve para inhibir esta interferencia positiva.

La concentración de glutathion peroxidasa se calcula a partir de la siguiente fórmula:

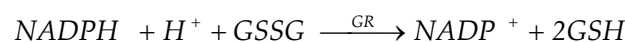
$$\frac{U}{L} \text{ de hemolisado} = 8412 * \Delta A_{340 \text{ nm}} / \text{min}$$

Los resultados se expresan finalmente en U/g Hb (unidades enzimáticas/g de hemoglobina) calculados a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Valor de la muestra} = \frac{\text{Unidades GPx}}{100 \text{ m} \div \text{g Hb}} // \text{ dL}$$

7.3.1.2.2. Glutathion reductasa

La glutathion reductasa (GR) cataliza la reducción del glutathion (GSSG) en presencia de NADPH, el cual es oxidado a NADP⁺. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm. Para los análisis se utilizó el kit GR 2368 suministrado por laboratorios Randox (321).



Se centrifuga 0.5 mL de sangre total durante 5 minutos a 2000 r.p.m. y se elimina el plasma lavando tres veces (resuspendiendo en una solución de NaCl al 0.9% y centrifugando 5 minutos a 2000 r.p.m. cada vez). A continuación se lisan las células resuspendiéndolas en 0.5 mL de agua bidestilada fría, se dejan 10

minutos entre 2 y 8 °C y se centrifuga el lisado durante 5 minutos a 2000 r.p.m. Finalmente se diluyen 100 µL de lisado con 1.9 mL de NaCl al 0.9% y se analiza.

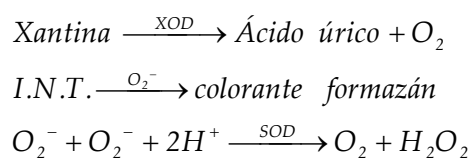
Para el cálculo de resultados debemos conocer los valores de hemoglobina del individuo. La concentración de GR se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{u}{L} = 4983 \times \Delta A \ 340 \frac{nm}{min}$$

7.3.1.2.3. Superóxido dismutasa

La función de la superóxido dismutasa (SOD) es acelerar la dismutación de un radical tóxico, el radical superóxido (O_2^-), producido durante un proceso oxidativo energético, en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (322). Para los análisis se utilizó el kit SD 125 suministrado por laboratorios Randox.

Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, los cuales reaccionan con cloruro de 2-(yodofenil)-3(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. Se mide la actividad de la superóxido dismutasa espectrofotométricamente por el grado de inhibición de esta reacción.



Se utilizan muestras de sangre entera heparinizada o con EDTA. Para ello se centrifugan 0.5 mL de sangre entera durante 10 minutos a 3000 r.p.m. y después se lavan los eritrocitos cuatro veces (con solución Na Cl al 0.9% centrifugando después de cada lavado). El lavado de eritrocitos se completa con agua bidestilada fría, se mezcla y se deja reposar durante 14 minutos a 4 °C. Finalmente el lisado se diluye con Tampón Fosfato pH 7.0.

La concentración de superóxido dismutasa se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{A_2 - A_1}{3} = \frac{\Delta A}{\text{min}} \text{ de patrón o de muestra}$$

Todos los índices tanto de los patrones como de las muestras diluidas deben ser convertidos en porcentajes del índice del blanco y sustraídos del 100% para obtener un porcentaje de inhibición:

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ patrón} / \text{min} * 100)}{\Delta ASL / \text{min}} = \% \text{ inhibición}$$

$$\frac{100 - (\Delta A \text{ muestra} / \text{min} * 100)}{\Delta ASL / \text{min}} = \% \text{ inhibición}$$

Se utiliza el porcentaje de inhibición de la muestra para obtener las unidades de SOD de la curva patrón según:

$$\begin{aligned} \text{UU de SOD} / \text{mL de sangre entera} &= \\ &= \text{UU de SOD en la curva patrón} / \text{mL} \times \text{factor de dilución} \end{aligned}$$

Los resultados finales se expresan en U/g Hb conseguidos a través de la siguiente fórmula, una vez conocidos los gramos de hemoglobina del individuo.

$$\frac{\text{Unidades SOD} / \text{mL}}{\text{g Hb} / \text{mL}} = \text{Unidades de SOD} / \text{g de hemoglobina}$$

7.3.2. Biomarcadores de estrés oxidativo

7.3.2.1. 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG). Marcador de oxidación al DNA

Se analizó a través de un ensayo competitivo por absorción ligado a

enzimas (ELISA) en suero. Para su análisis se utilizó el kit KOG-200SE suministrado por JaICA (Japan Institute for the Control of Aging). Se ha seguido el siguiente protocolo: a) Se añade el anticuerpo primario y la muestra a la placa de 96 pocillos (el anticuerpo primario reacciona competitivamente con la 8-OHdG de la placa y de la muestra, por lo tanto cuanto más concentración de 8-OHdG haya en la muestra, menos unión habrá entre el anticuerpo primario y la 8-OHdG de la placa), b) se lava la placa para eliminar los anticuerpos que se han unido a la muestra, c) se añade a la placa el anticuerpo secundario que se unirá con el anticuerpo primario que queda en la placa, d) se vuelve a lavar la placa para eliminar el anticuerpo secundario que queda sin unir, f) se adiciona la solución cromógena. El color se desarrollará en proporción a la cantidad de anticuerpo unido a la placa. Al terminar la reacción se mide la absorbancia a 450 nm (323).

7.3.2.2. Grupos carbonilo. Marcadores de oxidación proteica

Se analiza mediante un ensayo ELISA en muestras de suero sanguíneo. Para el análisis se ha utilizado el kit PCKIT P081 suministrado por Bio Cell Corporation Limited.

La concentración de grupos carbonilo en una muestra proteica se determina por derivatización con dinitrofenilhidracina (DNP). El método ELISA permite medir cuantitativamente grupos carbonilo en cantidades de microgramos de proteína. El principio del ensayo es el siguiente: las proteínas de la muestra reaccionan con el DNP, quedando el DNP-proteína ligada a la placa ELISA. El DNP no conjugado y los constituyentes no proteicos son eliminados mediante un lavado. A continuación la DNP-proteína absorbida reacciona con el anti-DNP-biotín anticuerpo y se une la estreptavidina HRP a este complejo. Posteriormente se añade el agente cromático que contiene peróxido, el cual cataliza la oxidación produciendo color. Para finalizar se mide la absorbancia a 450 nm (324).

7.3.2.3. Isoprostanos. Marcadores de oxidación lipídica

Los isoprostanos son sustancias similares a las prostaglandinas y son producidos por la peroxidación de las lipoproteínas por los radicales libres.

Los isoprostanos fueron analizados mediante un ensayo competitivo ELISA

en muestras de orina. Para su análisis se utilizó el kit EA 85 suministrado por Oxfor Biomedical Research. Se determinan los niveles de 15-isoprostanos F_{2t} (el isoprostano mejor caracterizado) en muestra de orina. Las muestras se mezclan con un tampón que elimina las interferencias debido a una unión no específica. E15-isoprostano F_{2t} de las muestras compete con el 15-isoprostano F_{2t} conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) por el anticuerpo policlonal específico para 15-isoprostanos F_{2t} , que está inmovilizado en la microplaca. La actividad de la HRP da como resultado una coloración cuando se añade el sustrato y la intensidad de color será proporcional a la cantidad de 15-isoprostano F_{2t} en la muestra. Para finalizar medimos la absorbancia a 450 nm (325).

7.3.2.4. LDL oxidadas.

Las lipoproteínas LDL oxidadas fueron analizadas mediante un ensayo ELISA en muestras de suero. Para su análisis se ha utilizado un kit 7810 suministrado por Immun Diagnostik. Ensayo: las muestras que contienen las LDL oxidadas se distribuyen en los pocillos de la microplaca, la cual está recubierta con anticuerpos de alta afinidad. Durante el primer periodo de incubación, los anticuerpos inmovilizados en la pared de los pocillos capturan al antígeno que se encuentra en las muestras. Después de lavar, los componentes no ligados de las muestras son eliminados. A continuación es añadido a cada uno de los pocillos un anticuerpo conjugado con peroxidasa. La tetrametilbenzidina (TMB) se utiliza como sustrato para la peroxidasa. Por último, se agrega una solución ácida para dar por finalizada la reacción. La intensidad del color amarillo que se genera es directamente proporcional a la concentración de LDL oxidada de la muestra. Para finalizar la absorbancia se mide a 450 nm (326).

7.3.2.5. Cociente GSH/GSSG

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido (γ -Glutamilcisteinilglicina) con un grupo tiol libre. Es un antioxidante que proporciona equivalentes reductores a la enzima glutatión peroxidasa, enzima que cataliza la reducción de peróxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno. Durante este proceso el GSH pasa a GSSH, que es reciclado a glutatión reducido por la enzima glutatión

reductasa y β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Cuando las células son expuestas a estrés oxidativo, la relación GSH/GSSH disminuye como consecuencia de la acumulación de GSSH.

La determinación GSH/GSSH se utiliza como indicador de estrés oxidativo y para monitorizar la efectividad de intervenciones con antioxidantes.

Hemos utilizado el Kit OxisResearch TM. Bioxytech GSH/GSSH-412 TM. El método utiliza el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico o DTNB), el cual reacciona con GSH para formar un producto detectable espectrofotométricamente a 412 nm. El GSSH puede ser determinado por reducción de GSSH a GSH, el cual es determinado por la reacción con el reactivo de Ellman.

El método de Tietz utiliza el cambio de color desarrollado durante la reacción y la velocidad de reacción es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSH.

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Estado antioxidante

7.4.1.1. Actividad antioxidante total

La actividad antioxidante total es superior en los pacientes con síndrome metabólico (1919.9 ± 150 mM Trolox) que en el grupo control (1703.0 ± 122.7 mM Trolox), observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) (Tabla 7.1.). Estos resultados no coinciden con los resultados observados por Demircan et al., (327) que observaron valores inferiores en la actividad antioxidante total en pacientes con síndrome metabólico y coinciden con los resultados observados por diferentes autores (328, 329). No se observan diferencias significativas respecto al sexo ($p \geq 0.05$), contrariamente a los resultados observados por Kaya et al., (330) que observaron valores inferiores en la actividad antioxidante en hombres que en mujeres.

Tras el consumo de la bebida antioxidante por los pacientes con síndrome metabólico durante cinco meses no se observan diferencias significativas en los

valores de la actividad antioxidante total (1992.4 ± 88.0 mM Trolox). El consumo de una bebida placebo durante cinco meses no produce variaciones significativas en la actividad antioxidante total (2028 ± 130.4 mM Trolox) (Figura 7.1.).

En el grupo control, tras la ingesta de la bebida antioxidante durante cinco meses se produce un aumento de la actividad antioxidante total, observándose diferencias significativas respecto a los valores iniciales ($p < 0.05$) (Figura 7.1.).

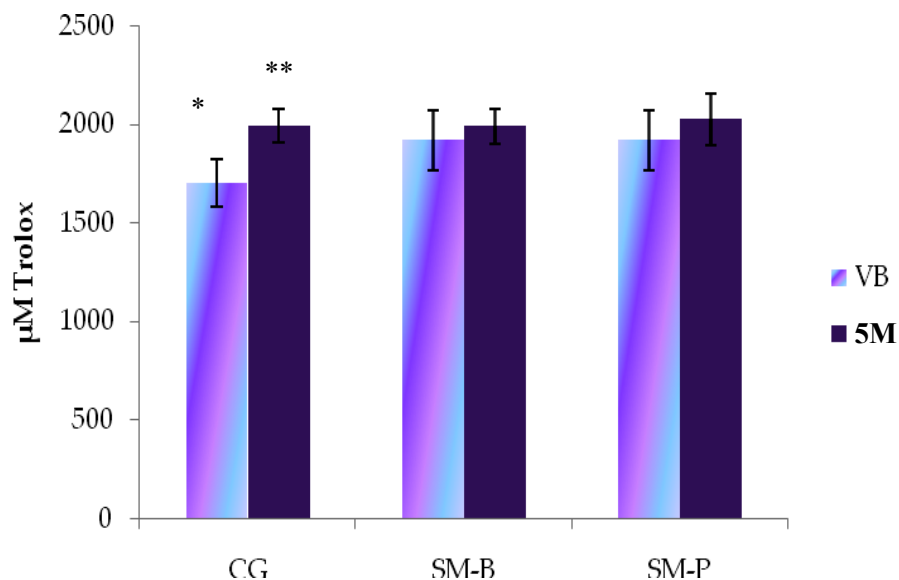


Figura 7.1. Actividad antioxidante (μM de Trolox) inicialmente y tras el consumo de una bebida antioxidante (SM-B) o una bebida placebo (SM-P), durante 5 meses, por pacientes con SM, comparados con un GC.

VB: valores basales, 5M: valores tras 5 meses de consumo de bebida antioxidante (B), CG: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo (P).

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos SM y GC

(**) Diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después del consumo de bebida antioxidante (SM-B) o placebo (SM-P)

Los compuestos fenólicos, mayoritarios en una gran variedad de bayas incluyen ácidos fenólicos, antocianos, flavonoles, proantocianidinas y estilbenos, y presentan elevada actividad antioxidante “*in vivo*” e “*in vitro*”. (331)

Pilaczynska-Szczesniak et al., (332) observaron un aumento de la actividad antioxidante tras la administración de un extracto de antocianos procedente de aronia negra en ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”.

