

EFECTO DE LA SOBRECARGA ORAL CON
GRASA INSATURADA SOBRE LOS
MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E
INFLAMACIÓN.
ESTUDIOS DE LIPEMIA POSTPRANDIAL EN
SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA
FAMILIAR HETEROCIGOTA.

TESIS DOCTORAL

AUTOR: María Teresa Pedro Font

DIRECTORES:

Dr. Rafael Carmena Rodríguez

Dr. José Tomás Real Collado.

Valencia, Diciembre 2011

TÍTULO:

EFFECTO DE LA SOBRECARGA ORAL CON GRASA INSATURADA SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN. ESTUDIOS DE LIPEMIA POSTPRANDIAL EN SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA.

TESIS DOCTORAL

AUTOR: María Teresa Pedro Font

DIRECTORES:

Dr. Rafael Carmena Rodríguez

Dr. José Tomás Real Collado.

D. Rafael Carmena Rodríguez, doctor en Medicina y Catedrático del departamento de Medicina de la Universidad de Valencia, y D. José Tomás Real Collado, doctor en Medicina y Profesor Titular del departamento de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Doña María Teresa Pedro Font, Licenciada en Medicina por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección la tesis doctoral titulada: **“EFECTO DE LA SOBRECARGA ORAL CON GRASA INSATURADA SOBRE LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN. ESTUDIOS DE LIPEMIA POSTPRANDIAL EN SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR HETEROCIGOTA”** para la obtención del título de doctora.

Y para que así conste en acta a los efectos oportunos, firman la presente,

Valencia 22 de Noviembre de 2011

Fdo Dr. Rafael Carmena

Fdo Dr. José Tomás Real.

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Carmena, director de esta tesis, por haberme hecho amar la Medicina y la Endocrinología desde la Facultad y poder estar actualmente satisfecha y realizada trabajando en aquello que me gusta.

Al Doctor Real, director de esta tesis, por haberme enseñado a pensar, a buscar sin dar nada por sentado y ser un ejemplo como clínico.

Al Doctor Ascaso por su apoyo en todo este trabajo y por todas las correcciones durante la etapa de médico residente que han servido para hacernos crecer a todos los que nos hemos formado a su lado.

A todo el personal de laboratorio por su ayuda inestimable tanto profesional como personal, sin ellos este trabajo no hubiese sido posible, en especial a Felipe Javier, Ana Bárbara, Vero y Sebastián.

A Geles, por su amistad y su ayuda en tantas y tantas extracciones.

Y finalmente a los pacientes y los voluntarios por su paciencia y colaboración.

A mi familia,

A Miguel, por su apoyo constante en todo momento y hacerme feliz

A mis hijos, Raúl y el futuro Miguel, por darme las mayores alegrías de mi vida

A mis padres, por darme todo y hacer de mi lo que soy

A Nati, por estar siempre a mi lado

Todo lo que no es dado es perdido
(Proverbio indio)

ÍNDICE

I. Introducción

1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular.
2. Hipercolesterolemia familiar.
3. Estrés oxidativo.
 - 3.1. Componentes del EO.
 - 3.2. Estrés oxidativo y arteriosclerosis.
 - 3.3. Estrés oxidativo y HF.
4. Inflamación sistémica.
 - 4.1 Inflamación e inicio de arteriosclerosis.
 - 4.2. Inflamación en HF.
5. Lipemia postprandial
 - 5.1. Fisiología de la lipemia postprandial.
 - 5.2 Lipemia postprandial en HF.
 - 5.3. Lipemia postprandial, disfunción endotelial y arteriosclerosis.
6. Efectos de los ácidos grasos dietarios sobre oxidación e inflamación

II. Hipótesis y objetivos.

III. Sujetos y métodos

IV. Resultados.

V. Discusión

1. Evaluación del test de sobrecarga grasa seleccionado.
2. Lipemia postprandial
3. Oxidación postprandial
4. Inflamación postprandial.

VI. Conclusiones.

VII. Bibliografía.

LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA: ácido araquidónico (C20:4)	INF γ : interferon gamma
ADMA: dimetilarginina asimétrica	IMC: índice de masa corporal
ADN: ácido desoxirribonucleico	iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible
AE: arteriosclerosis	<i>LDLR</i> : receptor de LDL
Apo: apolipoproteína	LDLox: LDL oxidadas.
CAT: catalasa	LPL: lipoproteinlipasa
CCL11: eotaxina	LPP: lipemia posprandial
cHDL: colesterol HDL	LRP: <i>LDLR</i> -related protein
CI: cardiopatía isquémica.	MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
cLDL: colesterol LDL	MDA: malondialdehido
COX-2: ciclooxigenasa 2.	MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1alfa
CRLPs: chylomicrons remnants like particles	NF- $\kappa\beta$: nuclear factor $\kappa\beta$.
CT: colesterol	NO: óxido nítrico
cVLDL: colesterol VLDL	n-3: ácidos grasos de la serie omega 3
DHA: ácido docosahexaenoico (C22:6)	n-6: ácidos grasos de la serie omega 6
ECV: enfermedad cardiovascular	O 2^- : anión superóxido
eNOS: sintetasa de óxido nítrico endotelial	OH $^-$: grupo hidroxilo
EPA: ácido eicosapentaenoico (C20:5)	ONOO $^-$: peroxinitritos
8-epi-PGF $_2$: prostaglandina F2-alfa-8 isoprostano	8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'- deoxiguanosina
EO: estrés oxidativo	PCRas: proteína C reactiva de alta sensibilidad
GPX: glutation peroxidasa	QM: quilomicrones
GSH: glutation reducido	ROOHs: hidroperóxidos lipídicos.
GR: glutation reductasa	ROS: reactive oxygen species
GS: glutation sintetasa	SOD(s): superóxido dismutasa(s)
GSS: glutation-s-transferasa	SOG: sobrecarga oral grasa
GSSG: glutation oxidado	TBARS: thiobarbituric reactive acid substances
γ GCT: gamma-glutamylcistein sintetasa	TG: triglicéridos
γ GT: gamma-glutamyl transpeptidasa	TNF α : factor de necrosis tisular α .
HFh: hipercolesterolemia familiar heterocigota	VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1
H $_2$ O $_2$: peróxido de hidrógeno.	XO: xantinoxidasa
IAM: infarto agudo de miocardio	
IL: interleucina	

I. INTRODUCCIÓN.

I. INTRODUCCIÓN.

1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de morbimortalidad en el mundo desarrollado, lo que supone en España aproximadamente el 40% de la mortalidad en la edad adulta¹. La arteriosclerosis es la principal causa de las ECV y afecta fundamentalmente a las arterias de mediano y gran calibre. La AE se caracteriza por el endurecimiento y la pérdida de elasticidad de la pared arterial, y la formación de una placa aterosclerosa que conduce al estrechamiento de su lumen; su posterior ruptura y formación de un trombo intraluminal provoca la isquemia y necrosis del territorio dependiente de la arteria ocluida².

Un factor inicial fundamental en el desarrollo de la placa de ateroma es el transporte de las partículas oxidadas de colesterol LDL (cLDL) a través del endotelio al interior de la pared arterial. Pero la arteriosclerosis es mucho más que una simple acumulación de lípidos en la pared arterial. Las lesiones arterioscleróticas son consecuencia de una serie de respuestas celulares y moleculares específicas que corresponden a un proceso inflamatorio. Los factores de riesgo, tales como la hipertensión y la diabetes, generan estrés oxidativo (EO) activando el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$); éste, a su vez, activa numerosos genes involucrados en el proceso inflamatorio. Este proceso inflamatorio y de estrés oxidativo está presente en el inicio, el desarrollo y en las complicaciones de las placas de aterosclerosis^{3,4}.

El riesgo de desarrollar AE y su complicación clínica, la enfermedad cardiovascular, no es uniforme en toda la población y depende de numerosos factores. Por ello, las ECV de origen arteriosclerótico son un modelo de patología multifactorial, donde confluyen tanto factores ambientales como genéticos. Uno de los principales factores de riesgo son las dislipemias. Éstas pueden ser primarias o secundarias y, dentro de las primarias, destaca por su alto riesgo cardiovascular la hipercolesterolemia familiar (HF).

2. Hipercolesterolemia familiar.

La HF es una enfermedad monogénica autosómica dominante del metabolismo lipoproteico caracterizada por valores plasmáticos elevados del cLDL, xantomas tendinosos, arco corneal y aterosclerosis coronaria prematura⁵. La prevalencia de heterocigotos en población general europea y española es aproximadamente de 1/500 sujetos, con una penetrancia del 100%. La HF es pues una de las enfermedades

monogénicas más frecuentes. Supone un problema de salud pública debido a la alta prevalencia de ECV prematura (< 55 años en hombre y < 65 años en mujeres) y a la reducción en la esperanza de vida observada en muchas familias con HF⁶.

Los criterios clínicos utilizados para identificar pacientes con HF incluyen: niveles altos de colesterol total (CT) y cLDL, historia familiar de hipercolesterolemia, depósitos de colesterol en tejidos extravasculares tales como los xantomas tendinosos o arco corneal, e historia personal y familiar de ECV prematura. Analizando la importancia y frecuencia de cada uno de éstos signos, un grupo holandés ha realizado unos criterios diagnósticos de HF heterocigota (HFh) (tabla 1)⁷. Son criterios fáciles de utilizar y tienen en cuenta todas las características de la enfermedad; sin embargo, el único diagnóstico inequívoco continúa siendo la identificación de la mutación genética responsable de la enfermedad.

Tabla 1: Criterios clínicos modificados MEDPED para el diagnóstico de la hipercolesterolemia familiar heterocigota.

Criterios Med Ped	
Historia familiar	
Familiar de primer grado con enfermedad coronaria o vascular prematura	1
Familiar de primer grado con cLDL > percentil 95	1
Familiar de primer grado con xantomas o arco corneal	2
Niños < 18 años con cLDL > percentil 95	2
Historia personal	
Enfermedad coronaria	2
Enfermedad vascular cerebral o periférica	1
Signos físicos	
Xantomas tendinosos	6
Arco corneal < 45 años	4
Determinaciones sanguíneas (con TG < 200 mg/dL)	
LDL-c > 330 mg/dL	8
LDL-c 250-329 mg/dL	5
LDL-c 190-249 mg/dL	3
LDL-c 155-189 mg/dL	1
Análisis del ADN	
Presencia de mutación funcional en el receptor de LDL	8
Diagnostico: cierto ≥8; probable 6-7, posible 3-5.	

La HF está causada por mutaciones en el gen del receptor de LDL (*LDLR*), situado en el brazo corto del cromosoma 19 (19p13.1-19.3) y del que se han descrito más de 1000 mutaciones funcionales⁸. Las mutaciones se clasifican funcionalmente en 5 clases. Los alelos o mutaciones nulas (clase I) son aquellas en las que no existe receptor inmunoprecipitable. Las de clase II se caracterizan por alterar el transporte del receptor hasta la membrana celular; las de clase III, por afectar a la unión con la lipoproteína LDL; las de clase IV alteran la internalización del complejo partícula LDL-receptor y, finalmente, las de clase V afectan al reciclado del receptor⁹. De estas mutaciones, las más graves son las nulas (clase I), en las que no se sintetiza *LDLR*, y las mutaciones en la porción 5' del exón 4, que codifica la zona 5 de repeticiones del *LDLR* (clase III), imprescindible para la unión con la apo B/E¹⁰.

A pesar de la naturaleza hereditaria de la enfermedad, la HF presenta una gran variabilidad en la expresión fenotípica, así como en la incidencia y gravedad de la cardiopatía isquémica¹¹. Esta variabilidad depende tanto de factores genéticos como ambientales. Estudios acerca de la influencia del tipo de mutación del *LDLR* sobre la expresión clínica de la enfermedad demuestran, en general, que los individuos con HF con mutaciones nulas (clase I) presentan valores superiores de CT y cLDL, mayor prevalencia de xantomas, peor respuesta terapéutica a estatinas y mayor prevalencia de cardiopatía isquémica (CI) temprana^{12, 13,14}. También se ha demostrado que la ausencia de la región promotora del *LDLR* provoca una hipercolesterolemia mayor que la producida por mutaciones nulas¹⁵. Otros factores, tales como la edad, la obesidad abdominal, niveles altos de TG y bajos de HDL¹¹, el genotipo apo E¹⁶, el cociente CT/cHDL¹⁷ influyen en la aparición de enfermedad coronaria en estos pacientes.

La dieta es otro factor que debe estar implicado en la expresión fenotípica de la enfermedad, tanto por el efecto de los nutrientes en sí mismos como por la relación de la dieta con los anteriores factores ya demostrados, tales como la trigliceridemia o los niveles de HDL. Sin embargo, los datos actuales en población con HF son escasos. La dieta recomendada para los pacientes HF es la de la NCEP-ATPIII (tabla 2), que está basada en estudios de intervención dietética en población general.

Tabla 2: Recomendaciones nutricionales para pacientes HF.

Nutriente	Ingesta recomendada
Grasa saturada	<7% de las calorías totales
Grasa poliinsaturada	≤ 10% de las calorías totales
Grasa monoinsaturada	≤ 20% de las calorías totales
Grasa total	25-35% de las calorías totales
Carbohidratos	50-60% de las calorías totales
Proteínas	15% de las calorías totales
Colesterol	<200 mg diarios
Fibra	20-30 g diarios
Esteroles	1,5-2 g diarios
Calorías totales	Las necesarias para mantener un peso deseable.

De todos estos nutrientes, los esteroles son los más estudiados en población HF. Han demostrado un efecto beneficioso en las concentraciones de cLDL a través de la inhibición en la absorción intestinal de colesterol, incluso en dietas con bajo contenido en colesterol¹⁸. Incluso se ha estudiado su uso en población pediátrica, alcanzando reducciones del 10% en las concentraciones de cLDL¹⁹.

En cuanto a la grasa dietética, las recomendaciones se basan en los estudios de intervención que demuestran que un patrón de ingesta saludable basado en una dieta mediterránea rica en aceite de oliva, reduce el riesgo cardiovascular independientemente de los factores de riesgo clásicos²⁰. Este efecto beneficioso se cree que está mediado por una variedad de mecanismos que incluyen una mayor protección antioxidante y una regulación de los procesos inflamatorios y trombogénicos²¹.

Sin embargo, el efecto concreto sobre el perfil lipídico y los mecanismos inflamatorios y oxidantes que cada tipo de grasa alimentaria desempeña en los sujetos HF es todavía desconocido. Estudios de lipemia postprandial podrían ayudarnos a explicar, en parte, la heterogenicidad en la expresión fenotípica de la enfermedad. Además, la alteración del *LDLR* que caracteriza a esta enfermedad, no solo influye sobre las concentraciones de LDL, sino que puede estar influyendo en la captación hepática de las lipoproteínas ricas en triglicéridos; exacerbando así la lipemia postprandial normal y aumentando los efectos en la inflamación y oxidación sistémica derivada de ésta.

3. Estrés oxidativo.

3.1 Componentes del EO.

La instauración del proceso de estrés oxidativo ocurre por la existencia de un desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, a favor de los primeros, llevando a la generación de grandes cantidades de radicales libres o al detrimento de la velocidad de neutralización de éstos. En condiciones normales, existe un equilibrio entre la producción y degradación de radicales libres, principalmente derivados de oxígeno, funcionando incluso como señales celulares imprescindibles para la actividad celular²². Cuando existe un exceso moderado de productos de estas moléculas se produce el EO, que origina una serie de daños celulares a varios niveles (lípidos de membranas, ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas)²³, así como una serie de reacciones de oxidación de diferentes componentes sanguíneos (oxidación de lipoproteínas, eliminación del óxido nítrico (NO) circulante, etc). Esta oxidación de biomoléculas conduce a una pérdida de sus funciones biológicas, al descontrol homeostático y al potencial daño oxidativo contra las células y tejidos²⁴. La importancia del estrés oxidativo y los productos a los que da lugar radica en su implicación en el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles, tales como la obesidad, la arteriosclerosis y la ECV, la diabetes, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer²⁵.

Los principales agentes oxidantes implicados en la AE son los denominados “reactive oxygen species” (ROS)²⁶ que son una familia de moléculas que se producen en todas las células aerobias, muchas de las cuales tienen electrones desapareados y se comportan como radicales libres. Estas moléculas además, interactúan con los mecanismos de señalización vascular, lo cual parece tener un papel fundamental en el control de la función endotelial. Dentro de los ROS se incluyen moléculas tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el grupo hidroxilo (OH^{\cdot}) y radicales lipídicos. Otros ROS, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitritos ($ONOO^-$) y ácido hipocloroso no son radicales libres per se, pero tienen efecto oxidativo que también contribuye al EO²⁷. Cuando la producción de radicales libres y/o especies reactivas supera la capacidad de acción de los antioxidantes, se favorece la oxidación de biomoléculas, generando metabolitos específicos, marcadores del estrés oxidativo, que pueden ser identificados y cuantificados. Se basan, sobre todo, en el análisis de la oxidación de lípidos, proteínas y del ADN, siendo los primeros los de mayor expresión. Otra forma de abordar la

evaluación del EO es la que emplea métodos indirectos, basados en la capacidad antioxidante. Por último, existen numerosos sistemas enzimáticos que potencialmente pueden producir ROS en la pared vascular, pero tres parecen predominar sobre los demás: XO, NADH/NADPH oxidasa y NO sintasa ²⁷; conocer sus actividades o expresión genética es otra forma de aproximarnos al EO (tabla 3).

Tabla 3: Descripción de algunos marcadores de estrés oxidativo y enzimas relacionadas con el EO.

<i>Marcadores</i>	Descripción
<i>Basados en la oxidación de lípidos</i>	
MDA	Aldehídos: productos de la oxidación de lípidos, el más abundante, el MDA, resulta de la oxidación de los ácidos grasos AA, EPA y DHA.
TBARS	Medida de la formación de MDA
8-epiPGF ₂	F ² -isoprostanos: derivados del AA, el más representativo es el 8-epiPGF ₂ .
Etano y pentano	Hidrocarburos volátiles, productos de la oxidación de los ácidos grasos n-3 y n-6.
LDL-ox	Daño oxidativo a la molécula transportadora de colesterol
<i>Basados en la oxidación de proteínas</i>	
Carbonilos	Resultado de la acción de las especies reactivas sobre las cadenas laterales de los aminoácidos
3-Nitrotirosina	Resultado de la acción de las ERONs sobre las proteínas
<i>Basados en la oxidación de ADN</i>	
8-oxo-dG	Resultado de la oxidación del ácido nucleico, guanina
5-HM-dU	Resultado de la oxidación del ácido nucleico, timina
<i>Capacidad antioxidante</i>	
TAS	Antioxidantes totales presentes en la muestra
FRAP	Antioxidantes que no contienen ligaciones S-H
ORAC	Antioxidante específico, evaluado por medio de pruebas de fluorescencia.
ADMA	Inhibidor de la acción de la NOS
<i>Enzimas oxidantes</i>	
NADH/NADPH oxidasa	Generan O ₂ ⁻ , y pueden conducir a la disfunción endotelial por reducción de la biodisponibilidad de NO.
eNOS	
XO	

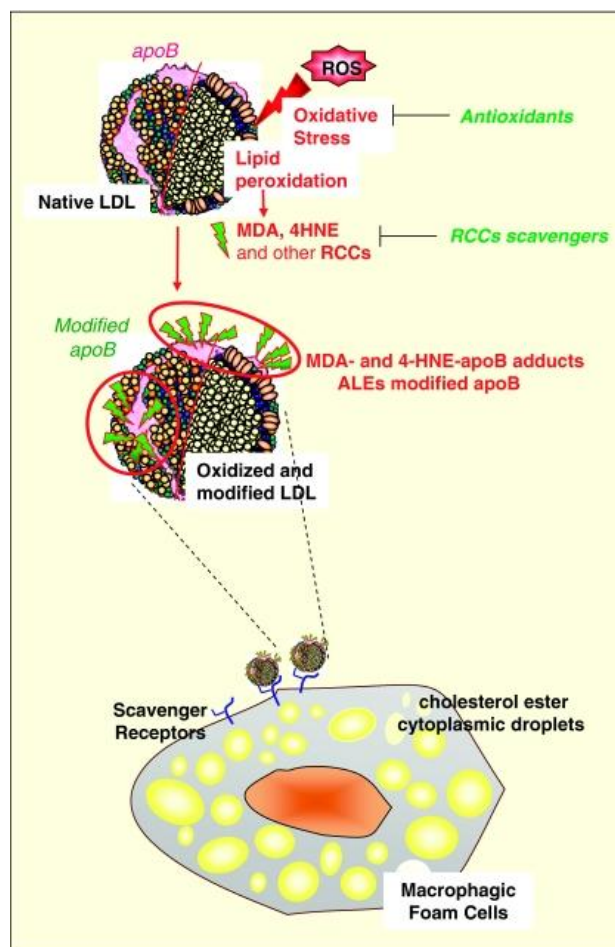
5-HMdU: 5-Hidroximetil-2'-Desoxiuridina; **8-epiPGF₂:** Prostaglandina F₂-Alfa-8 Isoprostano; **8-oxo-dG:** 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; **AA:** Ácido Araquidónico (C20:4); **ADMA:** Dimetilarginina Asimétrica; **DHA:** Ácido Docosahexaenoico (C22:6); **EPA:** Ácido Eicosapentaenoico (C20:5); **ERON's:** Especies Reactivas de Oxígeno y Nitrógeno; **FRAP:** Ferric Reducing Ability of Plasma; **LDL-ox:** LDL oxidadas; **MDA:** Malonil-di-aldehído; **n-3:** Ácidos grasos de la serie Omega 3; **n-6:** Ácidos grasos de la serie Omega 6; **NOS:** Sintasa de óxido nítrico; **ORAC:** Oxygen-Radical Absorbance Capacity; **S-H:** ligación hidrógeno sulfuro; **TAS:** Total Antioxidant Status; **TBARS:** Thiobarbituric Reactive Acid Substances, **XO:** xantín-oxidasa, **eNOS:** sintetasa endotelial de NO.

De los anteriores, destacamos algunos productos de la oxidación por su importancia en nuestro estudio. El malonil-di-aldehído (MDA) es uno de los cetoaldehídos más abundantes, resultantes de la peroxidación de los ácidos araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico. El exceso de MDA producido

como resultado del daño tisular puede combinarse con grupos amino libres de las proteínas, generando modificaciones en las mismas, alterando sus propiedades biológicas y haciéndolas inmunogénicas; en algunos estudios, los autoanticuerpos generados contra ellas se han asociado con procesos arterioscleróticos²⁸. Además, juega papel principal en la modificación de las LDL y su metabolización por los macrófagos²⁹. El EO induce la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las LDL. Ésta peroxidación lipídica produce compuestos aldehídos como el MDA. Éstos, a su vez, son capaces de reaccionar con los residuos lisina de la apoB y modificarla. La afinidad de las LDL modificadas por el receptor apoB/E disminuye a mayor modificación de apoB. Así, las LDL oxidadas con alteración de apoB son captadas por los receptores scavenger de los macrófagos, los cuales, al cargarse de ésteres de colesterol se transformaran en células espumosas, iniciando el proceso de arteriosclerosis³⁰ (figura 1).

Figura 1: Modificación de LDL y formación de células espumosas.

Tomada de: A Negre-Salvayre, C Coatrieux, C Ingueneau, R Salvayre. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. Br J Pharmacol. 2008;153:6-20.



Actualmente existe evidencia que las LDLox están presentes in vivo en las placas de ateroma arteriales ³¹. En condiciones de estrés oxidativo, las modificaciones oxidativas de la partícula de LDL pueden producirse en el espacio subendotelial de la pared arterial ³¹ y pudiendo pasar posteriormente una pequeña cantidad de LDLox a la circulación ³². Cuando las LDL “completamente oxidadas” entran en la circulación en pequeñas cantidades serán rápidamente eliminadas por el sistema retículo endotelial, fundamentalmente a nivel hepático, o bien serán neutralizadas por autoanticuerpos circulantes frente a LDLox ³³. Por el contrario, las LDL “mínimamente modificadas”, en las que los cambios oxidativos no han sido suficientes para que sean reconocidas por los receptores scavenger, son las que encontraremos en la circulación ³⁴. En diversos estudios clínicos, la LDL ox se ha relacionado con enfermedad arterial coronaria ^{35,36}, incluso con arteriosclerosis subclínica en población sana ³⁷. Además, niveles elevados en plasma y en la placa de ateroma de LDLox se han relacionado con la vulnerabilidad de las placas ³².

Los F2-isoprostanos se producen tras la peroxidación del ácido araquidónico mediante mecanismos dependientes de la vía de la ciclooxigenasa. De éste grupo de sustancias, el más conocido es el 8-epi-PGF2 debido a que es uno de los productos de la peroxidación del araquidonato más abundante y ha demostrado ser biológicamente activo ³⁸. Los isoprostanos tienen unas actividades in vitro que pueden ser relevantes en la fisiopatología de la arteriosclerosis: promueven la activación plaquetaria ³⁹ e inducen la proliferación de las células musculares lisas vasculares ⁴⁰ y fibroblastos ⁴¹. Además la producción de isoprostanos aumenta con la oxidación in vitro de las LDL ⁴² y contribuyen al efecto de adhesión de los neutrófilos al endotelio inducido por las LDL mínimamente oxidadas ⁴³. En pacientes con diabetes ⁴⁴ y enfermedad cardiovascular ⁴⁵ se han descrito niveles plasmáticos y/o urinarios elevados de 8-epi-PGF2.