7.4.1.2. Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa presenta valores superiores en el grupo control (947.8 ± 27.2 Ug/Hg) que en pacientes con síndrome metabólico (853.8 ± 25.4 Ug/Hg), al comienzo del estudio, observándose diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 7.2.). En ambos grupos analizados los valores son superiores en mujeres que en hombres, sin embargo, estas diferencias no son significativas a nivel estadístico ($p \geq 0.05$). Estos resultados coinciden con los observados en otros estudios (333, 334). Sagar et al., (335), observan valores medios inferiores de SOD en individuos con hipertensión arterial

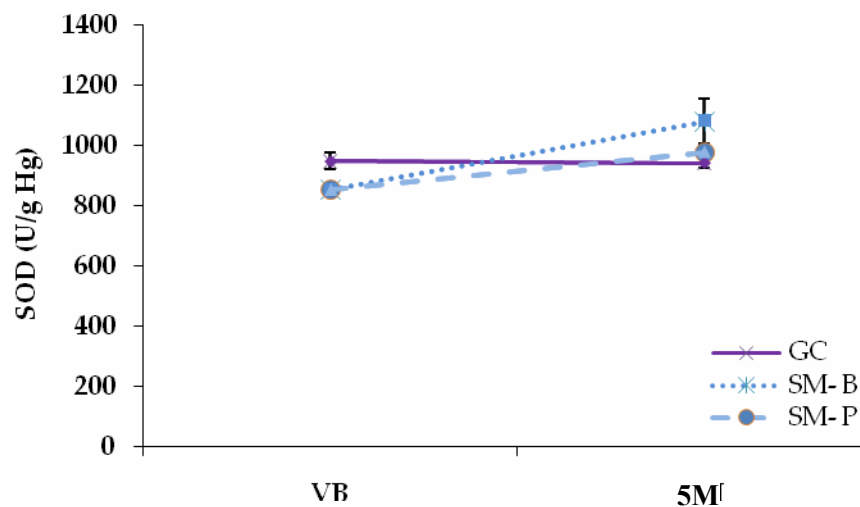


Figura 7.2. Valores de la enzima SOD (U/g Hg), en el grupo control y en los pacientes que han consumido la bebida antioxidante (B) durante cinco meses.

GC: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$)

Sánchez-Rodríguez et al., (336) y Pizen et al., (337) observaron valores similares en la actividad de la enzima SOD en el grupo control y en pacientes con

síndrome metabólico, resultados que no coinciden con los observados en nuestro estudio.

Tras el consumo de una bebida antioxidante (B) por los pacientes con síndrome metabólico durante cinco meses, se encuentra un aumento de la actividad de la enzima SOD de 853.8 ± 25.4 Ug/Hg a 1080.8 ± 75.47 Ug/Hg, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 7.2.). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chen et al., (338) quienes encontraron un aumento en la actividad de la enzima SOD tras el consumo de un suplemento de vitamina C y por Broncel et al (339) después del consumo de un suplemento de "Aronia Melanocarpa" en pacientes con síndrome metabólico.

En el grupo control, tras el consumo de la bebida antioxidante no se observan diferencias significativas en los valores de la enzima SOD (947.8 ± 27.2 Ug/Hg inicialmente y 942.5 ± 22.2 tras 5 meses de consumo de la bebida (B).

El consumo de la bebida placebo (P) en los pacientes con síndrome metabólico no modifica los valores de la enzima SOD (Figura 7.2.).

7.4.1.3. Glutation reductasa

Los valores medios de la enzima glutacion reductasa (U/L) son superiores en el grupo control que en los pacientes con síndrome metabólico, observándose diferencias significativas (grupo control: 59.5 ± 10.1 U/L y pacientes con síndrome metabólico: 50.3 ± 8.2 U/L) (Tabla 7.1.).

En ambos grupos la media de los valores de la enzima glutacion reductasa es superior en las mujeres que en los hombres, siendo 56.3 ± 7.5 U/L en hombres y 62.3 ± 11.3 U/L en mujeres en el grupo control y 47.8 ± 8.8 U/L en hombres y 52.2 ± 7.3 U/L en mujeres en los pacientes con síndrome metabólico, no observándose diferencias significativas (Tabla 7.1.).

Tras el consumo de la bebida antioxidante aumenta la actividad de la enzima glutacion reductasa tanto en el grupo control como en pacientes con síndrome metabólico, observándose diferencias significativas.

Tras la ingesta de la bebida placebo (P) por los pacientes con síndrome metabólico no se observan cambios en la actividad de la enzima glutacion

reductasa (Tabla 7.1.).

Tabla 7.1. Valores de la enzima glutathion reductasa (U/L) inicialmente y tras el consumo de una bebida antioxidante (B) o placebo (P) durante 5 meses.

		Glutathion reductasa (U/L)
Basal	GC	59.3 ± 2.3*
	SM	50.0 ± 1.9
5 meses	GC-B	60.3 ± 1.4
	SM-P	54.5 ± 1.9
	SM-B	57.7 ± 1.5*

GC: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B); SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo

(*) Diferencias significativas, ($p < 0.05$)

7.4.1.4. Glutathion peroxidasa

Los valores medios de la enzima glutathion peroxidasa (U/L) al comienzo del estudio son superiores en el grupo control que en los pacientes con síndrome metabólico, no observándose diferencias significativas entre ambos.

Se observa que en el grupo control, el valor medio de de glutathion peroxidasa es superior en los hombres (8565 ± 1957 U/L) que en las mujeres (7479 ± 1957 U/L), sin embargo en los pacientes con síndrome metabólico es superior en las mujeres (6979 ± 1036.4 U/L en hombres y 7536.1 ± 1761.6 en mujeres) no observándose diferencias significativas (Tabla 7.2.).

Varios autores (340, 341, 342) observaron valores inferiores de la enzima glutathion peroxidasa en pacientes con síndrome metabólico, resultados que coinciden con los observados en nuestro estudio. Sin embargo otros autores (339, 340) observan valores superiores en la actividad enzimática de la glutathion peroxidasa en pacientes con síndrome metabólico respecto a la población sana (337, 343).

Varios estudios (333, 334), han observado niveles inferiores de las enzimas

glutathion peroxidasa y glutathion reductasa en individuos hipertensos cuando se comparan con un grupo control.

Tabla 7.2. Valores de la enzima glutathion peroxidasa (U/L) inicialmente y tras el consumo de una bebida antioxidante (B) o placebo durante cinco meses.

		Glutathion peroxidasa (U/L)
Basal	GC	7913.6 ± 265
	SM	7257.5 ± 432
5 meses	GC-B	9934.0 ± 492*
	SM-P	7932.0 ± 536*
	SM-B	9453.1 ± 566*

GC: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B); SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo

(*) Diferencias significativas, ($p < 0.05$)

Tras la ingesta de la bebida antioxidante durante cinco meses por el grupo control y por los pacientes con síndrome metabólico se observa un aumento en los valores de la enzima glutathion peroxidasa. Este incremento no se ha observado en los pacientes con síndrome metabólico que consumieron la bebida placebo (P).

Esposito et al., (344) observaron que los pacientes con síndrome metabólico tenían niveles superiores de estrés oxidativo y lo asociaron con un aumento de la resistencia a la insulina y una disfunción endotelial. Estas alteraciones pueden interactuar entre sí y amplificar el conjunto de alteraciones metabólicas y vasculares. De hecho, en cada uno de los trastornos que caracterizan al síndrome metabólico (diabetes, obesidad, hipertensión e hiperlipidemia) hay alteración de la función endotelial, que responde mal a los estímulos de relajación, como la acetilcolina o el aumento del flujo. La disfunción del endotelio podría obedecer a

la menor disponibilidad de óxido nítrico (ON), necesario para la relajación vascular (345).

Algunos estudios (346, 347) muestran que la resistencia a la insulina, la hipertensión y la obesidad (factores de riesgo asociados a nuestros pacientes con síndrome metabólico), producen una menor resistencia al estrés oxidativo debido a la disminución de las defensas antioxidantes, resultados que coinciden con los observados en nuestro estudio.

7.4.2. Biomarcadores de estrés oxidativo

7.4.2.1 Isoprostanos

Los valores medios de isoprostanos son superiores en el grupo control que en los pacientes con síndrome metabólico, no observándose diferencias significativas (4.9 ± 1.2 ng/mL vs. $3.1 \pm 1,1$ ng/mL). Tampoco se observan diferencias significativas con respecto al sexo. Nuestros resultados coinciden con los resultados observados por Raymon et al. (348), que no observaron diferencias significativas en los niveles de F2-isoprostanos en el plasma de pacientes con síndrome metabólico, comparados con un grupo control y son contrarios a los resultados observados por Sánchez Margalet et al. (349) que observaron niveles superiores de isoprostanos en pacientes con síndrome metabólico (349).

Varios estudios (333, 334) han observado niveles superiores de TBARS (marcador de la oxidación lipídica) en individuos hipertensos.

Fujita et al., (347) y Furukawa et al., (350) han observado un incremento de la peroxidación lipídica y estrés oxidativo sistémico en pacientes con obesidad visceral y síndrome metabólico comparados con pacientes obesos sin síndrome metabólico.

Fujita et al. (347) observaron que el estrés oxidativo sistémico, analizado mediante el biomarcador en orina 8-epi-PGF α , está relacionado con la obesidad visceral y el síndrome metabólico. Cardona y Tinahones (351) mostraron que pacientes con síndrome metabólico presentaron mayor estrés oxidativo y niveles superiores de peroxidación lipídica, observando que el estrés oxidativo era superior tras la ingesta de una sobrecarga de grasa en la dieta. Sin embargo, otros autores, Sjögren et al. (352) no han observado relación entre los niveles de estrés

oxidativo analizado mediante el biomarcador en orina: 8-iso-PGF 2α y el síndrome metabólico.

Tras el consumo de una bebida antioxidante durante cinco meses, estos valores disminuyeron en ambos grupos analizados (grupo control y pacientes con síndrome metabólico que consumieron la bebida antioxidante), observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) (Figura 7.3.).

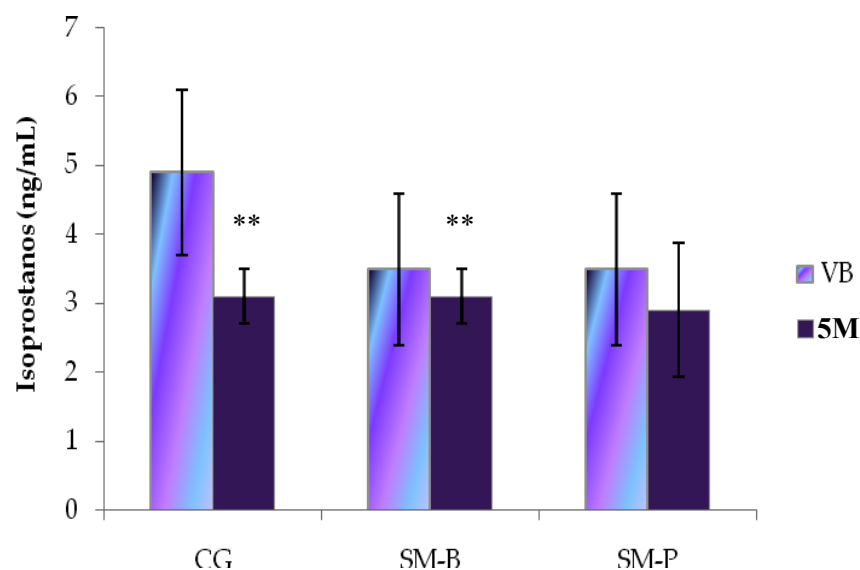


Figura 7.3. Niveles de 15-isoprostano F_{2t} inicialmente y tras el consumo de una bebida antioxidante (SM-B) o una bebida placebo (SM-P), durante 5 meses por pacientes con SM, comparados con un GC.

VB: valores basales, 5M: valores tras 5 meses de consumo de bebida antioxidante (B), CG: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo (P).

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos SM y GC

(**) Diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después del consumo de bebida antioxidante (SM-B) o placebo (SM-P)

Kowalczyk et al. (353) observaron que el consumo de un extracto de bayas de "*Aronia Melanocarpa*", disminuía la peroxidación lipídica y podría ser potencialmente utilizado para prevenir el estrés oxidativo asociado a enfermedades cardiovasculares, resultados que están de acuerdo con los nuestros.

El 42% de los compuestos fenólicos de la bebida antioxidante (B) proceden de los antocianos de la "*Aronia Melanocarpa*" (26.7 mg/100 mL).

El zumo de limón y aronia es muy rico en flavonoides (70%) y ácidos fenólicos (28%), que han demostrado en trabajos previos una elevada actividad antioxidante asociada no solamente a los flavonoles (como la quercetina y derivados), sino también a flavanonas y antocianos (354, 355, 356).

Los componentes del zumo de limón y aronia pueden actuar de forma sinérgica para potenciar la actividad biológica, ya que tanto los flavonoides coloreados como no-coloreados están involucrados en la actividad antioxidante total (190).

7.4.2.2. 8-hidroxi-2-desoxiguanosina

El valor medio de los niveles de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina es superior en los pacientes con síndrome metabólico que en el grupo control, observándose diferencias significativas (22.2 ± 2.1 ng/mL vs. 18.9 ± 1.9 ng/mL), aunque no se observan diferencias significativas con respecto al sexo. Estos resultados coinciden con los observados por Beristain et al., (343) y Cangemi et al., (357) y no coinciden con los resultados observados por Tokuda et al., (358) quienes demostraron que los niveles en plasma y orina de 8-OHdG y el estado antioxidante total no eran diferentes en pacientes con síndrome metabólico comparados con un grupo control.