El ADN está sujeto continuamente al daño oxidativo de los oxidantes endógenos. El ADN oxidado se repara continuamente y las bases oxidadas se secretan por la orina. La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), es un producto de reparación del daño oxidativo del ADN, utilizado como indicador de estrés oxidativo intracelular ⁴⁶. Niveles aumentados de 8-oxo-dG se descrito en pacientes con diabetes mellitus ⁴⁷ y con insuficiencia renal crónica ⁴⁸. Numerosas evidencias indican que el 8-oxo-dG urinario no es sólo un marcador general de estrés oxidativo celular, sino que podría ser un factor de riesgo de arteriosclerosis y diabetes. En placas de ateroma humanas, se han encontrado niveles aumentados de 8-oxo-dG y en pacientes con diabetes tipo 2, sus

niveles se han relacionado con la severidad de la neuropatía y la retinopatía diabética^{47,49}.

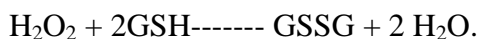
Por otro lado, las defensas antioxidantes tienen la función de inactivar las especies reactivas de oxígeno y/o radicales libres, y como consecuencia, proteger contra los daños oxidativos. Tales acciones pueden ser llevadas a cabo por medio de distintos mecanismos: impidiendo la formación de los radicales libres y/o especies reactivas (sistema de prevención), inhibiendo la acción de estos éstos (sistema barredor) y favoreciendo la reparación y reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación)⁵⁰. Las defensas antioxidantes son clasificadas, principalmente, en enzimáticas y no enzimáticas (tabla 4). Los sistemas antioxidantes enzimáticos limitan el acúmulo intra y extracelular de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en situación basal⁵¹. Estos sistemas incluyen: superóxido dismutasa (SOD), que convierte O_2 en H_2O_2 , para prevenir la reacción de O_2 con NO, evitando así la formación de peroxinitritos; catalasa (CAT), que reduce H_2O_2 a agua, directamente; glutatión peroxidasa (GPX), que reduce H_2O_2 a agua, y peróxidos lipídicos a alcoholes lipídicos, mediante la oxidación de otros sustratos; glutatión reductasa (GR), que reduce glutatión; y glutatión-s-transferasa (GSS), que detoxifica oxidantes.

Tabla 4: Acciones y mecanismos de sustancias y enzimas antioxidantes.

<i>Antioxidantes</i>	Acción
<i>No enzimáticos (de origen dietético)</i>	
Vitamina A (β -caroteno)	Protección contra la oxidación de lípidos y ADN.
Vitamina C (ácido ascórbico)	Inhibición de las EROs (agente reductor). Estimula el poder antioxidante de la vitamina E y selenio. Protección contra los daños causados por la LDL-ox.
Vitamina E (α -tocoferol)	Protección contra la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular y de las LDL. Convierte O_2^{\cdot} y H_2O_2 en formas menos reactivas.
Cu, Zn, Mn, Se	Cofactores de las enzimas antioxidantes SOD-Cu/Zn, SOD-Mn y GPX.
Otros carotenoides (licopeno)	Protección contra la oxidación de lípidos, LDL, proteínas y ADN. Secuestro e inactivación de radicales libres.
Fotoquímicos (resveratrol, catequinas, quercetinas, ácidos fenólicos y otros)	Protección contra la oxidación de lípidos y ADN
<i>Enzimáticos</i>	
SOD	SOD-Cu/Zn (citosol), SOD-Mn (mitocondria). Catálisis de la conversión de O_2^{\cdot} en H_2O_2
CAT	Catálisis de la conversión de H_2O_2 en O_2 y H_2O
GPX	Reducción de H_2O_2 a H_2O y peróxidos lipídicos a alcoholes lipídicos
GSR	Reducción de glutatión

Cu: Cobre, **Mn:** Manganeso; **Se:** Selenio, **Zn:** Zinc.

El glutathion es un tripéptido constituido por tres aminoácidos: glicina, cisteína y ácido glutámico. Es el principal antioxidante intracelular, para lo cual usa el grupo tiol de la cisteína como agente reductor. Actúa reduciendo especies reactivas del oxígeno como H_2O_2 gracias a la enzima GPX la cual cataliza la siguiente reacción:



Actualmente, se conoce que GSH actúa no sólo como un agente reductor y el principal agente antioxidante intracelular manteniendo un estrecho control del estado redox, sino que también participa como mediador en múltiples reacciones fisiológicas tales como la señalización celular (participando en la regulación del ciclo celular, proliferación y apoptosis), el metabolismo de xenobióticos, las reacciones de intercambio de grupos tiol y como reservorio de cisteína⁵². Estas propiedades biológicas han hecho que el papel de GSH se haya estudiado en múltiples enfermedades incluyendo el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, envejecimiento, isquemia y en enfermedades metabólicas (diabetes y obesidad).

El glutathion se produce intracelularmente en todos los órganos y tipos celulares, siendo más abundante en hígado y pulmón. Las concentraciones plasmáticas de GSH son relativamente bajas ($\sim 0,01\text{mM}$), debido a su rápido catabolismo. Intracelularmente, GSH puede existir como monómero en su forma reducida o como un dímero disulfuro debido a su oxidación (GSSG), el cual supone en condiciones normales menos del 1% del contenido intracelular de glutathion. Los aumentos de GSSG son contrarrestados rápidamente al ser reducido por la GR. Sin embargo, en condiciones de altos niveles de EO, se puede alterar la actividad de la GR produciéndose un aumento en la concentración de GSSG intracelular, que pasará al compartimento extracelular mediante receptores específicos⁵².

La síntesis de glutathion de novo está mediada por la actividades de las enzimas gamma-glutamylcistein sintetasa (γ -GCT) y la glutathion sintetasa (GS). El glutathion formado se distribuye libremente en el citosol alcanzando concentraciones de hasta 10 mM, y puede compartimentalizarse (hasta un 15%) en la mitocondria, retículo endoplásmico y núcleo, para cumplir sus procesos biológicos⁵³. El glutathion también puede sintetizarse por otras vías que incluyen su catabolismo. El catabolismo del glutathion está mediado por la gamma-glutamyl transpeptidasa (γ -GT), que se expresa en la superficie celular. No solo participa en el catabolismo de GSH sino también de GSSG y GSH-conjugados (tioésteres, mercaptanos...). La γ -GT retira la fracción gamma-glutamyl de GSH y los

compuestos de GSH-conjugados y la trasfiere a otros aminoácidos y péptidos, produciendo así gamma-glutamil- aminoácidos y péptidos cisteín-glicina (Cys-gly). Estos últimos son hidrolizados por dipeptidasas y transportados intracelularmente por receptores específicos para regenerar el GSH.

Como GSH constituye la mayor defensa antioxidante intracelular, su depleción puede ser una causa o prerrequisito para la generación de ROS, el cual podría desencadenar una amplia gama de respuestas celulares adversas (tabla 5).

Tabla 5: Reacciones de oxido-reducción mediadas por GSH.

<i>Precursores</i>		Productos
GSH + $\cdot\text{OH}^-$	$\Rightarrow \Rightarrow$	$\text{GS}^+ + \text{H}_2\text{O}$
GSH + $\text{O}_2^- + \text{H}^+$	$\Rightarrow \Rightarrow$	$\text{GS}^+ + \text{H}_2\text{O}$
GSH + NO + O_2	$\Rightarrow \Rightarrow$	$\text{GSNO} + \text{O}_2^-$
GSH + R^{\cdot}	$\Rightarrow \Rightarrow$	$\text{GS}^+ + \text{RH}$
GSH + DNA^{\cdot}	$\Rightarrow \Rightarrow$	$\text{GS}^+ + \text{DNA}$
2 GSH + H_2O_2	$\Rightarrow \text{GPX} \Rightarrow$	$\text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$
2 GSH + LOOH	$\Rightarrow \text{GPX} \Rightarrow$	$\text{GSSG} + \text{LOH} + \text{H}_2\text{O}$
2 GSH + Dihidroascorbato	$\Rightarrow \text{DRH} \Rightarrow$	$\text{GSSG} + \text{ácido ascórbico}$
2 GSH + Proteína-SSX	$\Rightarrow \text{GRX} \Rightarrow$	$\text{GSSG} + \text{Proteína-} (\text{SH}_2)\text{X}$
GSH + Proteína-SSG	$\Rightarrow \text{GRX} \Rightarrow$	$\text{GSSG} + \text{Proteína- SH}$
GSH + M^{n}	$\Rightarrow \Rightarrow$	$\text{M}^{\text{n}-1} + \text{GS}^{\cdot}$
GSH + PGG_2	$\Rightarrow \text{PES} \Rightarrow$	$\text{GSSG} + \text{PGH}_2$
$\text{GS}^{\cdot} + \text{GS}^{\cdot}$	$\Rightarrow \Rightarrow$	GSSG
$\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+$	$\Rightarrow \text{GR} \Rightarrow$	$2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$

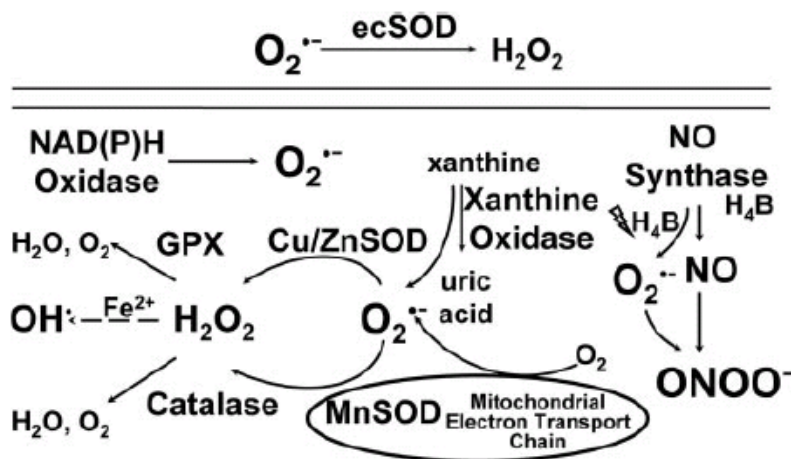
GSH: glutation reducido, GSSG: glutation oxidado; GS^{\cdot} : radical tiil, GSNO: glutation nitroso, $\cdot\text{OH}$: radical hidroxilo, O_2^- : anión superóxido, HADPH: β -nicotinamida adenin dinucleótido fosfato, Proteína-SSG: proteína mezcla disulfito, Proteína-SSX, proteína unión bisulfito, LOOH: hidroperóxido lipídico; LOH, alcohol, R^{\cdot} , radical secundario; DNA^{\cdot} , radical DNA, M: metales, Proteína-SH: proteína sulfidriilo o proteína tiol; PGG_2 : prostaglandina G_2 , PGH_2 , prostaglandina H_2 , PES: prostaglandina endoperóxido sintetasa; GRX: glutaredoxina.

Las GPX son, una familia de enzimas tetraméricos, que requieren moléculas tales como el GSH para reducir H_2O_2 y peróxidos lipídicos, a sus correspondientes alcoholes, junto con la producción de glutation oxidado. Hasta el momento, se han descrito 4 isoformas de GPX: GPX-1 (GPX celular), que es ubiquitaria, y reduce H_2O_2 así como peróxidos de ácidos grasos libres, pero no peróxidos de lípidos esterificados, ya que éstos son reducidos por GPX-4, que se localiza en la membrana. La GPX-1 es la enzima antioxidante clave en la mayoría de células. La GPX-2 (GPX gastrointestinal) está localizada en las células del epitelio gastrointestinal, donde es útil para reducir los peróxidos de la dieta; y GPX-3 (GPX extracelular), que es el único miembro de la familia de GPX, que reside en el compartimento extracelular, y se cree que es el enzima

antioxidante extracelular más importante en los mamíferos⁵⁴. En la figura 2 se resumen las acciones de las principales enzimas celulares implicadas en la producción y la eliminación de las ROS.

Figura 2: Enzimas oxidantes y antioxidantes en las células endoteliales.

Tomado de Wassman S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004;44:381-386

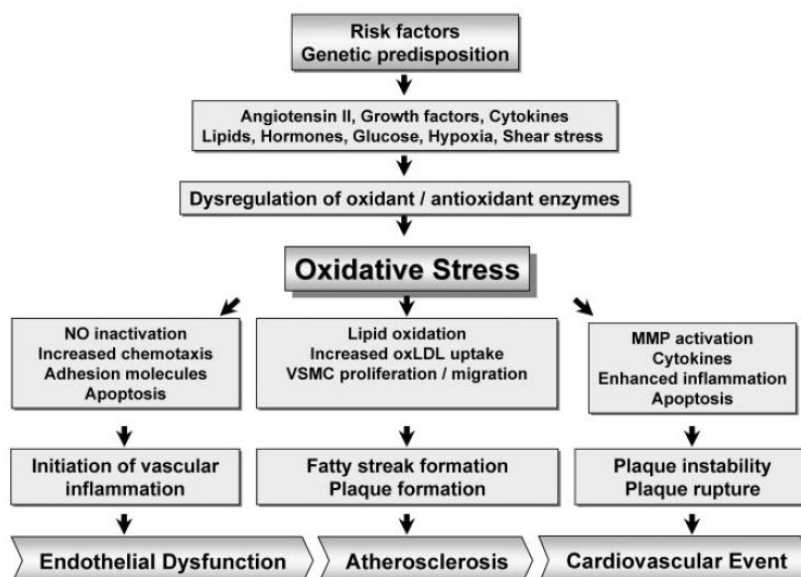


3.2 Estrés oxidativo y arteriosclerosis.

Los factores de riesgo cardiovasculares que predisponen a la arteriosclerosis están asociados con el estrés oxidativo. El estrés oxidativo puede desencadenar una amplia gama de respuestas celulares, tales como la inactivación de NO, modificaciones oxidativas del DNA y proteínas, oxidación lipídica, aumento de la mitogenicidad y apoptosis en células vasculares y la activación o represión de genes sensibles al estrés oxidativo, tales como el receptor para las LDLox, moléculas de adhesión, factores quimiotácticos, citocinas proinflamatorias o reguladores del ciclo celular (figura 3). Factores de riesgo cardiovascular como la hipertensión, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y el tabaco, se han asociado con el estrés oxidativo y la alteración en la expresión y actividad de enzimas oxidantes y antioxidantes. Los efectos anteriormente descritos de ROS y la alteración en el NO de las células vasculares contribuyen al desarrollo y progresión de la arteriosclerosis en todos los estadios de la enfermedad⁵⁵.

Figura 3: Fisiopatología del estrés oxidativo y relevancia en la enfermedad cardiovascular.

Tomado de Wassman S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*. 2004;44:381-386



Tanto en la pared arterial dañada como en la placa de ateroma se han encontrado niveles elevados de ROS. Varios estudios han demostrado una actividad aumentada de NAD(P)H oxidasa en lesiones arterioscleróticas en animales y humanos tras una lesión vascular^{56,57}. También se han descrito actividades aumentadas de XO y disminución de SOD en arterias coronarias y en plasma de pacientes con enfermedad coronaria⁵⁸. Blankenberg y colaboradores⁵⁹ encontraron que una concentración plasmática baja de GPX1 constituía un factor de riesgo independiente de enfermedad coronaria, incluso se ha encontrado una baja actividad GPX en placas de carótidas arterioscleróticas⁶⁰. Todos estos datos apuntan que la modulación de enzimas oxidantes y antioxidantes, que determinan el nivel de EO, juega un papel importante en la patogénesis de la arteriosclerosis.

3.3 Estés oxidativo en la hipercolesterolemia familiar heterocigota.

Estudios experimentales han observado un aumento en la producción de radicales libres de leucocitos de pacientes hipercolesterolémicos⁶¹. Estudios previos también han observado aumentos de los isoprostanos urinarios en pacientes con

hipercolesterolemias moderadas y severas; correlacionando los niveles de 8-epi-PGF2 con los de LDLc ^{62,63}.

Estudios específicos en pacientes HF han mostrado que en condiciones basales de ayuno existe un aumento del EO, especialmente aquellos con enfermedad cardiovascular, sugiriendo que el mayor nivel de EO podría preceder al desarrollo de AE. Nourooz-Zadeh y cols ⁶⁴, objetivaron un aumento plasmático del 16% en los niveles de hidroperóxidos lipídicos (ROOHs) y del 56% de los de 8-epiPGF2 en pacientes HFh frente a controles; asimismo, los pacientes HF con enfermedad vascular tenían un mayor nivel de EO que aquellos libres de enfermedad vascular. Con ello se sugería que los niveles de EO ya estaban incrementados en estadíos iniciales de la enfermedad y que se duplicaban (+ 100% el 8-epiPGF) cuando se complicaba con enfermedad cardiovascular. Estudios en niños con dislipemia IIa no objetivaron aumentos de isoprostanos urinarios frente a controles apareados por edad y sexo ⁶⁵. Esto sugiere que los niveles de EO en los pacientes con HFh aumentarían progresivamente con la edad y con la aparición de enfermedad cardiovascular.

4. Inflamación sistémica

4.1 Inflamación e inicio de arteriosclerosis.

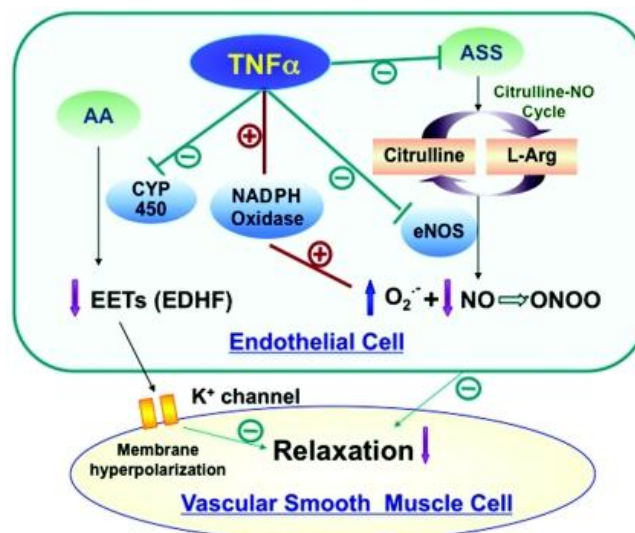
Al igual que el EO, la inflamación y la activación persistente del sistema inmune es un elemento fundamental en la patogenia de la arteriosclerosis ³. El evento inicial de la arteriosclerosis implica la disfunción endotelial causada por factores aterogénicos, los más conocidos actualmente son las LDL modificadas y los productos de glicosilación avanzada en la diabetes. Esta alteración funcional provoca el aumento en la expresión de señales moleculares aterogénicas, que incluyen las moléculas de adhesión como VCAM-1(vascular cell adhesión molecule-1), quimiocinas como la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), y otros múltiples factores de crecimiento y citocinas tales como el interferón gamma (INF γ), el factor de necrosis tisular alfa (TNF α), las interleucinas (IL) 1, IL-6 y la IL-8 entre otros⁶⁶. Estas moléculas de señalización permiten la adhesión de monocitos y linfocitos T al endotelio y su paso a la íntima. Los mocitos sufren una transformación en macrófagos y finalmente forman las células espumosas características de la estría grasa, el primer precursor morfológicamente visible de la placa de ateroma. Las mismas moléculas son también responsables del crecimiento y desestabilización de la placa, siendo capaces de

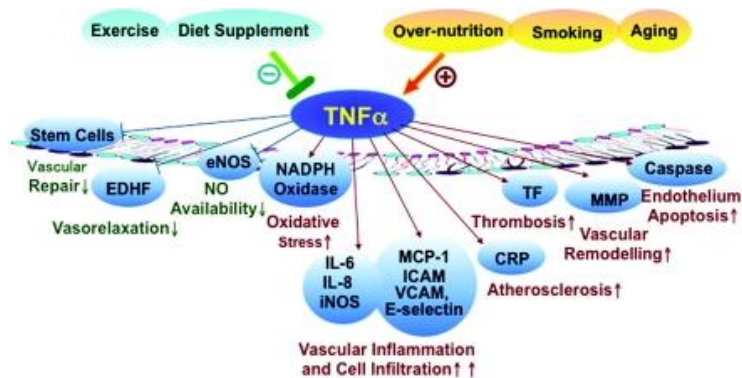
promover su ruptura y de la naturaleza trombogénica de la placa a través del aumento en la expresión de moléculas como el factor tisular. Las moléculas anteriores son productos secretados por macrófagos, linfocitos y células endoteliales activadas y son, a su vez, inducibles por las citocinas. Así pues se pueden considerar mediadores de la inflamación vascular local. Los macrófagos de la íntima perpetúan el ciclo de la inflamación con citocinas proinflamatorias, que conducen a la producción de metaloproteínas que degradan la matriz celular y contribuyen a la ruptura de la placa⁶⁶.

TNF α , producida principalmente por macrófagos, es una de las citocinas proinflamatorias inmunomoduladoras más importantes. Es liberada en el lugar de la inflamación y juega un papel principal en el reclutamiento y la activación de células inflamatorias⁶⁷. TNF- α induce la expresión genética de varias citocinas proinflamatorias y quimiocinas, tanto de forma dependiente como independiente de la activación del factor transcripcional NF- κ B⁶⁸. Estas señales mediadas por TNF- α inician y aceleran la aterogénesis, la trombosis, la remodelación vascular, la inflamación vascular, la apoptosis endotelial, el estrés oxidativo vascular y la alteración en la biodisponibilidad de NO, contribuyendo a la disfunción vascular (figura 4). Su posible papel en la AE procede de los resultados de distintos estudios realizados en animales. Así, se ha observado que la inhibición de TNF α soluble supone una importante reducción del tamaño de la lesión⁶⁹, y que la deficiencia de TNF α en ratones se asoció específicamente con menor presencia de lesiones avanzadas⁷⁰.

Figura 4: Papel de TNF α en la disfunción vascular.

Tomado de Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF- α in vascular dysfunction. Clin Sci (Lond). 2009 Feb;116(3):219-30.





IL-1 es también una citocina proinflamatoria. Su relación con la patogenia de la AE se ha estudiado en ratones con deficiencia de IL-1 o ausencia de receptor de IL-1. Se ha visto, que la ausencia de IL-1 en ratones apo E^{-/-} reduce la presencia de AE aproximadamente en un 30%⁷¹, y que la ausencia de receptor de IL-1 ha mostrado recientemente un importante descenso en el desarrollo de AE en ratones apoE^{-/-}⁷². Por lo que respecta a IL-6, se trata también de una importante citoquina inflamatoria asociada con AE y otras enfermedades inflamatorias, que es expresada de forma abundante en las lesiones arterioscleróticas⁷³. IL-6 estimula la expresión de factor tisular, de receptores de LDL a nivel macrofágico, de PCR y fibrinógeno, y la agregación plaquetaria. Además, regula la expresión de otras citocinas inflamatorias tales como IL-1 y TNF α . IL 6 es el medidor central en la respuesta de fase aguda, y es el principal inductor de la producción hepática de PCR, que junto con IL-1 y TNF α , se ha asociado con riesgo de patología arterial coronaria en numerosos estudios^{74,75}. Por último, se ha demostrado que la administración de concentraciones suprafisiológicas exógenas de IL-6 en ratones ApoE^{-/-} exacerba la formación de lesiones arterioscleróticas⁷⁶, aunque también existen estudios que sugieren un papel protector de esta última^{77,78}.

La MCP-1, un potente agente quimiotáctico de monocitos, parece desarrollar un papel central en el inicio de la arteriosclerosis y la reestenosis post-angioplastia. Estudios en animales han mostrado que el bloqueo de su receptor CCR2 reduce las lesiones de arteriosclerosis y la reestenosis de injertos vasculares al inhibir la adhesión de la monocitos a la pared arterial y reducir el contenido de macrófagos de la placa de ateroma⁷⁹. Por otra parte, la eotaxina (CCL11), una citocina quimiotáctica de eosinófilos y linfocitos, y la MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1alfa), quimiotáctica de neutrófilos, se encuentran sobreexpresadas en los vasos con lesiones de arteriosclerosis;

sus niveles circulantes se han relacionado con la presencia y extensión de enfermedad coronaria^{80,81}.

4.2 Inflamación en la hipercolesterolemia familiar heterocigota.

En los pacientes HF en edad adulta y en situación de ayuno se ha demostrado que existe una elevación en los marcadores inflamatorios. Ottestad y colaboradores describieron aumentos en la expresión de TNF α e IL8 en leucocitos periféricos y de ICAM-1 sérica junto con una disminución de la capacidad antioxidante total en sujetos HF frente a controles⁸². En población pediátrica también se ha evidenciado la presencia de una inflamación de bajo grado, con aumentos plasmáticos de PCRas, neopterina, ICAM-1, IL1 β ⁸³ y relacionándose éstos con la disfunción endotelial ya presente en estos niños HF⁸⁴. Además, Wissen y colaboradores, mostraron que descensos en los niveles de PCRas en sujetos HF tratados con estatinas se relacionaban con las reducciones en el grosor de la íntima media carotídea, una medida de la extensión de la enfermedad arteriosclerótica, independientemente de las reducciones de LDLc⁸⁵. En este sentido, un reciente metaanálisis ha determinado que sólo los niveles de PCR y fibrinógeno están relacionados con el grosor de la íntima media carotídea, sin poder extraer resultados concluyentes sobre otros marcadores de inflamación debido a la heterogeneidad metodológica entre los diferentes estudios analizados⁸⁶. Todos estos datos nos destacan la importancia del papel de la inflamación sistémica en una enfermedad con alto riesgo vascular y su estrecha relación con el desarrollo de arteriosclerosis en la HF.