Varios estudios (333, 334) han observado niveles superiores de 8-OHdG en individuos hipertensos. Niveles elevados de 8-OHdG en orina se han relacionado con enfermedad renal crónica, diabetes y cáncer Kimura et al., (359).

Tras el consumo de la bebida antioxidante durante 5 meses estos valores disminuyeron significativamente en ambos grupos analizados (CG-B y SM-B). El consumo de la bebida placebo por pacientes con síndrome metabólico no mostró variaciones en los niveles de 8-OHdG (Figura 7.4.).

7.4.2.3. Grupo carbonilo

Los valores medios de grupos carbonilo son superiores en el grupo control que en los pacientes con síndrome metabólico, no observándose diferencias significativas (60.3 ± 4.1 μ mol/mg vs. 58.1 ± 8.0 μ mol/mg). Estos

resultados no coinciden con los resultados observados por Armutcu et al. (360) que encontraron niveles séricos superiores de grupos carbonilo en pacientes con síndrome metabólico comparados con una población control sin enfermedad.

Después del consumo de la bebida antioxidante durante cinco meses por el grupo control y por pacientes con síndrome metabólico estos valores disminuyeron. Olas et al. (361) sugieren que el efecto inhibitorio de un extracto de bayas de "*Aronia Melanocarpa*" sobre el daño oxidativo a proteínas en plaquetas humanas podría atribuirse a un incremento en los niveles de glutatión y la modulación de enzimas antioxidantes, como la glutatión peroxidasa.

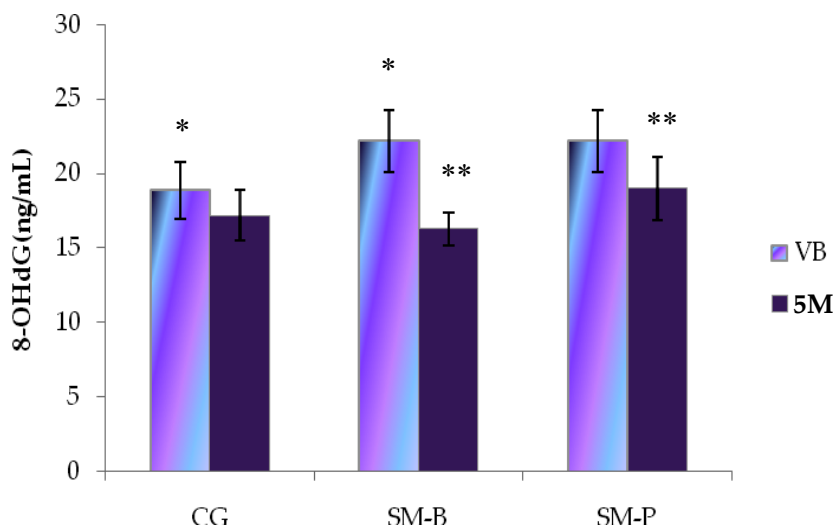


Figura 7.4. Valores de 8-hydroxydeoxyguanosine inicialmente y después del consumo de la bebida antioxidante (SM-B), o una bebida placebo (SM-P) durante 5 meses.

VB: valores basales, 5M: valores tras 5 meses de consumo de bebida antioxidante (B), CG: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo (P).

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos SM y GC

(**) Diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después del consumo de bebida antioxidante (SM-B) o placebo (SM-P)

El consumo del zumo rico en antioxidantes durante cinco meses por el

grupo control disminuyó los niveles de grupos carbonilo significativamente ($60.3 \pm 4.1 \mu\text{mol/mg}$ vs. $51.8 \pm 5.7 \mu\text{mol/mg}$). En los pacientes con síndrome metabólico que consumieron la bebida antioxidante también disminuyeron estos niveles de $58.1 \pm 8.0 \mu\text{mol/mg}$ inicialmente a $55.2 \pm 7.0 \mu\text{mol/mg}$, tras cinco meses, observándose diferencias significativas.

Tras la ingesta de la bebida placebo durante 5 meses no se observaron diferencias significativas en los valores de grupos carbonilo. (Figura 7.5).

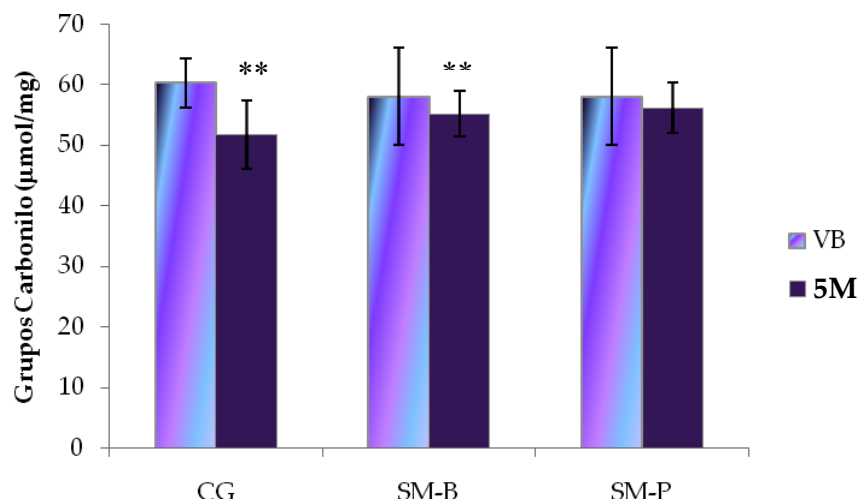


Figura 7.5. Cambios en los niveles de grupo carbonilo inicialmente y después de la bebida antioxidante (SM-B) o una bebida placebo (SM-P) durante cinco meses.

VB: valores basales, 5M: valores tras 5 meses de consumo de bebida antioxidante (B), CG: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo (P).

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos SM y GC

(**) Diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después del consumo de bebida antioxidante (SM-B) o placebo (SM-P)

7.4.2.4. LDL-oxidadas

Las LDL se consideran lipoproteínas aterogénicas, especialmente las lipoproteínas “modificadas cualitativamente” pudiendo ser modificaciones no oxidativas (glicación, desialización, aumento de carga, disminución de tamaño y aumento de densidad) o bien fruto de la oxidación. Las lipoproteínas de baja

densidad “pequeñas y densas” son también las más susceptibles a la oxidación. Las lipoproteínas LDL, al ponerse en contacto con las paredes de las arterias, sufren una oxidación progresiva por parte de las células endoteliales, las CMLV y los macrófagos. La hipercolesterolemia aumenta tanto la cantidad de LDL que penetra en las paredes arteriales como su oxidación (362). Xu XP (363) demuestra que regulan la expresión de la metaloproteínasa-9 y su inhibidor tisular en los macrófagos derivados de monocitos, siendo ésta su implicación proaterogénica.

Wang y Greilberger (364) sugieren que es la matriz extracelular la que retiene la LDL en la íntima en el estadio inicial por su unión (más fuerte por su condición oxidada y en la que interviene “*in vivo*” el calcio y la lipoproteinlipasa) y que a medida que progresa la lesión desciende la potencia de la unión.

Las LDL oxidadas son un factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, ya que activan los monocitos circulantes, aumentando de este modo su capacidad para infiltrarse en la pared vascular. Estudios recientes sugieren que el aumento del estrés oxidativo en el tejido adiposo aumenta el riesgo de síndrome metabólico y que el estado redox en el tejido adiposo es una diana terapéutica potencialmente útil para tratar el síndrome metabólico asociado con la obesidad.

La acumulación de LDL oxidadas en macrófagos y células musculares lisas conduce a la formación de células espumosas, características de la aterosclerosis y de inflamación sistémica (365). La forma oxidada de la Lipoproteína LDL juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis.

La oxidación de las LDL aumenta la producción de triglicéridos mediante la inducción de la expresión de la enzima lipoproteína lipasa y la inducción de la acumulación de ácidos grasos en los adipocitos (300). Además existe una asociación entre los niveles de LDL-oxidadas y la hiperglucemia, esta asociación podría producirse por una reducción en la señalización de la insulina y en la absorción de la glucosa (366). Por otra parte, las LDL oxidadas destruyen las células- β del islote en el páncreas (367). Otros como Bourdon et al., (368)

observaron una asociación entre la hiperglucemia y un aumento de la oxidación de las lipoproteínas LDL (368).

Los niveles de LDL-ox son superiores en pacientes con síndrome metabólico que en el grupo control (96.0 ± 4.1 U/L vs. 86.2 ± 3.9 U/L), observándose diferencias significativas. Estos resultados coinciden con los resultados observados por Yamagishi et al., (369) y no coinciden con los observados por otros autores Sjögren et al. (352) y Holvoet et al. (365).

Galle et al., (370) observaron que el estrés oxidativo promueve la formación de LDL-oxidada, la cual está relacionada con la iniciación y progresión de la aterosclerosis.

Tras el consumo de una bebida antioxidante por los pacientes con síndrome metabólico los niveles de LDL-oxidadas disminuyeron significativamente (96.0 ± 4.1 U/L vs. 87.4 ± 5.0 U/L), mientras que en el grupo control, la ingesta de la bebida antioxidante no modificó los niveles de LDL-oxidadas. En los pacientes con síndrome metabólico que consumieron la bebida placebo los niveles de LDL-oxidadas no sufrieron variaciones significativas (Figura 7.6.).

Basu et al. (371) analizaron el efecto de un suplemento de extracto de arándanos en hombres y mujeres con obesidad y con síndrome metabólico, y observaron una disminución en los niveles plasmáticos de LDL-oxidadas, resultados que coinciden con los que observamos en este estudio tras el consumo de la bebida rica en antioxidantes durante cinco meses por pacientes con síndrome metabólico.

Algunos estudios sugieren que la suplementación en la dieta con zumo de uva y vitamina E. (372), y un cóctel de antioxidantes con contenido de N-acetilcisteína (600 g/d), vitamina E (300 g/d) y vitamina C (250 mg/d) reducen la concentración de LDL-oxidadas (373).

7.4.2.5. *Glutation reducido/ glutation oxidado (GSH/ GSSH)*

El glutacion (GSH) es un tripéptido soluble en agua, compuesto de diferentes aminoácidos: glutamina, cisteína y glicina. El grupo tiol le confiere un gran poder reductor, alcanzando concentraciones milimolares en algunos tejidos. Como antioxidante juega un papel importante en la detoxificación de una gran

variedad de compuestos electrofílicos y peróxidos vía catálisis por la enzima glutatión transferasa y glutatión peroxidasa. El tripéptido se encuentra en el interior de la célula en estado oxidado (GSSG) o reducido (GSH) y una relación óptima en el cociente GSH/GSSG es esencial para supervivencia de la célula. La deficiencia de GSH aumenta el riesgo de daño oxidativo. En varias patologías (cáncer, trastornos neurodegenerativos, fibrosis quística, VIH, procesos de envejecimiento) se observa un desequilibrio de GSH (374).

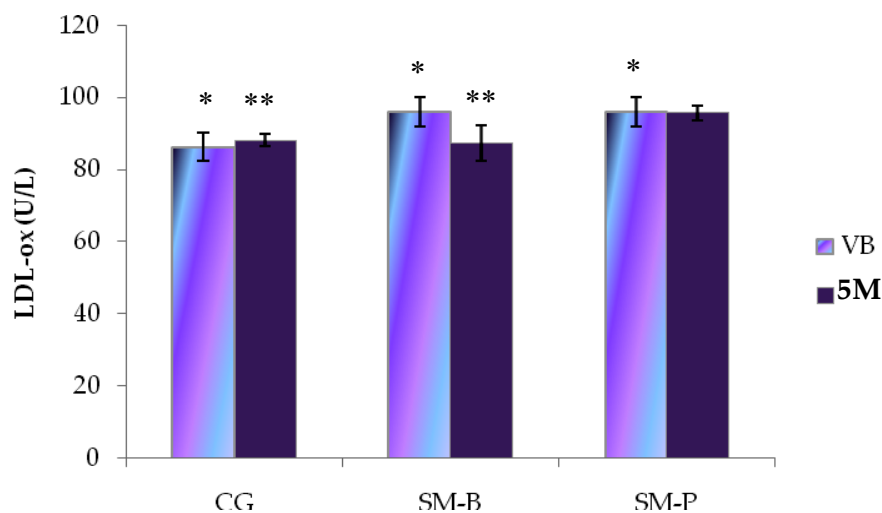


Figura 7.6. Cambios en los niveles de LDL-ox (U/L) inicialmente y después del consumo de una bebida antioxidante (SM-B) o una bebida placebo durante cinco meses (SM-P).

VB: valores basales, 5M: valores tras 5 meses de consumo de bebida antioxidante (B), CG: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo (P).

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos SM y GC

(**) Diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después del consumo de bebida antioxidante (SM-B) o placebo (SM-P)

El cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSH) es inferior en los pacientes con síndrome metabólico que en el grupo control, si bien no se observan diferencias significativas ($p \geq 0.05$). Estos resultados coinciden con los observados por varios estudios en individuos hipertensos (333, 334).

Fernández et al., (375) observó que los niveles de glutathion reducido (GSH) son superiores en el grupo control que en los pacientes con síndrome metabólico. Cardona et al., (376) hallaron niveles superiores de glutathion oxidado y menores de glutathion reducido en pacientes con síndrome metabólico, resultados que coinciden con los nuestros, aunque no observaron diferencias significativas.