5. Lipemia postprandial.

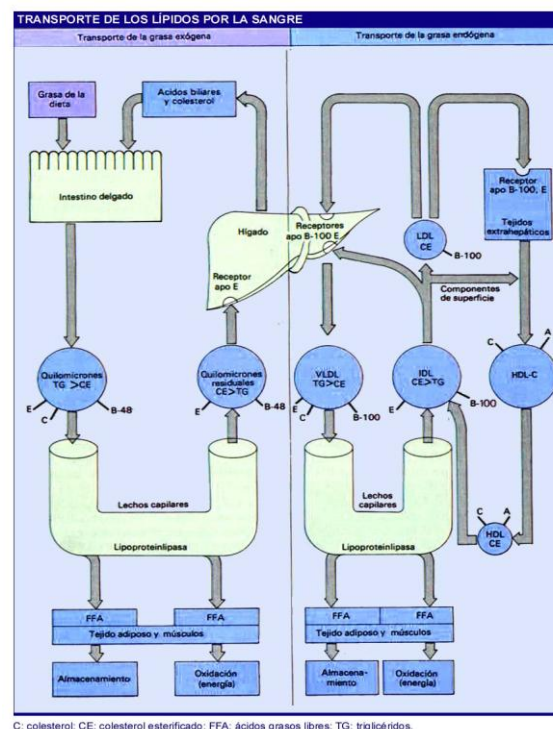
5.1 Fisiología de la lipemia postprandial.

La lipemia postprandial (LPP) representa el acúmulo en plasma de lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), tales como quilomicrones (QM), cVLDL y sus remanentes, aproximadamente entre 6 y 10 horas tras la ingesta de una comida grasa^{87,88}.

En situación de ayuno, los triglicéridos se transportan en la circulación principalmente en las VLDL, que contienen la apolipoproteína (apo) B100. En el torrente sanguíneo, VLDL se convierte en remanente de VLDL (IDL, lipoproteína de densidad intermedia) por la acción de la lipoproteín lipasa (LPL) de las células endoteliales⁸⁹. La apo CII, presente en la superficie de VLDL (y quilomicrones), es un cofactor necesario para la

hidrólisis de los TG por la LPL. En la circulación, los remanentes de VLDL se enriquecen con apo E, el ligando preferente del *LDLR* y del hipotético LRP (*LDLR*-related protein). En condiciones fisiológicas, las IDL son captadas por los *LDLR* hepáticos; las lipoproteínas son degradadas y el colesterol pasa a formar parte de las secreciones biliares siendo eliminado del organismo. Otra parte de estas IDL, se convierten en LDL por la acción de diversas enzimas localizadas en los sinusoides hepáticos, tales como la lipasa de triglicéridos hepática (HTGL). En el período postprandial, VLDL y quilomicrones (con apo B100 y apoB48, respectivamente como proteínas estructurales) contribuirán a la lipemia postprandial ⁹⁰. Los quilomicrones son lipoproteínas ricas en triglicéridos que se sintetizan y secretan por los enterocitos para transportar la grasa dietaria a los tejidos periféricos. Una vez en el torrente sanguíneo, existe también una transferencia de apo CII desde las HDL, que actúa como cofactor de la LPL, y facilita la unión de los QMs en la superficie endotelial para descargar su masivo contenido de triglicéridos a los tejidos periféricos. Tras esta hidrólisis parcial, los QM adquieren el tamaño adecuado para ser captado por los receptores hepáticos dependientes de Apo E. Estos lípidos podrán ser almacenados o pasar nuevamente a circulación en forma de VLDL (figura 5).

Figura 5: Figura: Transporte exógeno y endógeno de los lípidos plasmáticos. Tomado de Carmena R. Hiperlipoproteinemias: concepto clasificación, patogenia y diagnóstico. En: Carmena, editor. Hiperlipoproteinemias, clínica y tratamiento. Barcelona: Doyma, 1990; 17-27.



5.2. Lipemia postprandial en la HF.

El receptor hepático de LDL reconoce la molécula de Apo B100 presente en todas las lipoproteínas LDL y las internaliza para su aclaramiento plasmático. Las mutaciones del *LDLR* provocarán la elevación plasmática de cLDL, facilitando la oxidación de estas partículas y aumentando así su aterogenicidad. Este es el mecanismo al que se atribuye la arteriosclerosis precoz de la HF.

Sin embargo, el *LDLR* también se ha relacionado con el aclaramiento hepático de las partículas de quilomicrones remanentes⁹¹. En los pacientes HF, esto podría implicar la existencia de un aumento de quilomicrones remanentes en situación postprandial, tanto por el mal funcionamiento del receptor como por la competición por el mismo con las lipoproteínas LDL ya incrementadas en esta enfermedad⁸⁷.

Los mecanismos exactos del aclaramiento hepático de quilomicrones remanentes no se conoce con exactitud, aunque se cree que precisan la acción de la lipoprotein lipasa (LPL), la lipasa hepática (LH), la apo E y los proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG) que facilitan la unión de los quilomicrones remanentes con receptores hepáticos específicos⁹². Al menos seis receptores de superficie celular hepáticos parecen estar involucrados en el aclaramiento de los remanentes de quilomicrones: el receptor de lipoproteínas de baja densidad relacionado con la proteína- α_2 -macroglobulina (LRP- α_2 -M)⁹³, un receptor de células parenquimatosas hepáticas⁹⁴, el receptor asialoglicoproteína⁹⁵, el receptor estimulado por lipólisis⁹⁶ y el clásico *LDLR* (o B/E)⁹⁷. Asimismo, el receptor de VLDL, un miembro de la familia del receptor LDL, podría regular la captación de remanentes de quilomicrones en tejidos no hepáticos⁹⁸.

La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que la unión e internalización de los quilomicrones remanentes se produce por el LRP- α_2 -M. La unión a este receptor sólo se puede producir si las lipoproteínas contienen apo E⁹⁹, un proceso que ocurre en los espacios sinusoidales del hígado (espacio de Disse). Los quilomicrones contienen apo B-48 como proteína estructural, por lo que no sería un ligando implicado en el aclaramiento de estas partículas por dicho receptor. Las lipoproteínas que contienen apo E tienen una mayor afinidad por los receptores LDL que aquellas que contienen solo apo B¹⁰⁰. Además, se ha demostrado que apo E2 sólo es un 40% tan efectiva como la apo E3 y apo E4 en unirse al LRP¹⁰¹. Así pues, la unión de los quilomicrones al receptor LRP va a ser modulada por el contenido en apo C y apo E de las partículas remanentes¹⁰¹. La actual visión de la captación de QM remanentes sería: los quilomicrones

remanentes se atrapan en el espacio sinusoidal a través de la adhesión a los HSPG facilitada por la LPL, se enriquecerían de apo E, y se unirían al receptor LRP facilitado tanto por la LPL y la HL; finalmente serían internalizadas y procesadas a nivel intracelular¹⁰².

El papel que pueda tener el receptor de LDL es controvertido. Si éste fuese el principal mecanismo de aclaramiento de quilomicrones, sería esperable que se acumulasen los remanentes de quilomicrones en pacientes con HF; especialmente porque las LDL están muy elevadas en estos pacientes y competirían con los quilomicrones remanentes por el mismo receptor, que además es defectuoso. El *LDLR* reconoce tanto apo B100 y apo E y tiene una mayor afinidad por las partículas que contienen apo E comparado con la unión de LDL, la cual sólo tiene apo B-100 como apolipoproteína estructural¹⁰³. Estudios en modelos animales de HF (el conejo Watanabe Heritable Hyperlipidaemic (WHHL)) han mostrado resultados discordantes. Kia y cols¹⁰⁴, mostraron un aclaramiento normal de los quilomicrones circulantes en estos animales, mientras que otro grupo mostró una reducción del 50% en el aclaramiento de estas partículas en animales con la mitad de receptores funcionantes¹⁰⁵.

El papel del *LDLR* en humanos sigue siendo controvertido. Mamo y colaboradores, en pacientes HF homocigotos Japoneses, mostraron que en seis pacientes existía un marcado retraso en el aclaramiento de lipoproteínas ricas en triglicéridos marcadas con retinol tras una sobrecarga oral grasa¹⁰⁶. En la misma línea, Castro Cabezas y cols, estudiaron a cinco pacientes con HF heterocigota, encontrando un retraso dos veces mayor en el área bajo la curva del aclaramiento de retinol del plasma en el rango de densidad correspondiente a las partículas remanentes comparado con un grupo control¹⁰². A diferencia de los estudios anteriores, Ericsson M et al¹⁰⁷, encontraron trigliceridemias elevadas en ayunas en pacientes con HF comparados con controles apareados por edad y peso; aunque tras la infusión en duodeno de una emulsión rica en grasa, no encontraron diferencias en la capacidad de aclaramiento de las lipoproteínas de quilomicrones y quilomicrones remanentes en ambos grupos. Recientemente, en esta misma línea, no se ha encontrado evidencia de un catabolismo disminuido de la Apo 48 plasmática en el periodo postprandial en pacientes HF heterocigotos portadores de una misma mutación¹⁰⁸; este mismo estudio sí objetiva un aumento de las partículas ricas en TG que contienen apo B48 atribuido a una mayor tasa de producción.

Las discrepancias entre los estudios podrían deberse a las diferencias metodológicas en el estudio de la lipemia postprandial, diferencias en las mutaciones del *LDLR* y el efecto

de variaciones genéticas en otros receptores o procesos que pudiesen participar en el aclaramiento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.

5.3. Lipemia postprandial, disfunción endotelial y arteriosclerosis.

Actualmente la trigliceridemia en ayunas se considera un factor de riesgo independiente de arteriosclerosis¹⁰⁹. El estudio Framingham ya mostró una correlación entre los factores de riesgo cardiovascular y los triglicéridos contenidos en las VLDL¹¹⁰ y meta análisis posteriores demostraron la contribución de los triglicéridos a los procesos ateroscleróticos independientemente del HDL y otros parámetros¹¹¹.

Con todo esto, es probable que las elevaciones de LPP sean también un factor de riesgo cardiovascular, ya que pasamos la mayor parte del día en situación postprandial¹¹². En la década de los 70 del siglo pasado, Zilversmit describió la AE como un proceso postprandial¹¹³, sugiriendo que la interacción de las lipoproteínas postprandiales con la lipoproteína lipasa arterial era un fenómeno aterogénico. Desde entonces, son varios los estudios clínicos, in vitro y epidemiológicos que relacionan el papel de las lipoproteínas postprandiales con el inicio y el desarrollo de arteriosclerosis.

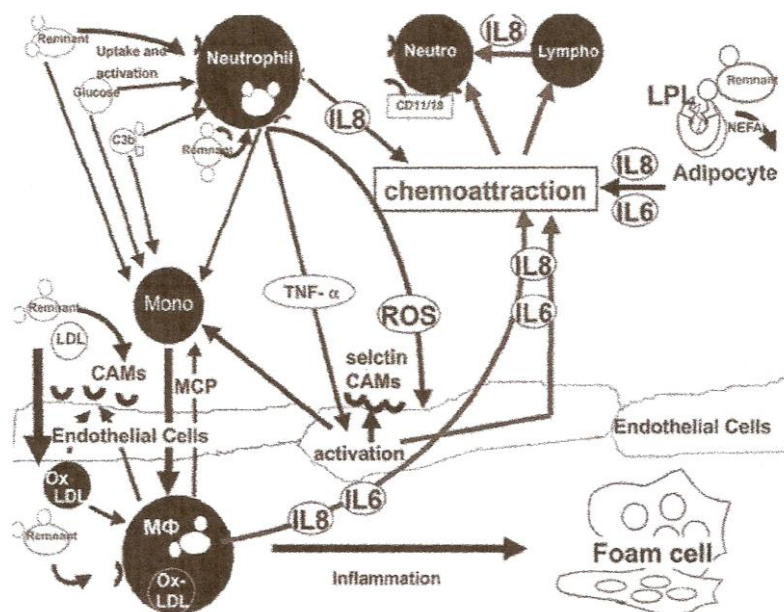
Bouquist y colaboradores, demostraron que la pared íntima media de la carótida se correlacionaba con algunas medidas postprandiales¹¹⁴. Además, estudios en cultivos celulares han demostrado que los quilomicrones y las VLDL son citotóxicos para las células endoteliales¹¹⁵. Estudios epidemiológicos han contribuido a verificar esta hipótesis. En el Physicians Health Study, la trigliceridemia a las 3-4 horas tras una comida distinguía mejor entre el desarrollo de cardiopatía isquémica que la trigliceridemia en ayunas¹¹⁶. Recientemente, dos estudios prospectivos han evidenciado que los valores de triglicéridos postprandiales se relacionaban de forma independiente con episodios de cardiopatía isquémica y mortalidad^{117,118}.

Los mecanismos por los que la lipemia postprandial conduciría finalmente al desarrollo de arteriosclerosis implican necesariamente al EO y la inflamación. La ingestión de comida crearía un estado prooxidante que se acompaña de un incremento de los biomarcadores de inflamación, moléculas de adhesión celular y disfunción endotelial, estando todos estos factores implicados en la génesis de la arteriosclerosis¹¹⁹. Castro y cols han demostrado que en el estado postprandial, cuando se elevan los triglicéridos y la glucosa, aumenta el recuento de neutrófilos junto con la producción concomitante de citocinas proinflamatorias y aumento de estrés oxidativo¹²⁰. Además, en sujetos sanos y en pacientes con arteriosclerosis prematura, la lipemia postprandial se

ha asociado con la up-regulación de la activación linfocitaria ^{121,122} y se ha visto que la apo B se une a neutrófilos y monocitos, transportando estos leucocitos los ácidos grasos dietéticos ¹²³. Otros autores también han evidenciado incrementos en la concentración de citocinas proinflamatorias como IL6, IL8 y TNF α durante el periodo postprandial relacionándolos con los niveles de triglicéridos postprandiales ¹²⁴. Esto abre la posibilidad que la activación directa de los leucocitos ocurra en la sangre por la interacción con los quilomicrones y sus remanentes, desencadenando un aumento de citocinas y ROS y aumentando la adherencia al endotelio de las células inflamatorias ¹²⁵ (figura 6).