Los valores de GSH son utilizados como indicador indirecto de la defensa antioxidante, por su función como sustrato de la glutathion peroxidasa para la neutralización del H_2O_2 (377). Si se acepta esta función, se comprenden entonces los valores menores en el grupo de pacientes con síndrome metabólico, lo cual significa que en estos enfermos hay menor protección ante las especies reactivas de oxígeno y por tanto, están expuestos a sus efectos patogénicos. Este estrés oxidativo sería uno de los mecanismos en el daño vascular que conduce a la aterosclerosis (378). Se ha postulado que el estrés oxidativo produce insulinoresistencia a través de la afectación de la fosforilación inducida por insulina y de la redistribución celular del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) y el fosfatidilinositol-3-kinasa, reduciendo la expresión del GLUT-4 y su actividad (379). A su vez, la hiperinsulinemia resultante de la insulinoresistencia conlleva al estrés oxidativo al propiciar la acumulación de peróxido de hidrógeno y de anión superóxido y la inhibición de las catalasas (378, 379).

Julius et al. (380) demostraron que concentraciones superiores de GSH están asociadas con una mejor salud del individuo, independientemente de la edad que tenga. Observaron que individuos con enfermedades crónicas tenían concentraciones medias más bajas de GSH que en aquellos que pertenecían a un grupo control sano. Dai et al. (381) observaron una relación inversa entre la adherencia a la dieta mediterránea y el estrés oxidativo medido por la relación glutathion reducido/glutathion oxidado.

Tras el consumo de una bebida antioxidante por los pacientes con síndrome metabólico y por el grupo control se observa un incremento del cociente GSH/GSSH ($7.1 \pm 1.2 \mu\text{M}$ vs. $10.1 \pm 2.4 \mu\text{M}$ en el grupo control y $6.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$ vs. $9.8 \pm 2.3 \mu\text{M}$) en pacientes con síndrome metabólico, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$). Entre los pacientes con síndrome metabólico que

consumen la bebida placebo no se encuentran variaciones en los valores del cociente glutatión reducido/glutatión oxidado. (Figura 7.7.).

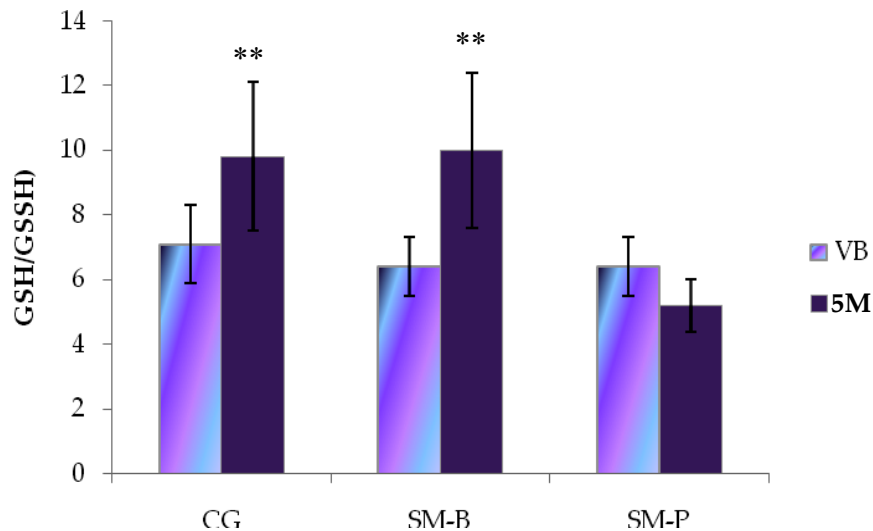


Figura 7.7. Cambios en los niveles de GSH/GSSH μM inicialmente y después del consumo de una bebida antioxidante (SM-B) o una bebida placebo durante cinco meses (SM-P).

VB: valores basales, 5M: valores tras 5 meses de consumo de bebida antioxidante (B), CG: grupo control, SM-B: pacientes con SM que consumen la bebida antioxidante (B), SM-P: pacientes con SM que consumen la bebida placebo (P).

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos SM y GC

(**) Diferencias significativas ($p < 0.05$) antes y después del consumo de bebida antioxidante (SM-B) o placebo (SM-P)

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. El síndrome metabólico conocido también como síndrome plurimetabólico, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome X, es una entidad clínica controvertida que aparece con amplias variaciones fenotípicas, en personas con una predisposición endógena, determinada genéticamente y condicionada por factores ambientales. Representa un problema de salud pública a nivel mundial.
2. El patrón de ingesta alimentaria es similar en los dos grupos de estudio, pacientes con síndrome metabólico y grupo control; por tanto las diferencias en los parámetros bioquímicos observadas no se pueden atribuir a la alimentación.
3. La ingesta de la bebida antioxidante no afecta a los valores de glucosa plasmática en los pacientes con síndrome metabólico, que al principio del estudio presentan unos valores superiores a los de referencia para la población sana. Sin embargo, este efecto beneficioso no se observó sobre los valores de triglicéridos plasmáticos, aunque sí sobre los valores de LDL, que también descienden respecto a los valores iniciales en los pacientes con síndrome metabólico. Este efecto no se ha observado en los pacientes que consumen el placebo.
4. El consumo de la bebida antioxidante produce también un descenso significativo en los valores de LDL oxidadas, homocisteína plasmática y proteína C reactiva en pacientes con síndrome metabólico, efecto que no se observa cuando los pacientes consumen la bebida placebo.
5. Los valores iniciales de colesterol total en pacientes con síndrome metabólico eran superiores al rango de normalidad para la población adulta. El consumo de la bebida tiene un efecto de mejora sobre estos valores, que descendieron hasta el límite superior del rango de normalidad. Este efecto no se observó con el consumo de la bebida placebo.
6. La actividad antioxidante total no muestra diferencias entre los pacientes con síndrome metabólico y el grupo control. Tras el consumo de la bebida antioxidante se observa un aumento de la actividad antioxidante en el grupo control, pero no en los pacientes con síndrome metabólico.
7. Las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa presentan valores superiores en el grupo control que en

pacientes con síndrome metabólico, al comienzo del estudio, si bien no se observan diferencias significativas en el caso de la enzima glutatión peroxidasa. Tras la ingesta de la bebida antioxidante se observa un aumento en los valores de todas las enzimas antioxidantes, sin embargo no se ha observado en los pacientes con síndrome metabólico que consumieron la bebida placebo.

8. No encontramos diferencias en los marcadores de oxidación lipídica y proteica entre el grupo control y los pacientes con síndrome metabólico. El consumo de una bebida antioxidante disminuye los valores medios de isoprostanos y grupos carbonilo tanto en el grupo control como en los pacientes con síndrome metabólico, encontrando diferencias significativas respecto a los valores iniciales.

9. Los pacientes con síndrome metabólico presentan mayor oxidación de DNA que el grupo control al comienzo del estudio. El consumo de la bebida antioxidante disminuye estos valores en ambos grupos, no encontrando variaciones en los niveles de 8-OHdG tras el consumo de la bebida placebo.

10. No se observan diferencias en el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado entre los pacientes con síndrome metabólico y el grupo control al comienzo del estudio. El consumo de la bebida antioxidante produce un incremento de este cociente, mientras que tras el consumo de la bebida placebo no se observan modificaciones en el mismo.

11. El consumo de antioxidantes en la dieta mejora los factores de riesgo cardiovascular, los marcadores de inflamación y el estrés oxidativo asociado al síndrome metabólico.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Yatsuya H, Yamagishi K, North KE, Brancati FL, Stevens J, Folsom AR. Associations of Obesity Measures with Subtypes of Ischemic Stroke in the ARIC Study. *J Epidemiol* 2010; 20 (5): 347-354.
2. Palomo I, Gutiérrez C, Alarcón M, Jaramillo J, Segovia F, Leiva E, et al. Increased Concentration of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and fibrinogen in Individuals with metabolic syndrome. *Molecular Medicine Reports* 2009; 2:253-257.
3. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, DeFronzo R, Kahn R, et al. Expert Committee on the diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus-American Diabetes association. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-7.
4. Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP, Handelsman Y, et al. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract* 2003; 9: 237-52.
5. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 1998; 15: 539-53.
6. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). Final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
7. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome 2006; 23 (5): 468-480.
8. Després JP. Dyslipidaemia and obesity. *Bailliere's Clin Endocrinol Metabolic* 1994; (8): 629-260.
9. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Teacher DF, Turner

RC. et al. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; (28): 412–419.

10. Gotto AM Jr, Blackburn GL, Dailey GE III, et al. The metabolic syndrome: a call to action. *Coron Artery Dis* 2006; (17): 77-80.

11. Grundy SM. Metabolic syndrome: a multiplex cardiovascular risk factor. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; (92): 399–404.

12. Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. et al. The MetS: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Intern Med* 2003; 163(4): 427–436.

13. Dadvissan P, Hulthe J, Fagerberg B, Olsson BM, Hallberg C, Dahllof B, et al. Unique distribution of apolipoproteins on small dense LDL in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: a proteomic study. *J Lipid Res* 2005; 46 (9): 1999-2006.

14. Raickkonen K, Matthews KA, Kuller LH. Depressive Symptoms and stressful Life Events Predict Metabolic Syndrome Among Middle Aged women: A comparison of world Health Organization, Adult Treatment Panel III, and International Diabetes Foundation Definitions. *Diabetes Care* 2007; 30 (4): 872-7.

15. Mertens I, Van Gaal MF. Visceral fat as a determinant of fibrinolysis and hemostasis. *Semin Vasc Med* 2005; 5 (1): 48-55.

16. Kang ES, Kim HJ, Ahn CW, Park CW, Cha BS, Lim SK, et al. Relationship of serum high sensitivity C-reactive protein to metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 69 (2): 151-9.

17. Abbasi F, Brown BW, Lamendola C, McLaughlin T, & Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J. Am. Coll. Cardiol* 2002; 40: 937–943.

18. Després JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Ann*

Med 2006; 38: 52–63.

19. Björntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991; 1: 1132–1143.
20. Mittelman SD, Van Citters GW, Kirkman E L. & Bergman RN. Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes* 2002; 51: 755-761.
21. Mauriège P. Regional variation in adipose tissue metabolism of severely obese premenopausal women. *J. Lipid Res* 1995; 36: 672-684.
22. Jensen MD. Is visceral fat involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome? Human model. *Obesity* 2006; 14 (Suppl. 1): 20-24.
23. Weisberg SP. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest* 2003; 112: 1796-1808.
24. Yudkin JS, Stehouwer C. D, Emeis J J, & Coppack S W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1999; 19 (4): 972–978.
25. Lemieux I. Elevated C-reactive protein: another component of the atherothrombotic profile of abdominal obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 2001; 21: 961-967.
26. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmitko P, et al. C-Reactive Protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003; 107: 53-60.
27. Ridker PM. Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation* 2003; 107: 363-369.
28. Wu K, Aleksic N, Ballantyne CM, Ahn C, Juneja H, Boerwinkle E, et al. Interaction between soluble trombosmodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation* 2003; 107: 66-69.
29. Côté M. Adiponectinemia in visceral obesity: impact on glucose tolerance and plasma lipoprotein and lipid levels in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2005; 90: 1434-1439.

30. Matsuzawa Y. Adiponectin: a key player in obesity related disorders. *Curr Pharm Des* 2010; 16 (17): 1896-1901.
31. Sumarac-Dumanovic M, Jeremic D. Adipokines and lipids. *Med Pregl* 2009; 62 (3): 47-53.
32. Okamoto Y, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic 2006; 1010 (3) 267-278.
33. De Fronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifactorial syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, sislipemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-194.
34. Guillod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, Aubourg A, Bailleux V, Lorsignol A et al. Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiometanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J Endocrinol* 2009; 200 (1): 93-105.
35. Matsuzawa Y. Therapy Insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. *Nature Clin. Pract. Cardiovasc. Med* 2006; 3: 35-42.
36. Berg AH. & Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ. Res* 2005; 96: 939-949.
37. Lemieux I. Contribution of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha to the elevated C-reactive protein levels found in abdominally obese men. *Obes. Res* 2001; 9: 66S-71S.
38. Zierath-Krook A, Wallberg-Henriksson H. Insulin action and insulin resistace in human skeletal muscle. *Diabetología* 2000; 43: 821-35.
39. Mayor F, Cascales M. *Enfermedades metabólicas*. Madrid; 2006.
40. Weiss R, Dufour S, Taksali SE, Tamborlane WV, Petersen KF, Bonadonna RC, et al. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *Lancet* 2003; 362 (9388): 951-957.
41. Krebs NF, Jacobson MS. Prevention of pediatric overweight and

obesity. *Pediatrics* 2003; 112 (2): 424-430.

42. Manios Y, Kourlaba G, Kafatos A, Cook TL, Spyridaki A, Fragiadakis GA. et al. Associations of several anthropometric indices with insulin resistance in children: The Children Study. *Acta Paediatr* 2008; 97 (4): 494-499.

43. Muller-Vieland D, Knebel B. Insulin-regulated transcription factors: molecular link between insulin resistance and cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Sisord* 2001; 25 (1): S35-37.

44. Hotamisligil GH. The role of TNF alpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 1999; 245: 621-625.

45. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action-implication: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106 (2): 165-169.

46. Boden G. Interaction between free fatty acids and glucose metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5 (5): 545-549.

47. 47. Shepherd PR, Khan B. Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *NEJM* 1999; 341 (4): 248-57.

48. Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur Jclin invest* 2002; 11, 88 (7B): 14-23.

49. Puliou MC, Després JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol*. 1994; 73: 460-468.

50. Kerr D. An anthropometric method for fractionation of skin, adipose, bone, muscle and residual masses in males and females age 6 to 77 years. *British Columbia: Simon Fraser University*; 1988.

51. Laclaustra M, Bergua C, Pascual I, Casasnovas J. Síndrome metabólico: concepto y fisiopatología. *Rev Esp Cardiol* 2005; 5: 3-10.

52. Gupta R, Misra A, Vikram NK, Kondal D, Gupta SS, Agrawal A, et al.

Younger age of escalation of cardiovascular risk factors in Asian Indian subjects. *BMC Cardiovasc Disord* 2009; 9: 28.

53. Cefalu WT, Cannon CP. Atlas of cardiometabolic risk. 1st Ed. New York, USA: Informa Health care; 2007.

54. Lamarche BA, Tchernof S, Moorjani B. Small dense low density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men: prospective results from the Quebec cardiovascular study. *Circulation* 1997; 95: 69-75.

55. Walldius GI, Jungner I, Holme AH. High apolipoprotein, low apolipoproteina AI, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): A prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2026-2033.

56. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; 106: 453-458.

57. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of insulin resistance (EGIR). *Diabetes Med* 1999; 16: 442-3.

58. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 2005; 112: 2735-2752.

59. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al.. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 403-414.

60. Després JP. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 1999; 10: 497-511.

61. Vaverkova H, Harasek D, Novotny D, Jackuliakova D. Apolipoprotein B versus LDL-cholesterol: association with other risk factors for atherosclerosis.

Clin Biochem 2009; 42: 1246-1251.

62. Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17: 35-44.

63. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: partII: evolving concepts. *J AmColl Cardiol* 2005; 46: 937-954.

64. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. 2005. The metabolic syndrome a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059-1062.

65. 65. Jaber LA, Brown MB, Hammad A, Zhu Q, Herman WH. The prevalence of the metabolic syndrome among arab Americans. *Diabetes Care* 2004; 27: 234-238.

66. Yaffe K, Kanaya A, Lindquist K, Simonsick EM, Harris T, Shorr RI, et al. The metabolic syndrome, inflammation, and risk of cognitive decline *JAMA*. 2004; 10;292 (18): 2237-2242.

67. Cordero A, Alegría E, León M. Prevalencia del Síndrome Metabólico. *Rev Esp Cardiol* 2005; 5: 11-15.

68. Fernández-Bergés D, Cabrera de León A, Sanz H, Elosua R, Guembe M J, Alzamora M, et al. Síndrome metabólico en España: prevalencia y riesgo coronario asociado a la definición armonizada y a la propuesta por la OMS. *Estudio DARIOS Rev Esp Cardiol* 2012; 65: 241-248.

69. Halliwell B. "Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease." *Am j Med* 1999; 91 (3C): 14-22.

70. Halliwell B. " The chemistry of free radicals." *Toxicol Ind Health* 1993; 9 (1-2): 1-21.

71. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52 (4): 601-62.

72. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal phisyological functions and human disease. *Int.j. Biochem. Cell boil* 2007; 39 (1): 44-84.

73. Zigler JS, Goosey JD. Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens." *Photochem Photobiol* 1981; 33 (6): 869-74.
74. Sik RH, Paschall CS. "The Phototoxic effect of benoxaprofen and peritoneal mast. Cell" *Photochem Photobiol* 1983; 38 (4): 411-5.
75. Fridovich I. "Superoxide radicals, Superoxide dismutases and the aerobic lifestyle." *Photochem Photobiol* 1978; 28 (4-5): 733-41.
76. Nohl H, Hegner D. "Do mitochondria produce oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free Radical Biolmed.* 1978; 31 (11): 1287-312.
77. Boveris A, Oshino N. "The cellular production of hydrogen peroxide." *Biochem* 1972; 128 (3): 617-30.
78. Valko M, Morris H. "Metals, toxicity and oxidative stress." *Curr Med Chem* 2005; 12 (10): 1161-1208.
79. Fenton H. "oxidation of tartaric acid in the presence of iron." *J Chem Soc Trans* 1894; 65.
80. Haber F, Weiss J. "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts" *Proc R Soc London* 1934; 174: 332-351.
81. Anson R M, Manson PA, Bohr VA. "Gene-specific and mitochondrial repair of oxidative DNA damage " *Methods Mol Biol* 2006; 314: 155-181.
82. Sastre J, Pallardo F V, Viña J. " Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis " *IUBMB Life* 2000; 49 (5): 427-435.
83. Yu BP. "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species." *Physiol Rev* 1994; 74 (1): 139-62.
84. Halliwell B, Gutteridge JM. "The antioxidants of human extracellular fluids" *Arch Biochem Biophys* 1990; 280 (1): 1-8.
85. Kanner J, German JB, Kinsella JE. "Initiation of lipid peroxidation in biological systems." *Crit Rev Food Sci Nutr* 1987; 25 (4): 317-64.

86. Bechman KB, Ames BN. "The free radical theory of aging matures." *Physiol Rev* 1998; 78 (2): 547-81.
87. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford; New York, Oxford University Press; 1999.
88. Miles AM, Bohle SS. "Modulation of superoxide-dependent oxidation and hidroxidation reactions by nitric oxide." *J Biol* 1996; 271(1): 40-7.
89. Pietroforte D, Minetti M. "Direct ESR detection of peroxynitrite-induced tyrosine-centred protein radicals in human blood plasma" *Biochem J* 1997; 325 (3): 675-84.
90. Radi R, Bechman JS. "Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide." *Arch Biochem Biophys*. 1991; 288 (2): 481-7.
91. Janssen YM, Van Houten B. "Cell and tissue responses to oxidative damage." *Lab Invest* 1993; 69 (3):261-74.
92. Lipton SA, Choy B. "A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and erlated nitroso-compounds." *Nature* 1993; 364 (6438): 626-32.
93. Hardeland R, Poeggeler B. "Oxidation so melatonin by carbonate radicals and cheminiluminescence amitted during pyrrole ring cleavage," *J Pineal Res* 2003; 34 (1): 17-25.
94. Postlethwait EM, Langford SD. "NO2 reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." *Free Radic Biol Med* 1995; 19 (59): 553-63.
95. Frei B. "Reactive oxygen species and antioxidant vitamims: of action." *Am J Med* 1994; 97 (3A): 111-9.
96. Sparrow CP, Olszewski J. "Cellular oxidation of low density lipoprotein is caused by thiol production in media containing transtition metal ions." *Free Radic boil Med* 1993; 34 (7): 1219-28.
97. Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochen J* 1980; (191): 421-427.

98. Boveris A, Cadenas E, Stoppani OM. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1976; (153): 435-444.
99. Herrero A, Barja G. Sites and mechanism responsible for the low rate of free radical production of heart mitochondria in the long-lived pigeon. *Mech Ageing Dev.* En prensa 1997.
100. Nohl H, Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; (138): 553-539.
101. Bellavite P. The superoxide forming enzymatic system of phagocytes. *Free Rad Biol Med* 1988; (4): 225-261.
102. Morel F, Doussiere J, Vignais PV. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cell. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur J Biochem* 1991; (201): 523-546.
103. Ames BN, Shigenaga MK. Oxidants are a major contributor to cancer and aging. En: *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, Chichester. England 1993; 1-15.
104. Barja G. Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Rad Res Commun* 1993, (18): 145-152.
105. Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Emstr I, Hochstein P, Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Rad Biol Med* 1990; (8): 145-152.
106. Henry JP, Monny C, Michelson AM. Characterization and properties of Pholasluciferase as a metalloprotein. *Biochemistry* 1975; (14): 3458-3466.
107. Barja de Quiroga G, Lopez M, Pérez R, Abelanda M, Nava MP, Puerta ML, et al. Effect of cold acclimation on GSH, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in Brown adipose tissue. *Biochem J* 1991; (277): 289-292.
108. El Sayed MN, Kaul S, Wanless D, Turner CMR, Donelson JE. Analysis of a donor VSG and its expression site in African trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 2001; (29): 2012-9.
109. Mason RM. Free radical intermediates in the metabolism of toxicological

significance. Free radicals biology. W.A.Pryor. New York, Academic Press 1998; 262-165.

110. Doroshow J, Hochstein P. Redox cycling and the mechanism action of antibiotics in neoplastic diseases. Pathology of Oxygen. New York, Academic Press 1982; 245-253.

111. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. J. Chem. Soc. Trans 1894; (65) 899-910.

112. Kohen R, y Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic Pathology 2002; (30): 620-650.

113. Bielsky BH, Gebieki JM. Application of radiation chemistry to biology. Free radical in biology. P.W.A. Academic Press 1977; (3):1-19.

114. Ames BN, Frei B, Stocker R, and England L. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. Adv Exp Med Biol 1990; 264: 155-63.

115. Lachance PA, Zeina BS, and Jeong WS. Antioxidants: an integrative approach. Nutrition 2001; (17): 835-838.

116. Favier A. Oxidative stress in human disease. Ann Pharm Fr 2006; 64 (6): 390-6.

117. Therond P. Oxidative stress diseases and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA). Ann Pharm Fr 2006; 64 (6): 383-9.

118. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 2006; 52(4): 601-23.

119. Keaney JF, Loscalzo J. Diabetes oxidative stress and platelet activation. Circulations. Diabetes Care 1996; 19 (3): 257-267.

120. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. Circulation 2002; 106(16): 2067-2072.

121. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y,

et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114:1752-1761.

122. Wright E Jr, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and post-prandial glycaemia. *Int J Clin Pract* 2006; 60 (3) 308-314.

123. Lara-Esquejeda A, Meaney E, Ceballos GM, Asbun-Bojalil J, Ocharan ME, Nuñez M, et al. Factores de riesgo cardiovascular en población femenina urbana de Mexico. El estudio FRIMEX LIA. *Rev Mex Cardiol* 2007; 18 (1):24-34.

124. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365: 1415-1428.

125. Evans JL, Goldfine ID, Maddux B, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signalin pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23 (5): 599-622.

126. Ilan E, Tirosh O, Madar Z. Triacilglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J Nutr* 2005; 135: 2090-2095.

127. Giuliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19(3): 257-267.

128. Gutteridge JMC. Biological origin of free-radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-biological Interactions* 1994; 91: 133-40

129. Kadoma Y, Ishihara M, Okada N and Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (alpha, beta, gamma and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In Vivo* 2006; 20: 823-7.

130. Pignatelli P, Pulcinelli FM, Celestini A. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000; 72: 1150-5.

131. Pinelo M, Manzocco L, Nunez MJ, Nicoli MC. Interaction among phenols in food fortification: Negative synergism on antioxidant capacity. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry 2004; 52: 1177-80.

132. Gupta P, Narang M, Banerjee DB, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatrics* 2004; 4: 14.

133. Gitto E, Pellegrino S, Gitto P, Barberi I, Reiter R. Oxidative stress of the newborn in the pre and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J. Pineal Res* 2009; 46: 128-39.

134. Limon-Pacheco JH, Gonsbatt ME. The glutathione system and its regulation by neurohormone melatonin in the central nervous system. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010; 10 (4): 287-297.

135. Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc* 2000; 10 (1): 38-44.

136. Kumar A, Ranjan R, Basu S, Khanna HD, Bhargava V. Antioxidant levels in cord blood of low birth weight newborns. *Indian Pediatr* 2008; 45 (7): 583-5.

137. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009; 390 (3): 191-214.

138. Yu BP. How diet influences the aging process of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 97-105.

139. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 1997; 15:353-363.

140. Halliwell B, Gutteridge JMC. The oxidant of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990; 280: 1-8.

141. Harbone JB, Williams C A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55 (6): 481-504.

142. Tomás-Barberán FA, Espin JC. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2001; 81 (9): 853-876.

143. Cook N, Samman S. Flavonoids: Chemistry, Metabolism, Cardioprotective effects, and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* 2006; 7:66-67.
144. Trichopolou A, Vasilopoulou E, Hollman P, Chamalides C, Foufa E, Kaloudis, T, et al. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry* 2000; 70(3), 319-323.
145. Manach C, Donovan JL. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans, *Free Radical Research* 2004; 38 (8), 771-785.
146. Dell'Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research* 2004; 63 (4), 593-602.
147. Arts ICW, Hollman PCH. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81 (IS), 371S-325S.
148. Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal of Pharmacology* 2006; 545 (1): 51-64.
149. Waterhouse AL. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957 (Alcohol and wine in Health and Disease) 2002; 21-36.
150. Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48: 2848-52.
151. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004; 79: 727-747.
152. Arts ICW, Van de Putte B, Hollman PCH. Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 1746-1751.
153. Pascual S, Santos C, Rivas JC. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 5331-5337.
154. Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants.

Journal Research 2000; 113, 287-99

155. Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80:1081-93.

156. Shahidi F, Naczk M. *Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications.* Lancaster, PA: Technomic Publishing Co Inc; 1995.

157. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes origins, metabolism and potential importance to human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 1044-62.

158. Tomás FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones. Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 1073-80.

159. Santos C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 1094-117.

160. Harnly JM, Doherty RF, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Bhagwat S, et al. Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *J. Agric. Food Chem* 2006, 54, 9966-9977.

161. Macheix JJ, Fleuriet A. Phenolic acids in fruits, In: *Flavonoids in health and disease.* Rice-Evans, C.A. and Packer, L. Eds. Marcel Dekker Inc., New York 1988; 35-59.