Figura 6: Concepto del inicio de la arteriosclerosis en el torrente sanguíneo por la activación de los leucocitos por las partículas ricas en triglicéridos.

Tomado de: Alipour A, Elte JWF, van Zaanen HCT, Rietveld AP, Castro-Cabezas M. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl.* 2008;9:39-44.



Otro aspecto de la lipemia postprandial incluye la disfunción endotelial (figura 7). Experimentos in vitro muestran que los QM pueden inducir un aumento en la expresión de E-selectina y VCAM-1 en las células endoteliales, facilitando el reclutamiento de las células inflamatorias ¹²⁶. Otros autores, han descrito que las CRLPs (CMR-like particles) inducen la expresión de COX-2 (ciclo-oxigenasa 2) en células endoteliales humanas y sugieren que el tipo de grasa dietaria contenida en las partículas influye su capacidad de activar la COX-2 ¹²⁷. Además, se ha demostrado que los remanentes de lipoproteínas

inhiben la relajación dependiente de endotelio en aorta¹²⁸ y la vasodilatación dependiente de endotelio mediada por NO¹²⁹. Esto podría ser debido a un aumento de EO postprandial. Estudios en animales, han demostrado que la hipertrigliceridemia mantenida puede conducir a disfunción endotelial asociada a una producción incrementada de anión superóxido (O₂⁻) vascular con el consiguiente descenso en la biodisponibilidad de óxido nítrico¹³⁰. Parece ser que las lipoproteínas postprandiales, particularmente QM y VLDL, inducen la generación de radicales de oxígeno en la superficie endotelial que reaccionan con el NO, reduciendo su disponibilidad¹³¹. Por último, se ha demostrado que los remanentes de quilomicrones procedentes de la dieta pueden atravesar el endotelio vascular donde son fagocitados por los macrófagos, induciendo la formación de células espumosas sin requerir ninguna modificación previa, a diferencia de lo que ocurre con las LDL, que deben modificarse previamente¹³². Un retraso en el aclaramiento de éstas partículas se ha correlacionado con el desarrollo de lesiones arterioscleróticas^{133,134}. Los ratones knock-out apoE, que acumulan lipoproteínas remanentes que contienen apoB48, desarrollan una aterosclerosis severa¹³⁵. Además, en la placa de ateroma se han hallado lipoproteínas que contienen apoB48 de origen intestinal¹³⁶. Los QM remanentes causan una acumulación lipídica en macrófagos que han invadido el espacio subendotelial¹³⁷. Éstos quilomicrones remanentes serían captados por los macrófagos vía el receptor LDL mediado por la apoE y los por los receptores scavenger, entre otros mecanismos; además, modificaciones en las CRLPs tales como su oxidación o su contenido en antioxidantes alterarían esta internalización¹³⁸.

El papel de NF-κB en todos los procesos anteriores sería fundamental¹³⁹. Las partículas postprandiales ricas en triglicéridos podrían desencadenar la inflamación mediante la activación de NF-κB de las células implicadas en la disfunción endotelial (leucocitos, endotelio y macrófagos) por diversos mecanismos (figura 8). La producción subsiguiente de EO y citocinas proinflamatorias tanto en la circulación como en el espacio subendotelial desencadenaría toda la secuencia de pasos hasta la producción de las células espumosas y el inicio de la placa de ateroma.

Figura 7: Efectos de los quilomicrones remanentes sobre el endotelio humano: mecanismos potenciales.

Tomado de: Botham KM, Bravo E, Elliot J, Wheeler-Jones CP. Direct Interaction of Dietary Lipids Carried in Chylomicron Remnants with Cells of the Artery Wall: Implications for Atherosclerosis Development. *Curr Pharm Des* 2005;11:2681-3695.

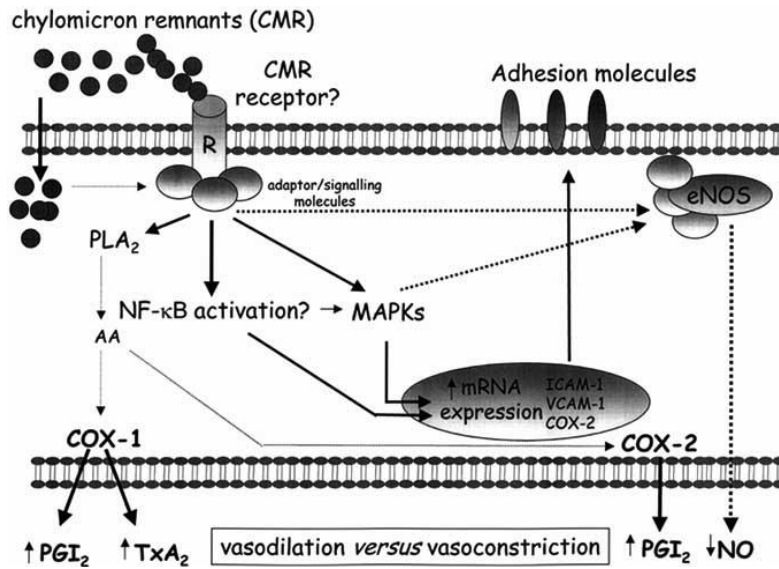
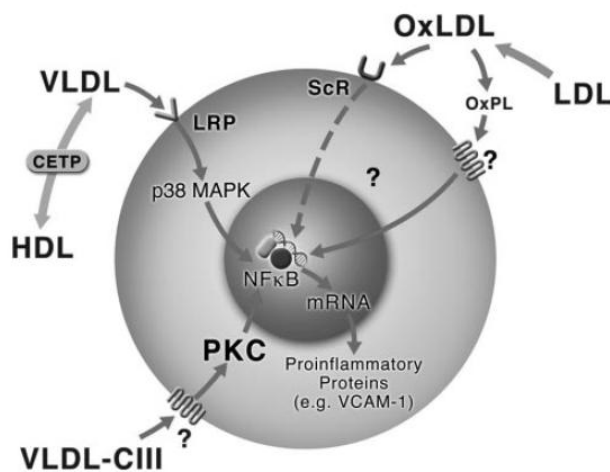


Figura 8. Mecanismos aterogénicos de las diferentes lipoproteínas.

Tomada de: Peter Libby. Fat fuels the flame. *Circ Res*. 2007;100:299-301.



6. Efecto de los ácidos grasos de la dieta en la oxidación e inflamación sistémica.

Estudios epidemiológicos han confirmado que el patrón de alimentación influye en el riesgo cardiovascular. Dietas ricas en grasa saturada se han asociado a un perfil de riesgo cardiovascular adverso, con mayores niveles de colesterol, glucemia y tensión arterial, frente a poblaciones con ingestas ricas en grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas¹⁴⁰. Además, la dieta mediterránea, rica en aceite de oliva, ha demostrado reducir el riesgo cardiovascular independientemente de los factores clásicos de riesgo cardiovascular²⁰. Recientemente, el estudio PREDIMED demostró que el seguimiento de una dieta mediterránea, rica en aceite de oliva o en nueces, disminuía los niveles de LDLox y MDA frente a una dieta con bajo contenido en grasa¹⁴¹. Además, en sujetos con alto riesgo cardiovascular, el consumo de frutas, cereales, aceite de oliva y nueces se ha asociado a niveles bajos de marcadores inflamatorios séricos relacionados con la disfunción endotelial, tales como PCR, IL-6, ICAM y VCAM¹⁴². Estos alimentos son ricos en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados y su efecto beneficioso podría estar mediado por una variedad de mecanismos que incluyen una mayor protección antioxidante y una regulación de los procesos inflamatorios y trombogénicos²¹.

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios de sobrecarga oral grasa (SOG) mediante desayunos y comidas de prueba, con el objetivo de determinar el nivel de lipemia postprandial y el grado de inflamación y oxidación tras una ingesta grasa en individuos sanos. La diferente metodología empleada en cuanto a la composición y cantidad de grasa de la comida de prueba ha impedido obtener resultados concluyentes. En general, los estudios con SOG rica en ácidos grasos saturados han mostrado un aumento postprandial de los marcadores de inflamación, tales como TNF- α , IL6 y moléculas de adhesión^{143,144}. Sin embargo, otros autores no han encontrado cambios en los marcadores de inflamación sistémica tras la SOG¹⁴⁵ o incluso se han descrito descensos después de comidas ricas en aceite de oliva y nueces¹⁴⁶. En cuanto a los niveles de EO, parecen aumentar tras las comidas ricas en grasa saturada¹⁴⁵. En sujetos hipercolesterolémicos, Ros et al ha estudiado el efecto de comidas ricas en grasa enriquecidas en aceite de oliva o nueces en sujetos con hipercolesterolemias moderadas. A las 4 horas tras la ingesta objetivaron en ambos grupos un descenso en las LDLox y en las citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión (sTNF-R, sICAM-1, sVCAM1) sin cambios en el EO medido por ADMA¹⁴⁶.

Los datos actuales sobre LPP en pacientes con HF son todavía muy escasos. No existen datos en esta población sobre inflamación y oxidación en situación postprandial.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La arteriosclerosis es un proceso inflamatorio crónico con acumulación de monocitos y macrófagos en la pared arterial y producción de numerosas señales que perpetúan y complican la placa de ateroma. El factor de transcripción NF-Kb, y el estrés oxidativo (EO), se han relacionado con del inicio y desarrollo de la arteriosclerosis.

La hiperlipemia postprandial podría actuar como factor inductor de EO y activar factores proinflamatorios relacionados con la patogenia y progresión de la arteriosclerosis. En este sentido, se ha observado que una comida rica en grasa induce EO y altera la función endotelial en sujetos sanos. Por otro lado, es conocido el papel protector de las grasas insaturadas en el proceso de la arteriosclerosis. Estudios de intervención dietética en sujetos sanos han demostrado que estas grasas pueden disminuir la inflamación y el EO.

La HF heterocigota, como modelo genético de hipercolesterolemia pura, tiene niveles de EO e inflamación elevados en ayunas y aumento del riesgo cardiovascular. Dado que el receptor de LDL también aclara las partículas IDL, VLDL y remanentes de quilomicrones, es posible que la lipemia postprandial se encuentre alterada en estos sujetos. Esto podría asociarse con elevación en los niveles de oxidación e inflamación, actuando como un factor de riesgo cardiovascular encubierto. De esta forma podría explicar, en parte, la variabilidad en la incidencia y prevalencia de enfermedades cardiovasculares de los pacientes HF. La información actual sobre la respuesta postprandial tras una comida grasa en los pacientes HF en cuanto a niveles de lípidos plasmáticos, inflamación y oxidación sistémica es limitada.

Basándonos en lo anteriormente comentado, nuestra **hipótesis de trabajo** es:

En la HF, la SOG elevará el EO y la activación de marcadores de inflamación implicados en el inicio y desarrollo de la AE. Dicha elevación dependerá directamente del aumento de lipemia postprandial y la cantidad y calidad de la grasa alimentaria.

Los objetivos son:

Objetivo general

Estudiar el nivel de EO y marcadores de inflamación en ayunas y tras la sobrecarga oral grasa en sujetos con HF y controles, valorando el efecto de la grasa insaturada sobre dichos parámetros.

Objetivos específicos

1. Estudiar en ayunas y durante el periodo postprandial el nivel de EO en sujetos con HF y controles mediante:
 - 1.1. Determinación de los niveles de GSH, GSSG y MDA en linfo-monocitos y de LDLox en plasma en ayunas y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras una SOG.
 - 1.2. Analizar las concentraciones de 8-oxo-dG e isoprostanos en orina en ayunas.
2. Conocer el grado de inflamación sistémica en ayunas y postprandial relacionada con AE en sujetos con HF y controles, mediante la determinación de TNF α , IL1 β , IL6, IL8, eotaxina, MCP-1 y MIP-1 α .
3. Comparar los valores de oxidación e inflamación en ayunas y durante el periodo postprandial en los sujetos controles y HF.
4. Evaluar el efecto de SOG con grasas insaturadas en los parámetros de EO e inflamación comentados.

III. SUJETOS Y MÉTODOS

III. SUJETOS Y MÉTODOS

1. Sujetos

Se estudiaron sujetos con HF procedentes de la Unidad de Lípidos del Servicio de Endocrinología y Nutrición de nuestro hospital. Los controles procedían de investigadores y personal de nuestro centro y sujetos voluntarios. La selección de los pacientes se realizó por muestreo consecutivo, apareando los sujetos por edad, índice de masa corporal y perímetro de cintura con los controles. Todos los sujetos eran de raza caucásica y residían en la provincia de Valencia. Se buscó una relación de 2:1 entre sujetos controles y HF.