162. Gomez-Alonso S, Garcia-Romero E, Hermosin-Gutierrez I. HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and analysis* 2007; (20): 618-626.

163. Clifford MN. (1999) Chlorogenic acids and other cinnamates nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999; 79: 362-372.

164. Kallithraka S, Salacha MI, Tzourou I. Changes in phenolic composition

and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry* 2009; 113: 500-505.

165. Mateos R, Bravo L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sci* 2007; 30: 175-191.

166. Piña Z.M, Piña E. El daño a blancos celulares. En Martínez M.M. (Ed.). *Radicales libres y estrés oxidativo*. Editorial Manual Moderno, México, 2008; 97-115.

167. Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 2008; 59:3781-3801.

168. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press; 2007.

169. Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history tradeoffs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol Lett* 2009; 12, 75-92.

170. Alvarez E; Ruiz gutierrez V; Santa-maría C, Machado A. Age-dependent modification of lipid compositions and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech Ageing Dev* 1993; 71: (1-2):1-12.

171. Putvinsky AV, Socolov AI, Roshchukin DI, Vladimirov YA. Electric breakdown of bilayer phospholipid membranes and the ultraviolet irradiation-induced lipid peroxidation 1979; 106: 53-55.

172. Pauls KP, Thompson JE. In vitro simulation of senescent-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature* 1980; 283: 504-506.

173. Benedetti A, Ferretti G, Curatola G, Jezequel AM, Orlandi F. Age and sex related changes of plasma membrane fluidity in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1988; 159: 840-845.

174. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid

peroxidation in biological systems. *Trends Biochem* 1990; 15: 120-135.

175. Yoshikawa T, Murakami M, Takemura S, Kondo M. Effects of vitamin E on D-galactosamine-induced or carbón tetrachloride-induce hepatotoxicity. *Digestion* 1982; 25: 222-229.

176. Öllinger K, and Brunk UT. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Boil Med* 1995; 19:556-574.

177. Barrowcliffe TW, Gray E, Kerry PJ, Gutterige JM. Triglyceride-rich lipoproteins are responsable for thrombin generation induced by liped peroxides. *Thromb Haemost* 1984; 52: 7-10.

178. Berlett BS, Stadtman E. Protein in agin; disease; and oxidative stress. *Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.

179. Esterbuer H, Schau RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxinonenal; malondialdehyde and related aldehyde. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.

180. Tsai L, Szweda PA, Binogradova O. Structural characterization and immunochemical detection of a fluorophore derived from 4-hidroxy-2-nonenal and lysine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7975-7980.

181. Kyn YG, Yang MK. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the liver of guinea pig infecated with *Leptospira interrogans*. *Free Radic Res* 1997; 26: 1-6.

182. Burcham PC, Kuham YT. Introductions of carbonyl groups into proteins by the lipid peroxidation product; malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1996; 220: 996-1001.

183. Belkner J, Wiesner R, Rathman J. Oxygenation of lipoproteins by mammalian lipooxygenase. *Eur J Biochem* 1993; 213: 251-261.

184. Markesbery WR, carney JM. Oxidative alterations in Alzheimer's disease brain *Pathol* 199; 9: 133-146.

185. Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 1990; 20: 901-907.

186. McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radical Biol med* 1999; 26: 1034-53.
187. Rinalducci S, Murgiano L, Zolla L. Redox proteomics: basic principles and future perspectives for the detection of protein oxidation in plants. *Journal of Experimental Botany* 2008; 59: 3781-3801.
188. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxi Redox Signal* 2008; 10(8):1343-1374.
189. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3^a ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.
190. Gonzalez-molina E, Moreno D, garcía-viguera C. Aronia-enriched lemon juice: a new highly antioxidant beverage. *J agric food chem* 2008; 56: 11327-11333.
191. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome; 2007.
192. Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M, American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 2289-304.
193. Hussain A, Claussen B, Ramachandran A, Williams R. Prevention of type 2 diabetes: A review. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007; 60:317-326.
194. Pérez-llamas F, garaule M, Zamora S. Evaluation del estado nutricional. En: Pérez-Llamas F, Zamora (eds.) *Nutrición y alimentación humana*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia, Murcia 2002: 277-292.
195. Consenso SEEDO para la evaluación del sobrepeso y la obesidad. Sociedad Española para el estudio de la obesidad (SEEDO). *Med Clin. (Barcel)* 2000; 115: 587-597.
196. Mújica V, Leiva E, Icaza G, Diaz N, Arredondo M, Moore-Carrasco R, et al. Evaluation of metabolic syndrome in adults of Talca city, Chile. *Nutrition J* 2008; 7: 14-20.
197. Ilona Mikkola I, Nen-Kiukaanniemi SK, Laakso M, Jokelainen J, Härkönen

P, Meyer-Rochow VB, et al. Metabolic syndrome in connection with BMI in young Finnish male adults. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2007; 76: 404-409.

198. Field AE, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, Dietz WH, et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. *Arch Intern Med* 2001; 161 (13): 1581-6.

199. World Health Organization. *Obesity, Preventing and Managing the Global Epidemic: Report of a WHO Consultation on Obesity*. Geneva: World Health Organization; 1998.

200. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 3023-8.

201. Sinha R, Dufour S, Petersen KF, et al. Assessment of skeletal muscle triglyceride content nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes* 2002; 51:1022-7.

202. Zimmeta P, Albertib KG, Serrano M. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Rev Esp Cardiol* 2005; 58 (12):1371-1376.

203. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. *Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults—The Evidence Report*. *Obes Res* 1998; 6: 51-209.

204. Klein S, Allison D, Steven B, Kelley D, Rudolph L, Nonas C. Circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1197-202.

205. Després JP, Lemieux I. Review Article Abdominal obesity and metabolic syndrome *Nature* 2006; 444, 881-887.

206. Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. Body Mass Index, Waist Circumference,

and Health Risk. Evidence in Support of Current National Institutes of Health Guidelines. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2074-2079.

207. Lloyd-Jones DM, Liu K, Colangelo L, Yan LL, Klein L, Loria CM, et al. Consistently stable or decreased body mass index in young adulthood and longitudinal changes in metabolic syndrome components: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Circulation* 2007; 115: 1004-11.

208. Babio N, Sorlí M, Bulló M, Basora J, Ibarrola-Jurado N, Fernández-Ballart J, et al. Association between red meat consumption and metabolic syndrome in a Mediterranean population at high cardiovascular risk: Cross-sectional and 1-year follow-up assessment. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2012; (22): 200-207.

209. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010; (8): 1462.

210. World Health Organization. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 916. Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2003.

211. Ahluwalia N, Ferrières J, Dallongeville J, Simon C, Ducimetière P, Amouyel P, et al. Association of macronutrient intake patterns with being overweight in a population-based random sample of men in France. *Diabetes Metab* 2009; (35): 129-36.

212. Merchant AT, Vatanparast H, Barlas S, Dehghan M, Shah SM, De Koning L, et al. Carbohydrate intake and overweight and obesity among healthy adults. *J Am Diet Assoc* 2009; 109: 1165-72.

213. Chen X, Pang Z, Li K. Dietary fat, sedentary behaviors and the prevalence of the metabolic syndrome among Qingdao adults. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2009; (19): 27-34.

214. Hekmatdoost A, Mirmiran P, Hosseini-Esfahani F, Azizi F. Dietary fatty acid composition and metabolic syndrome in Tehranian adults. *Nutrition* 2011; (27): 1002-1007.

215. Ylönen K, Saloranta C, Kronberg-Kippilä C, Groop L, Aro A, Virtanen SM. Botnia Dietary Study. Associations of dietary fiber with glucose metabolism in nondiabetic relatives of subjects with type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Diabetes Care* 2003; 26:1979-85.
216. Montonen J, Knekt P, Jarvinen R, Aromaa A, Reunanen A. Whole-grain and fiber intake and the incidence of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 622-629.
217. Eshak ES, Iso H, Date C, Kikuchi S, Watanabe Y, Wada Y, et al. Dietary fiber intake is associated with reduced risk of mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women. *J Nutr* 2010; 140: 1445-53.
218. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martinez JA. Obesity and metabolic syndrome: Potential benefit from specific nutritional components. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 2011; 21 (2): B1-B15.
219. Sirtori CR, Galli C, Anderson JW, Sirtori E, Arnoldi A. Functional foods for dyslipidemia and cardiovascular risk prevention. *Nutr Res Rev* 2009; 22: 244-261.
220. Anderson JW. Dietary fiber prevents carbohydrate-induced hypertriglyceridemia. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2: 536-541.
221. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías alimentarias para la población española. IM & C, SA. Madrid; 2000.
222. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. WHO Technical Report Series. No. 916. World Health Organization, Geneva; 2003.
223. Hosseinpour-Niazi S, Mirmiran P, Sohrab G, Hosseini-Esfahani F, Azizi F. Inverse association between fruit, legume, and cereal fiber and the risk of metabolic syndrome: Tehran Lipid and Glucose Study. *Diabetes research and clinical practice* 2011; 94 (2):276-283.
224. Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos (Consenso FESNAD-SEEDO). *Revista Española de Obesidad*, 2011; 9 (1): 1-78.

225. Paddon-Jones D, Westman E, Mattes RD, Wolfe RR, Astrup A, Westerterp-Plantenga M. Protein, weight management, and satiety. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87: 1558S-61S.
226. Nordmann AJ, Nordmann A, Briel M, Keller U, Yancy WS, Brehm BJ, et al. Effects of low-carbohydrate vs low-fat diets on weight loss and cardiovascular risk factors: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2006; 166: 285-93.
227. Blatt AD, Roe LS, Rolls BJ. Increasing the protein content of meals and its effect on daily energy intake. *J Am Diet Assoc* 2011; 111: 290-4.
228. AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española; 2011.
229. Varela-Moreiras G, Avila JM, Cuadrado C, del Pozo S, Ruiz E, Moreiras O, et al. Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64 (3): S37-43.
230. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA Journal* 2010; (8): 1462.
231. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C Tablas de composición de alimentos. Ediciones Pirámide SA. Ed 15ª Madrid; 2011.
232. Page GLJ, Laight D, Cummings MH. Thiamine deficiency in diabetes mellitus and the impact of thiamine replacement on glucose metabolism and vascular disease. *Int J Clin Pract* 2011; 65 (6): 684-690.
233. Stracke H, Gaus W, Achenbach U, Federlin K, Bretzel RG. Benfotiamine in diabetic polyneuropathy (BENDIP): results of a randomised, double blind, placebo-controlled clinical study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116: 600-5.
234. Hilary J Powers. Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* 2003; 77:1352-60.
235. Hustad S, Ueland PM, Vollset SE, Zhang Y, Bjorke-Monsen AL, Schneede J, et al. Riboflavin as a determinant of plasma total homocysteine: effect modification by the methylenetetrahydrofolate reductase C 677 T polymorphism.

Clin Chem 2000; 46:1065-71.

236. Shen J, Lai CQ, Mattei J, Ordovas JM, Tucker KL. Association of vitamin B-6 status with inflammation, oxidative stress, and chronic inflammatory conditions: the Boston Puerto Rican Health Study. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 337-42.

237. Friso S, Girelli D, Martinelli N. Low plasma vitamin B-6 concentrations and modulation of coronary artery disease risk. *Am J Clin Nutr* 2004; (79): 992-8.

238. FAO. OMS. Vitamin and mineral requirements in human nutrition Second edition; 2004.

239. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Evaluación nutricional de la Dieta Española. II. Micronutrientes. Sobre datos de la Encuesta de Ingesta Dietética (ENIDE); 2001.

240. Martinez JJ, Ruiz F, Candil SD. Baseline serum folate may be predictive factor of weight loss in morbid-obesity-management programme. *Br J Nutr* 2006; 96 (5): 956-64.

241. Setola E, Monti LD, Galluccio E, Palloschi A, Fragasso G, Paroni R, et al. Insulin resistance and endothelial function are improved after folate and vitamin B12 therapy in patients with metabolic syndrome: relationship between homocysteine levels and hyperinsulinemia . *European Journal of Endocrinology* 2009; 151: 483-489.

242. Farvid MS, Jalali M, Siassi F, Hosseini M. Comparison of the effects of vitamins and/or mineral supplementation on glomerular and tubular dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 2458-64.

243. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993; 328: 1450-6.

244. Montonen J, Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A. Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 362-6.

245. Drouillet P, Balkau B, Charles MA, et al. Calcium consumption and insulin

resistance syndrome parameters. Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; (17): 486-492.

246. Liu S, Song Y, Ford ES. Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. Women. *Diabetes Care* 2005; (28): 2926-2932.

247. Van Mierlo LA, Arends LR, Streppel MT. Blood pressure response to calcium supplementation: a metaanalysis of randomized controlled trials. *J Hum Hypertens* 2006; (20): 571-580.

248. Bostick RM, Fosdick L, Grandits GA. Effect of calcium supplementation on serum cholesterol and blood pressure. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Arch Fam Med* 2000; (9): 31-39.

249. Klipstein-Grobusch K, Grobbee DE, den Breeijen JH, Boeing H, Hofman A, Witteman JC: Dietary iron and risk of myocardial infarction in the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 1999; (149): 421-428.

250. Van der AD, Peeters PH, Grobbee DE, Marx JJ, Van der Schouw YT. Dietary haem iron and coronary heart disease in women. *Eur Heart J* 2005; 6: 257-262.

251. Kiechl S, Willeit J, Egger G, Poewe W, Oberhollenzer F: Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 1997; (96):3300-3307.

252. Sun Q, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Prospective Study of Zinc Intake and Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care* 2009; 32(4): 629-634.

253. Shab-Bidar S, Hosseini-Esfahani F, Mirmiran P, Mehran M, Azizi F. Dietary intakes of zinc and copper and cardiovascular risk factors in Tehranian adults: Tehran Lipid and Glucose Study. *Nutrition & Dietetics*; 2013.

254. Ennes Dourado Ferro F, de Sousa Lima VB, Mello Soares NR, Franciscato Cozzolino SM, do Nascimento Marreiro D, Metabolic syndrome and zinc nutritional status. *Nutr Hosp* 2011; 26 (3): 650-654.

255. He K, Liu K, Daviglus ML, Morris SJ, Loria CM, Van Horn L, et al. Magnesium intake and incidence of Metabolic Syndrome among young adults. *Circulation* 2006; 113:1675-1682.
256. Guerrero-Romero F, Tamez-Perez HE, Gonzalez-Gonzalez G, Salinas-Martinez AM, Montes-Villarreal J, Trevino-Ortiz JH, et al. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity in non-diabetic subjects with insulin resistance: a double-blind placebo-controlled randomized trial. *Diabetes Metab* 2004; 30: 253-258.
257. Song Y, Manson JE, Buring JE, Liu S. Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2004; 27: 59-65.
258. Jacobs DR, Tapsell LC. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. *Nutr Rev* 2007; 65: 439-50.
259. Kipnis V, Freedman LS. Impact of exposure measurement error in nutritional epidemiology. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1658-1659.
260. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-359.
261. Butler J, Rodondi N, Zhu Y, Figaro K, Fazio S, Vaughan DE, et al. Metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease in older adults. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47(8):1595-1602.
262. Palomo I, Icaza G, Mujica V, Núñez L, Leiva E, Vásquez M, et al. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos en población adulta de Talca, Chile. Fuente: *Rev. Méd. Chile* 2007; 135 (7): 904-912.
263. Grima A, León LM, Ordóñez B. El síndrome metabólico como factor de riesgo cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol* 2005; 5: 16-20.
264. Rodilla E, García L, Merino C, Costa JA, González C, Pascual JM. Importancia del síndrome metabólico en el control de la presión arterial y la dislipemia. *Med Clin Barc* 2004; 123: 601-5.

265. Tietz NW, ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1995; 268-273.
266. Tietz NW, ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1995; 22-24.
267. Tietz NW, ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1995; 622-626.
268. Eda S, Kaufmann J, Roos W, Pohl S. Development of a new microparticle-enhanced turbidimetric assay for C-reactive protein with superior features in sensitivity and dynamic range. *J Clin Lab Anal* 1998; 12(3): 137-144.
269. Koubaa N, Nakbi a, Smaoui M, Abid N, Chaaba R, Abid M, Hammami M,. Hiperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clin Biochem* 2007; 40 (13-14):1007-14.
270. Holvoet P, De Keyzer D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 2008; 3: 637–649.
271. Sánchez MA, Martínez M, Correa E, Mendoza VM. Relationship between Metabolic Syndrome Components and Oxidative Stress in Elderly Community-Dwelling Mexicans. *Ann Nutr Metab* 2010; 56:302-307.
272. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* 2006; 70:1437-1442.
273. Güven A, İnanç F. Plasma homocysteine levels in patients with metabolic syndrome. *Eur J Gen Med* 2004; 1(2): 38-42.
274. Eckel RE. Mechanisms of the components of the metabolic síndrome that predispose to diabetes and atherosclerotic CVD. *Proceedings of the Nutrition Society* 2007; 66, 82-95.
275. Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2005; 112: 3066-3072.
276. Maiz A. El síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. *Boletín de la*

escuela de medicina 2005; 30: 25-30.

277. Pyörälä K. Ensayos cardiovasculares en la diabetes: pasado y presente. *Revista Española de Cardiología* 2000; 53:1553-1560.

278. Bronzel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jezierska J. Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 2010; 16(1): CR28-34.

279. Holvoet P, Harris TB, Tracy RP, Verhamme P, Newman AB, Rubin SM, et al. Association of high coronary heart disease risk status with circulating oxidized LDL in the well-functioning elderly: findings from the Health, Aging and Body Composition study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(8):1444-1448.

280. Heinecke JW: Free radical modification of low density lipoprotein: mechanisms and biological consequences. *Free Rad Biol Med* 1987; 3: 65-73. 30.

281. Sigurdardottir V, Fagerberg B, Hulthe J. Circulating Oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year-old men (AIR study). *J Intern Med* 2002; 252:440-447.

282. Yamagishi SI, Matsuoka H, Kitano S, Nozomu H, Yuko J, Hidekazu U, et al. Elevated circulating oxidized LDL levels in Japanese subjects with the metabolic syndrome. *Int J Cardiol* 2007 118 (2): 270– 272.

283. Maziere C, Morliere P, Santus R, Marcheux V, Louandre C, Conte MA, et al. Inhibition of insulin signaling by oxidized low density lipoprotein. Protective effect of the antioxidant vitamin E. *Atherosclerosis* 2004; 175: 23-30.

284. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet β -cells by its cellular uptake and oxidative modification *Endocrinology* 2002; 143:3449-3453.

285. Sutherland J, McKinnley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 2004; (2) 82–104.

286. Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CLM, Ong H, et al.

Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diab* 2007; 56:2863-2871.

287. Chrubasik C, Li G, Chrubasik S. The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytoth Res* 2010; 24 (8): 1107-1114.

288. Szajdek A, Borowska E. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: A review. *Plant Foods Hum. Nutr* 2008; 63:147-156.

289. Alul RH, Wood M, Longo J, Marcotte AL, Campione AL, Moore MK, et al. Vitamin C protects low-density lipoprotein from homocysteine-mediated oxidation. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:881-891.

290. Chao JC, Huang CH, Wu SJ, Yang SC, Chang MJ, Lo PN. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J Nutr Biochem* 2002; 13: 427-434.

291. Hayden MR, Tyagi SC. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: The pleiotropic effects of folate supplementation. *J Nutr* 2004; 3: 4.

292. Kanani P, Sinkey C, Browning R, Allaman M, Knapp H, Haynes W. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation* 1999; 100: 1161-1168.

293. Kalra DK. Homocysteine and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis Reports* 2004; 6: 101-106.

294. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347:1557-1565.

295. Skoczynska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska-Jercha A, Turczyn B, Wojakowska A, et al. Influence of chokeberry juice on arterial blood pressure and lipid parameters in men with mild hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep* 2007; 59 (1): 177-182.

296. Ridker PM, Wilson PW, Grundy SM. Should C-reactive protein be added to metabolic syndrome and to assessment of global cardiovascular risk?

Circulation 2004; 109:2818-25.

297. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ, et al. Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial. *Lancet* 2009; 373:1175-1182.

298. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14719 initially healthy American women. *Circulation* 2003; 107:391-397.

299. Rao VS, Nagaraj RK, Hebbagodi S, Kadarinarasimhiah NB, Kakkar VV. Association of Inflammatory and Oxidative Stress Markers with Metabolic Syndrome in Asian Indians in India. *Cardiol Res Prac* 2011; 1: 1-8.

300. Merkel M, Heeren J, Dudeck W, Rinninger F, Radner H, Breslow JL, et al. Inactive lipoprotein lipase (LPL) alone increases selective cholesterol ester uptake in vivo, whereas in the presence of active LPL it also increases triglyceride hydrolysis and whole particle lipoprotein uptake. *J Biol Chem* 2002; 277:7405-7411.

301. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. American Heart Association: National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109:433-438.

302. Block G, Jensen C, Dietrich M, Norkus EP, Hudes M, Packer L, et al. Plasma C-reactive protein concentrations in active and passive smokers: influence of antioxidant supplementation. *J Am Coll Nutr* 2004; 23:141-147.

303. Matía P; Lecumberri PE, Calle P, Alfonso L. Nutrición y síndrome metabólico. *Rev. Esp. Salud Pública* 2007; 81(5):489-505.

304. Aschner P. Concepto y Epidemiología del Síndrome Metabólico. *Asociación Latinoamericana de Diabetes. (ALAD)* 2003; 1.

305. Montes de Oca E, Loria J, Rafael A. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias Rev Cub Med Int Emerg* 2008; 7(3):1260-1272.

306. Demircan N, Gurel A, Armutcu F, Unalacak M, Aktunc E, Atmaca H. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Med Sci Monit* 2004; 14: 97-101.
307. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2005; 23: 599-622.
308. Ford ES. Intake and circulating concentrations of antioxidants in the metabolic syndrome. *Curr Atheroscler Rev* 2006; 8: 448-452.
309. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome; 2006.
310. Puliot MC, Després, JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, Tremblay A, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 1994; 73: 460-468.
311. Ridker PM. Clinical Application of C-Reactive Protein for Cardiovascular Disease Detection and Prevention. *Circulation* 2003; 107: 363-369.
312. Wu K, Aleksic N, Ballantyne CM, Ahn C, Juneja H, Boerwinkle E, et al. Interaction between soluble trombosmodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. *Circulation* 2003; 107: 66-69.
313. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, et al. Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *J Endoc Inv Patients with MetS had higher levels of oxidative stress* 2006; 29, 791-795.
314. Maritim AC, Sanders RA, Wathins JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidant: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003; 17 (1):24-38.
315. Cooper SA. Renin-angiotensin-aldosteronesystem and oxidative stress in cardiovascular insulinresistence. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(4):H2009-23.
316. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the

fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49(10):4619-4626.

317. Prior RL; Wu X; Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem* 2005, 53: 4290-4303.

318. Dávalos A, Gómez C, Bartolomé B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-Fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem* 2004; 52: 48-54.

319. Lucas-Abellán C, Fortea MI, Gabaldon JA, Nunez-Delicado E. Complexation of resveratrol by native and modified cyclodextrins: determination of complexation constant by enzymatic, solubility and fluorimetric assays. *Food Chem* 2008; 111: 262-267.

320. Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG, Ganther HE. Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem & Biophys. Res. Commun* 1997; 74:64-71.

321. Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* 2003; 36 (1): 79-87.

322. Woolliams JA; Suttle NF; Wiener G; Field AC; Woolliams C. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *Journal of agricultural science, Cambridge* 1983; 100: 441-449.

323. Evans MD, Cooke MS, Podmore ID, Zheng Q, Herbert KE, Lunec J. Discrepancies in the measurement of UVC-induced 8-oxo-2' deoxyguanosine: implication for the analysis of oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259(2):374-8.

324. Buss H, Chan TP, Sluis KB, Domigan NM, Winterbourn CC. Protein Carbonyl Measurement By A Sensitive ELISA Method. *Free Rad Biol Med* 1977; 23:361.

325. Morrouw JD, Roberts J. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997; 36(1):1-21.

326. Koubaa N, Nakbi A, Smaoui M, Abid N, Chaaba R, Abid M, et al. Hiperhomocysteinemia and elevated ox-LDL in Tunisian type 2 diabetic patients: Role of genetic and dietary factors. *Clin Biochem* 2007; 40 (13-14):1007-14.
327. Demircan C, Cikrikler HI, Engindeniz Z, Cebicci H, Atar N, Guler V, et al. Comparison of the effectiveness of intravenous diltiazem and metoprolol in the management of rapid ventricular rate in atrial fibrillation. *Emerg Med J* 2005; 22(6):411-4.
328. Sánchez-Rodríguez MA, Martínez-Cruz M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Relationship between Metabolic Syndrome Components and Oxidative Stress in Elderly Community-Dwelling Mexicans. *Ann Nutr Metab*. 2010; 56: 302–307.
329. Veigas NM, Dharmalingam M, Marcus SR. Oxidative stress in obesity and Metabolic Syndrome in Asian Indians. *J Med Biochem* 2011; 30: 1-5.
330. Kaya C, Pabuccu R, Satioglu H. Serum antimullerian hormone concentrations on day 3 of the in vitro fertilization stimulation cycle are predictive of the fertilization, implantation, and pregnancy in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction 2010; 4.
331. Rudich A, Tirosch A, Potashnik R. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 1998; 47: 1562-9.
332. Pilaczynska L, Skarpanska A, Deskur E, Basta P, Horoszkiewicz M. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise, *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005; 15: 48–58.
333. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 2004; 44: 248-52.
334. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L. Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation. *Circulation* 2002; 106:

1211-8.

335. Sagar S, Kallo íd, Naliki N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals inessential hypertension. *Mol. Cel. Biochem* 1992; 111(1-2):103-8.

336. Sánchez-Rodríguez E, Rubio M, Cervilla LM, Blasco B, Rios JJ, Rosales MA. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. *Plant Sci* 2010; 178: 30-40.

337. Pizent A, Pavlovic M, Jurasovic J, Dodig S, Pasalic D, Mujagic R. Antioxidants, trace elements and metabolic syndrome In elderly subjects. *J Nutr Health Aging Oxidative stress associated with metabolic syndrome* 2010; 14, 253-263.

338. Chen Z, Zhu Q, Tsang D, Huang Y. Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (1): 477-482.

339. Duchnowicz P, Nowicka A, Koter-Michalak M, Broncel M, *In vivo* influence of extract from *Aronia melanocarpa* on the erythrocyte membranes in patients with hypercholesterolemia. *Med Sci Monit.* 2012; 18(9): CR569–CR574

340. Beristain A S, Sánchez M, Mendoza VM, Ruiz M, Estrés oxidativo como factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus, osteoartritis o hipertensión arterial en adultos mayores. *Bioquímica* 2006; 31(1): 13-22.