Los criterios de inclusión en el estudio para ambos grupos fueron:

- Edad entre 18 y 65 años
- Cumplir los criterios diagnósticos de HF o control.
- Tener un genotipo E3/E3 de apo E.

Los criterios de exclusión en ambos grupos fueron los siguientes:

- Ingesta de alcohol > 30 g/día.
- Hábito tabáquico (los sujetos exfumadores debían haber abandonado el consumo de tabaco al menos un año antes).
- TSH > 10 mU/ml.
- Enfermedad hepática (elevación de transaminasas x 2 veces superior al valor máximo de nuestro laboratorio, diagnóstico de hepatitis aguda, crónica o cirrosis).
- Colestasis, definida por valores de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) > 32 mU/ml, bilirrubina directa > 0,2 mg/dl y fosfatasas alcalinas > 250 mU/ml; (valores máximos de nuestro laboratorio).
- Creatinina sérica > 2 mg/dl o insuficiencia renal terminal en diálisis.
- Obesidad grave con IMC > 35 kg/m².
- Fluctuaciones ponderales mayores al 10% del peso corporal en los tres meses previos al estudio.
- Seguimiento de dietas hipocalóricas para la reducción de peso.

- Medicación hipolipemiente o ingesta de fármacos que modifiquen el perfil lipídico o situación de EO e inflamación y no pudieron ser retirados 6 semanas antes de iniciar el estudio.
- Toma de antioxidantes (suplementos dietéticos o farmacológicos)
- Embarazo o lactancia en los 3 meses previos al estudio.
- Enfermedad neoplásica avanzada.
- Pacientes en prevención secundaria (infarto agudo de miocardio, angioplastia transluminal, by-pass aorto-coronario, angor pectoris con test de esfuerzo positivo, ACV).
- Diabetes mellitus.
- Hipertensión arterial o recibir tratamiento anti-hipertensivo.
- Alergias.
- Práctica profesional de ejercicio físico.
- Menopausia.
- Cualquier infección sufrida en las seis semanas previas al estudio.

Los criterios diagnósticos de HF fueron: niveles de CT y cLDL por encima del percentil 95 para edad y sexo, presencia de xantomas tendinosos, antecedentes de cardiopatía isquémica en familiar de primer grado y distribución bimodal de los niveles de CT y cLDL en la familia, indicando un patrón de herencia autosómico dominante de fenotipo IIa. Asimismo, a todos los pacientes se realizó diagnóstico genético de HF.

Los criterios que se les exigió a los sujetos controles fueron:

- Concentración en plasma en ayunas de CT < 200 mg/dl, TG < 150 mg/dl, apo B <120 mg/dl y glucosa < 100 mg/dl.
- Carecer de antecedentes personales o familiares de primer grado de dislipemia, cardiopatía isquémica precoz, hipertensión arterial ni diabetes (glucemia en ayuno < 126 mg/dl).

2. Métodos

La recogida de parámetros clínicos y antropométricos se llevó a cabo por el mismo investigador. En ambos grupos se aplicó un protocolo de estudio donde se recogían:

- Parámetros clínicos:

- Registro del hábito tabáquico con recogida de nº de cigarrillos/día. En caso de ser exfumador se registró el nº de cigarrillos/día fumados, el nº de años en que se mantuvo el hábito y el año en que se abandonó el consumo.
 - Consumo de alcohol con registro de gramos/día.
 - Ejercicio físico, reflejando los minutos por semana.
 - Fármacos de consumo habitual u ocasional que coincidieron con el periodo de estudio.
 - Determinación de la presión arterial tras 10 minutos de reposo en decúbito supino, utilizando el valor medio de 3 mediciones separadas 5 minutos y realizadas con un esfigmomanómetro de mercurio.
- Parámetros antropométricos.
- Peso en kilogramos (kg) mediante una báscula romana, la talla en metros (m) y el índice de masa corporal (IMC) en kg/m^2 .
 - Perímetro de la cintura: medida en el punto medio entre la espina ilíaca anterosuperior y el margen costal inferior. La medida se obtuvo con una cinta métrica graduada en centímetros (cm) estando el sujeto en bipedestación.
- Parámetros bioquímicos y genéticos.
- Hemograma y bioquímica estándar.
 - Metabolismo lipídico:
 - CT y TG mediante técnicas enzimáticas estándar ¹⁴⁷.
 - cHDL tras precipitación de las lipoproteínas que contenían apo B con polianiones ¹⁴⁸.
 - cLDL se calculó mediante la fórmula de Friedewald ¹⁴⁹.
 - Apoproteínas B y A1 por inmunoturbimetría ¹⁵⁰.

Los coeficientes de variación para lípidos y lipoproteínas fueron < 5%.
 - Metabolismo glucémico:
 - Glucosa por método de glucosa oxidasa.
 - Insulinemia por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
 - Cálculo del índice HOMA (insulina (mU/ml) * [glucosa (mmol/l)/ 22,5])
 - Nivel de estrés oxidativo:
 - Medición de GSH, GSSG y la relación GSSG/GSH en linfo-monocitos circulantes mediante cromatografía de alta presión (HPLC) y detección UV ^{151,152}.
 - MDA en linfo-monocitos circulantes por HPLC ¹⁵³.

- LDL-ox en plasma mediante kit comercial de ELISA (Biomedica, Wien, Austria).
- 8-oxo-dG urinario mediante HPLC y detección UV.
- Isoprostanos urinarios por ELISA.
- Inflamación sistémica en plasma:
 - PCR de alta sensibilidad, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, INF- γ , eotaxina, MCP-1, MIP-1 α mediante kits de ensayo comerciales de ELISA para citocinas.
- Análisis genéticos:
 - Determinación de la mutación en el gen del *LDLR*, apo B y PCSK9 en sujetos con fenotipo HF, según protocolo descrito en García-García AB y cols. y Blesa S y cols.^{154,155}. Todos los pacientes fueron portadores de mutaciones en el gen del LDLR.
 - Determinación del genotipo de la Apo E (PCR digestión enzimática) en todos los sujetos.

3. Diseño:

Se trata de un estudio comparativo en ayunas y en el período postprandial entre controles y HF y, además, de intervención para evaluar el efecto de la ingesta de grasa de predominio insaturado en cada grupo.

Tras la explicación del estudio y sus objetivos, los sujetos seleccionados firmaron un consentimiento informado. Se les realizó un cuestionario clínico junto con una extracción sanguínea en ayunas para la determinación de parámetros bioquímicos generales y el análisis genético de apoE (en todos los sujetos) y del LDLR (en sujetos HF sin diagnóstico genético previo). A los sujetos que cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, se les realizó entonces un periodo de lavado de 6 semanas en que se retiraron los fármacos que suponían un criterio de exclusión para el estudio (fármacos hipolipemiantes en el grupo de HF y cualquier fármaco o suplemento que modificase el nivel de EO o inflamación en ambos grupos). Durante este periodo de lavado, los pacientes HF se instruyeron para seguir una dieta hipocolesterolemia estandarizada tipo NCEP-1, mientras que los sujetos controles mantuvieron su dieta habitual. Los sujetos sanos que no tomaban ningún fármaco, se les citó directamente para la realización de la SOG.

La SOG se realizó en la Unidad de Pruebas Funcionales de nuestro Servicio. Los pacientes mantuvieron un ayuno de 12 horas antes de la prueba y realizaron una cena pobre en grasas el día previo (<10 g grasa). Se evitó la toma de alcohol y la práctica de ejercicio físico el día previo a la prueba. A las 8:15 horas se midieron los parámetros antropométricos, se realizó la toma de tensión arterial y se canalizó una vía venosa periférica, permaneciendo posteriormente en reposo durante un mínimo de 30 minutos. A las 9:00h se realizó una extracción sanguínea basal y se administró una sobrecarga oral estandarizada de grasa (SOG) mediante la ingesta durante 5-10 minutos de un preparado comercial de triglicéridos de cadena larga (Supracal®; SHS International Ltd.). Cada 100 ml contenían 50 g de de grasa (450 Kcal). La composición del preparado se muestra en la tabla 1. La dosis ingerida fue de 50 g de grasa por m² de superficie corporal. Tras la ingesta y durante todo el estudio, los sujetos permanecieron sentados o en decúbito supino y sólo se permitió la ingesta de agua mineral. Se realizaron extracciones sanguíneas a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG para la determinación de los parámetros bioquímicos señalados anteriormente.

Tabla 1: Composición Supracal® sabor neutro.

Supracal®: SHS international Ltd.	
Módulo nutricional lipídico de triglicéridos de cadena larga (LCT) en forma de emulsión 50%.	
Composición: por 100 ml (fuente: aceites vegetales)	
-Kcal:	450
-Lípidos g:	50
-saturados g:	9,6
-monoin saturados g:	28,2
-poliinsaturados:	10
-% LCT:	100%
-relación ω 6: ω 3 >	20:1
-Na g:	<10.
Perfil de ácidos grasos: g por 100g de ácidos grasos	
Láurico (C ₁₂)	<1
Mirístico (C ₁₄)	<1
Palmítico (C ₁₆)	10
Estearico (C ₁₈)	3
Oleico (C _{18:1})	58
Linoleico (C _{18:2})	20
α -linoleico (C _{18:3})	<1
Araquidónico (C ₂₀)	1
Eicosaenoico (C _{20:1})	1
Behénico (C ₂₂)	3
Lignocérico (C ₂₄)	1

4. Análisis estadístico.

El estudio estadístico se realizó con el programa informatizado Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 12.1.3 for Windows; SPSS Chicago, IL, USA).

Para cada variable, los datos se expresaron como media \pm desviación estándar (DE).

El tamaño muestral para el estudio se calculó teniendo en cuenta un error alfa estándar del 5 %, un error beta del 20 %, y para detectar diferencias clínicamente relevantes entre proporciones superiores al 40% y modificaciones de las variables críticas de EO superiores al 40% entre controles y sujetos con HF. Para ello se estimó un mínimo de 10 sujetos control y 10 pacientes con HF apareados por edad, sexo, IMC y perímetro de cintura. Esto es debido a que la situación postprandial debería duplicar las diferencias estimadas en situación de ayuno (alrededor del 20%).

La comparación de medias se realizó con la prueba de Mann-Whitney para datos no apareados y el test de Wilcoxon para datos apareados. La comparación de proporciones con el test de χ^2 o de Fisher según el número. Las áreas bajo la curva (AUC) para las determinaciones seriadas de los parámetros bioquímicos durante el periodo postprandial se calcularon mediante la fórmula de la regla trapezoidal.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Comparación de los parámetros analizados en ayunas en el grupo completo: controles frente a HF.

En las tablas y figuras que se exponen a continuación comparamos las características generales, antropométricas y bioquímicas, así como parámetros de oxidación del grupo de controles frente al de HF.

1.1 Características generales

En la tabla 1 se observan las características generales del grupo completo, como edad, sexo, peso, IMC y cintura. Son grupos comparables en IMC y cintura. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre controles y HF en la edad.

Tabla 1. Características generales del grupo completo.

	Controles (n=22)	HF (n=14)
Edad (años)	37,45 (10,59)	44,92 (7,93)*
Sexo Hombre/Mujer (n)	11/11	8/6
IMC (kg/m ²)	24,40 (2,98)	26,14 (3,19)
Cintura (cm)	86,23 (9,33)	87,85 (9,17)
Tensión arterial sistólica (mmHg)	112,5 (12,12)	118,78 (13,04)
Tensión arterial diastólica (mmHg)	68,23 (6,88)	73,00 (7,51)

*p<0,05. Los datos se expresan como media (desviación estándar)

1.2 Datos bioquímicos en ayunas.

En la tabla 2 resumimos los principales resultados bioquímicos en ayunas del grupo completo. Encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en los valores de TG. También encontramos diferencias en el CT, cLDL, y apo B significativamente superiores en los sujetos con HF respecto a controles, obviamente por los criterios de selección.

Tabla 2.- Datos bioquímicos en ayunas del grupo completo: controles comparado con HF.

	Controles (n=22)	HF (n=14)
Glucosa (mg/dl)	91,09 (7,84)	95,50 (9,67)
Insulina (μ U/ml)	5,75 (2,98)	8,06 (5,17)
HOMA	1,21 (0,75)	1,96 (1,40)
CT (mg/dl)	176,45 (26,44)	376,71 (85,83)**
TG (mg/dl)	68,54 (20,66)	203,71 (142,85)**
cHDL (mg/dl)	59,45 (10,87)	59,43 (10,45)
cLDL (mg/dl)	103,27 (22,04)	280,42 (81,54)**
Apo-A (mg/dl)	133,27 (19,36)	132,00 (22,80)
Apo-B (mg/dl)	78,41 (18,33)	177,86 (43,13)**
Vitamina B12 (pg/ml)	468,72 (157,68)	517,49 (188,16)
Homocisteina (μ mol/L)	10,62 (2,35)	11,73 (2,54)
PCRas (mg/L)	1,69 (2,96)	1,91 (1,30)

** p<0,01.

Estas diferencias significativas se mantienen cuando se corrigen las variables por la edad.