341. Broncel M, Kozirog-Kołacińska M, Andryskowski G, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Owczarczyk A, Chojnowska-Jeziarska J, The influence of chokeberry anthocyanins on blood pressure and serum endothelin-1 and lipids in patients with metabolic syndrome. *Pol. Merkur. Lek.*, 2007.

342. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ, et al. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest* 2008; 38, 510-515.

343. Ghayour M, Taylor A, Laham S, et al. Serum selenium and glutathione peroxidase in patients with obesity and metabolic syndrome. *Pak J Nut* 2008; 7(1), 112-117.

344. Esposito G, De Filippis D, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, and Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF-kappaB involvement. *Neurosci Lett* 2006; 399: 91-95.
345. Esposito K, Ciotola M, Giugliano D. Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation* 2006; 29(9):791-795.
346. Hayden MR, Tyagi SC. Review. Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy The pleiotropic effects of folate supplementation *Nutrition Journal* 2004; 3(1): 4.
347. Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* 2006; 70, 1437–1442.
348. Raymond CS, Seet MD, Yung J, Lee EC, Lim Amy ML Quek, Shan-Hong Huang, Chin-Meng K, Halliwell, B. Markers of Oxidative Damage Are Not Elevated in Otherwise Healthy Individuals With the Metabolic Syndrome. *Diabetes Care* 2010; 33: 1140-1142.
349. Sánchez-Margalet V. Biomarkers of Vascular Inflammation and Subclinical Atherosclerosis in the Metabolic Syndrome. *Medicina Clinica* 2004; 132 (10): 361-363.
350. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama, O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Inv* 2004; 114: 1752–1761.
351. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat Similar increase in oxidative stress after fac overload in person with baselin hipertrigliceridemia with or without the netabolic syndrome. *Clin Biochen* 2008; 41: 701-705.
352. Sjögren P, Basu S, Rosell M, Silveira A, de Faire U, Vessby B, Hamsten A, Hellenius ML, Fisher MR. Measures of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress are not related and not elevated in otherwise healthy men with the metabolic syndrome. *Arterioscler thromb Vasc Biol* 2005; 5: 2580-2586.

353. Kowalczyk E, Fijałkowski P, Kura M, Krzesiński P, Błaszczak J, Kowalski J, Smigielski J, Rutkowski M, Kopff M. The influence of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* on selected parameters of oxidative stress and microelements contents in men with hypercholesterolemia. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 19: 651-653.
354. Masuoka N; Matsude M, Kubo I. Characterisation of the antioxidant activity of Bflavonoids. *Food Chem* 2012; 131: 541-545.
355. Sun J, Peng H, Su W, Yao J, Long X, Wang J. Anthocyanins extracted from Rambutan (*Nephelium Lappaceum* L) pericarp tissues as potential natural antioxidants. *J. Food Biochem* 2011; 35: 1461-1467.
356. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, Agarwal A, Jensen GS, Hart AN, Shanbrom E. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze dried Amazonian palm berry, *Euterpe Oleraceae* Mart (Acai). *J. Agric Food Chem* 2006; 54: 8604-8610.
357. Cangemi R, Angelico F, Loffredo L, Del Ben M, Pignatelli P, Martini A, Violi F. Oxidative stress-mediated arterial dysfunction in patients with metabolic syndrome: Effect of ascorbic acid. *Free Rad Biol Med* 2007; 43: 853-859.
358. Tokuda F, Sando Y, Matsui H, Yokoyama T. Epsilon-(Hexanoyl) Lysine, A New Oxidative Stress Marker, is Increased in Metabolic Syndrome, but not in Obstructive Sleep Apnea. *Am J Med Sci* 2009; 338: 127-133.
359. Kimura S, Yamauchi H, Hibino Y, Iwamoto M, Sera K, Ogino K. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanine in healthy Japanese people. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 496-502.
360. Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 785-790.
361. Olas B, Kedzierska M, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W. Effects of polyphenols rich extract from berries of *aronia melanocarpa* on the markers of oxidative stress and blood platelet activation. *Platelets* 2010; 21: 274-281.
362. Jessup W, Kritharides L, Stocker R. Lipid oxidation in atherogenesis: an

overview. *Biochem Soc Trans* 2001; 32:134-138.

363. Xu XP MD; Simcha R, Meisel MD, John M Ong, PhD Sanjay Kaul, Bojan Cercek MD. Oxidized Low-Density Lipoprotein Regulates Matrix Metalloproteinase-9 and Its Tissue Inhibitor in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circulation* 1999; 99: 993-998.

364. Wang X, Greilberger J, Ratschek M, Jurgens G. Oxidative modifications of LDL increase its binding to extracellular matrix from human aortic intima: influence of lesion development, lipoprotein lipase and calcium. *J Pathol* 2001; 195: 2.

365. Holvoet P, De Keyzer D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol* 2008; 3: 637-649.

366. Maziere C, Morliere P, Santus R, Marcheux V, Louandre C, Conte MA, Maziere JC. Inhibition of insulin signaling by oxidized low density lipoprotein. Protective effect of the antioxidant vitamin E. *Atherosclerosis* 2004; 175: 23-30.

367. Cnop M, Hannaert JC, Gruppig AY, Pipeleers DG. Low density lipoprotein can cause death of islet β -cells by its cellular uptake and oxidative modification. *Endocrinology* 2002; 143: 3449-3453.

368. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. *FASEB J* 1999; 13:233-244.

369. Yamagishi SI, Matsuoka H, Kitano S, Nozomu H, Yuko J, Hidekazu U, Shuji I, Katsuhiko T, Takanori M, Kazuo N, Tsutomu I. Elevated circulating oxidized LDL levels in Japanese subjects with the metabolic syndrome. *Int J Cardiol* 2007 118 (2): 270-272.

370. Galle J, Heermeier K, Wanner C. Atherogenic lipoproteins, oxidative stress, and cell death. *Kidney Int* 1999; 56 (71): 62-65.

371. Basu A, Du M, Leyva MJ, Sanchez K, Betts NM, Wu M, et al. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *J Nutr* 2010; 140: 1582-1587.

372. Castilla P, Davalos A, Teruel JL, Cerrato F, Fernández-Lucas M, Merino JL,

Sánchez-Martín CC, et al. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr* 2000; 87: 1053-1061

373. Neri S, Signorelli SS, Torrisi B, Pulvirenti D, Mauceri B, Abate G, et al. Effects of antioxidant supplementation on postprandial oxidative stress and endothelial dysfunction: a single-blind, 15-day clinical trial in patients with untreated Type 2 diabetes, subjects with impaired glucose tolerance, and healthy controls. *Clin Ther* 2005; 27: 1764-1773.

374. Anderson ME. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 1998; 111: 1-14.

375. Fernandez ML. The Metabolic Syndrome. *Nutr Rev* 2007; 64:30-34.

376. F. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Garrido-Sánchez L, Collantes E, Tinahones FJ. Circulating antioxidant defenses are decreased in healthy people after a high fat meal. *British Journal of Nutrition* 2008; 10: 1-15

377. Matssubara M, Chiba H, Maruoka S, Katoyose S. Elevated serum leptin concentration in woman with components of multiple risk factor clustering syndrome. *J Atheroscler Thromb* 2000; 7: 231-7.

378. Hajerg, Van der Graaff Y, Olijhoek JK, VerhaarMC, Visseren FJ. Levels of homocysteine are increased in metabolic syndrome patients but are not associated with an increased cardiovascular risk, in contrast to patients with out the metabolic syndrome. *Heart* 2007; 93: 216-220.

379. Skoczynska A, Jedrychowska I, Poreba R, Affelska A, Turczyn B. The influence of chokeberry juice on arterial blood pressure. *Pharmacol Rep* 2007; 59 (1): 66

380. Julius M, Lang CA, Glibermant L, DiFranceisco W, Schork A. Glutathione and morbidity in a community based sample of elderly. *J Clin Epidemiol* 1994; 47: 1021-1026.

381. Dai L, Cutler JA, Savidge GF, Mitchell MJ. Characterization of a causative mutation of hemophilia A identified in the promoter region of the factor VIII gene

(F8), 2008; 6(1):193-5.

ANEXO 1.
CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,con

DNI:.....

DECLARO:

Haber sido informado/a minuciosamente del estudio **“EFECTO DE UNA BEBIDA RICA EN ANTIOXIDANTES SOBRE BIOMARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO”**, 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.





UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO
UCAM

Vicerrectorado de Investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En Guadalupe (Murcia) a 9 de Enero de 2009

Fdo:.....

**ANEXO 2:
COMITÉ DE ÉTICA**



Los investigadores que soliciten la evaluación de este Comité, deberán presentar en el Servicio de Investigación de la Universidad junto con la documentación solicitada este Anexo I debidamente cumplimentado.

INDICAR SI LA PROPUESTA CONTEMPLA ALGUNO DE LOS SIGUIENTES ASPECTOS:		SI	NO
A	Investigación experimental clínica con seres humanos.	x	
B	Utilización de tejidos humanos procedentes de pacientes, tejidos embrionarios o fetales.		x
C	Utilización de tejidos humanos, tejidos embrionarios o fetales procedentes de bancos de muestras o tejidos.		x
D	Investigación observacional con seres humanos o uso de datos personales, información genética, etc.		x
E	Experimentación animal.		x
F	Utilización de agentes biológicos de riesgo para la salud humana, animal o las plantas.		x
G	Uso de organismos modificados genéticamente (OMGs).		x

Datos del Investigador Principal	
Apellidos y nombre:	Cristina García Viguera. Pilar Zafrilla Rentero
Grupo de Investigación:	Nutrición y estrés oxidativo
Correo electrónico:	mpzafrilla@ucam.edu Teléfono: 685607716
Denominación de la convocatoria:	Ministerio de Educación y Ciencia

El abajo firmante, en calidad de investigador principal de este proyecto informa que:

- La investigación propuesta respeta los principios fundamentales de la Declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, de la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos, y del Convenio para la protección de los derechos humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Convenio de Oviedo relativo a los derechos humanos y la biomedicina).
- Conoce y cumplirá la legislación vigente y otras normas reguladoras, pertinentes al proyecto, en materia de ética, experimentación animal o bioseguridad.

En Murcia, a 9.de. Enero de 2009.

El Investigador Principal,

Fdo.: Pilar Zafrilla.

Documentación que se ha de adjuntar:

- **En los supuestos A, B y C** y si el centro donde se llevará a cabo la experimentación o que suministrará las muestras es distinto a la UCAM, debe adjuntar el informe del Comité Ético del centro correspondiente.

- **En el supuesto C**, si no se tratara de un centro con Comité de Ética acreditado se deberá adjuntar la autorización de uso de las muestras, señalando la extensión de esta autorización (usos restringidos al proyecto, o para otros usos relacionados). En cualquier caso hay que señalar si las muestras son abiertas, están codificadas o son anónimas.

- **En el supuesto D** si la investigación es prospectiva, se deberá aportar el documento de consentimiento informado utilizado donde conste la información detallada que recibirá el participante en el estudio. Si es retrospectiva se deberá hacer un compromiso de confidencialidad sobre los posibles datos identificativos de los participantes.

- **En el supuesto E** de deberá adjuntar el Informe del Responsable del Animalario con el V.º B.º del Asesor en Bienestar Animal en el que se van a mantener los animales, indicando el nº de Registro del mismo, verificación del procedimiento y la autorización para la estabulación de los mismos, además, en el caso de utilizar material biológico infeccioso, adjuntar el Informe del Responsable de Seguridad Biológica del Centro y en los casos de inoculación de compuestos marcados con radioisótopos, también se deberá adjuntar Informe del responsable de Radioprotección del Centro en el que se verifique el procedimiento.

- **En los supuestos F y G** se debe adjuntar el informe del Comité de Bioseguridad o del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del Centro en el que se llevará a cabo la experimentación. En ambos casos se deberán enumerar los agentes biológicos utilizados y describir las medidas de contención del laboratorio donde se va a realizar los trabajos.

ANEXO 3:
ENCUESTA 24 HORAS

Nº DE HISTORIA

NOMBRE

DIRECCIÓN: C/.

Nº

TELÉFONO:

FECHA:

Fecha de nacimiento:

Edad.

Estatura:

Peso Kg.

IMC:

Contorno cintura

Presión arterial sistólica:

Diastólica

Motivo de consulta (grado y tipo de motivación para seguir tratamiento dietético e identificación de la imagen corporal).

Antecedentes personales:

Antecedentes personales patológicos:

Diabetes:

Depresión:

Diarreas:

Colesterol:

Ansiedad:

Estreñimiento:

Hipertensión:

Hipotensión:

Tiroidopatías:

Intolerancias:

Alergias alimentarias:

Medicación actual:

Antecedentes personales no patológicos:

Alcohol:

Tabaco:

Tipo de trabajo:

Hábitos alimentarios:

Frecuencia de consumo:

Hábito de picar entre comidas:

Momento del día de mayor sensación de apetito:

¿Come a escondidas?.

Responsable de preparar comidas:

Responsable de la compra:

Cocciones habituales:

Bebidas preferidas:

Actividad física:

NOMBRE:

FECHA:

ENCUESTA RECORDATORIO 24 HORAS

DESAYUNO	
ALMUERZO	
COMIDA	
MERIENDA	
CENA	
COLACIÓN	