1.3. Datos de oxidación en ayunas.

En la tabla 3 quedan reflejados los valores de los parámetros biológicos de oxidación del grupo completo. Los valores de 8-oxo-dG e isoprostanos en orina son significativamente superiores en los sujetos con HF respecto a controles.

Tabla 3.- Parámetros biológicos de oxidación del grupo completo

	Controles (n=18)	HF (n=10)
8-oxo-dG orina (8-oxo-dG/106 dG)	3,87 (4,56)	10,65 (7,11)**
Isoprostanos orina (pg/mg creatinina)	11,39 (8,68)	16,17 (4,72)*

*p<0,05, ** p<0,01.

2. Comparación de los parámetros analizados en el grupo completo a nivel postprandial: controles frente a HF.

En las tablas y figuras que se exponen a continuación comparamos las características bioquímicas y los parámetros de oxidación e inflamación a nivel basal y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG del grupo de controles frente al de HF.

2.1 Comparación entre grupos de los parámetros lipídicos durante la SOG:

En la tabla 4 quedan reflejados los valores de lípidos del grupo completo antes y después de la SOG. Los niveles de CT, LDL, apo B y TG se mantuvieron significativamente superiores ($p < 0,001$) en HF frente a controles en todos los puntos de la SOG. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en los valores de HDL y apo-A tras la SOG.

Tabla 4: Parámetros lipídicos antes y a las 2, 4, 6 y 8 horas después de la SOG: controles frente a HFs.

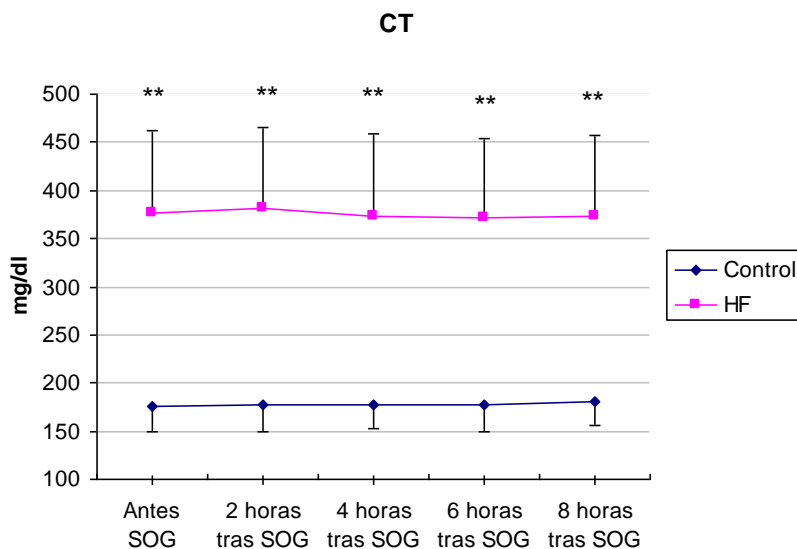
		Antes SOG	2 horas tras SOG	4 horas tras SOG	6 horas tras SOG	8 horas tras SOG
CT (mg/dl)	Controles	176,45 (26,44)	178,09 (28,53)	177,77 (24,63)	177,5 (27,74)	180,64 (25,34)
	HF	376,71 (85,83)**	381,14 (83,94)**	373,14 (85,36)**	371,5 (81,74)**	372,85 (83,96)**
TG (mg/dl)	Controles	68,54 (20,66)	98,32 (33,79)	123,23 (62,21)	100,18 (64,67)	69,55 (25,32)
	HF	203,71 (142,85)**	269,00 (188,77)**	264,36 (168,32)**	211,64 (157,86)**	178,43 (145,34)**
cHDL (mg/dl)	Controles	59,45 (10,87)	57,77 (10,36)	57,50 (11,16)	57,36 (11,09)	59,59 (11,19)
	HF	59,43 (10,45)	59,00 (9,60)	57,28 (9,64)	57,57 (9,50)	58,50 (10,35)
cLDL (mg/dl)	Controles	103,27 (22,04)	100,64 (23,78)	95,68 (20,28)	100,09 (22,44)	107,18 (22,93)
	HF	280,42 (81,54)**	272,78 (76,80)**	269,00 (79,95)**	272,86 (77,94)**	279,93 (78,38)**

Apo-A (mg/dl)	Controles	133,27 (19,36)	132,77 (19,15)	132,41 (17,74)	131,45 (19,43)	134,14 (17,83)
	HF	132,00 (22,80)	132,86 (21,95)	129,36 (17,95)	131,08 (19,96)	130,14 (20,56)
Apo-B (mg/dl)	Controles	78,41 (18,33)	76,95 (17,04)	77,59 (16,01)	76,82 (17,52)	83,41 (22,87)
	HF	177,86 (43,13)**	175,78 (38,06)**	173,14 (40,37)**	174,78 (40,05)**	176,28 (40,84)**

** $p < 0,01$ comparado con el grupo control en cada punto de la SOG.

En las figuras 1 a 6 quedan reflejados gráficamente los datos anteriores junto con las áreas bajo la curva de tiempo-concentración de los lípidos en el período postprandial. Encontramos diferencias significativas en las AUC de colesterol, triglicéridos, LDLc y apo B. No objetivamos diferencias entre ambos grupos en los diferenciales de las AUC en ningún parámetro lipídico.

Figura 1: Comparación de los niveles de colesterol plasmático en cada punto de la SOG entre controles y HF.

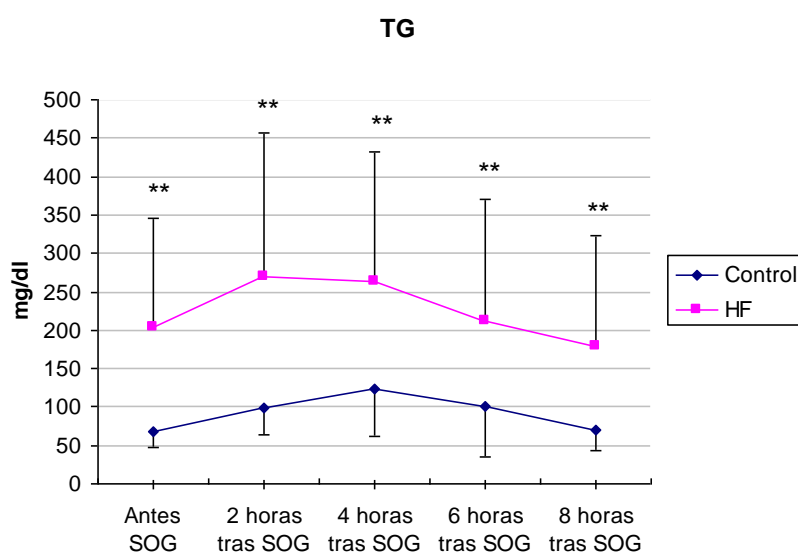


** $p < 0,001$

Tabla 5: Área bajo la curva y diferencial del área bajo de la curva del colesterol en ambos grupos.

		Controles	HF	p
CT (mg/dl·h)	AUC	1423,82 (208,79)	3001,14 (667,06)	0,000
	d-AUC	12,13 (66,68)	-12,57 (115,35)	0,215

Figura 2: Comparación de la trigliceridemia plasmática en cada punto de la SOG entre controles y HF.

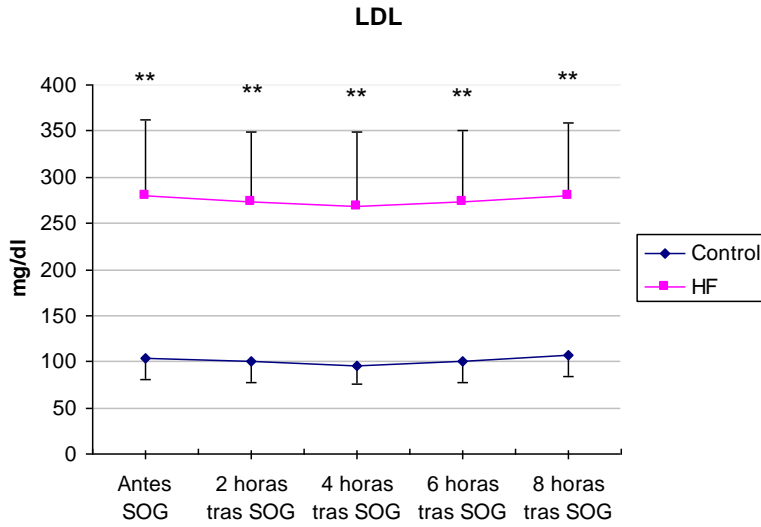


**** p<0,001**

Tabla 6: Área bajo la curva y diferencial del área bajo de la curva de triglicéridos en ambos grupos.

		Controles	HF	p
TG (mg/dl·h)	AUC	781,55 (324,92)	1872,14 (1241,18)	0,000
	d-AUC	233,19 (216,29)	242,42 (200,28)	0,987

Figura 3: Comparación de los niveles de LDLc plasmáticos en cada punto de la SOG entre controles y HF.



** p<0,001

Tabla 7: Área bajo la curva y diferencial del área bajo de la curva de cLDL en ambos grupos.

		Controles	HF	p
cLDL (mg/dl·h)	AUC	803,27 (173,58)	2189,64 (620,93)	0,000
	d-AUC	-22,97 (44,38)	-53,84 (73,21)	0,089

Figura 4: Comparación de los niveles de HDLc plasmáticos en cada punto de la SOG entre controles y HF.

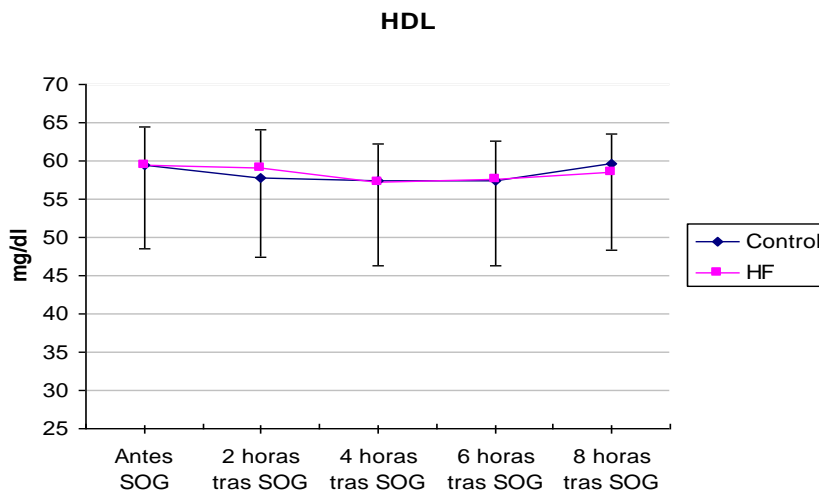
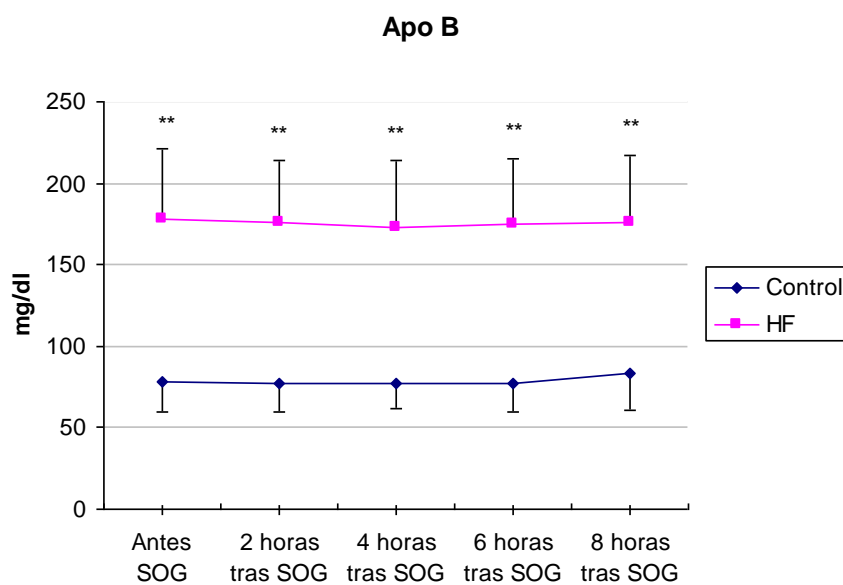


Tabla 8: Área bajo la curva y diferencial del área bajo de la curva de cHDL en ambos grupos.

		Controles	HF	p
cHDL (mg/dl·h)	AUC	464,32 (85,51)	465,64 (76,85)	0,783
	d-AUC	-11,32 (26,32)	-9,78 (24,02)	0,911

Figura 5: Comparación de los niveles de Apo B plasmáticos en cada punto de la SOG entre controles y HF.



** p<0,001

Tabla 9: Área bajo la curva y diferencial del área bajo de la curva de apo B en ambos grupos.

		Controles	HF	p
Apo-B (mg/dl·h)	AUC	624,55 (130,63)	1401,57 (318,71)	0,000
	d-AUC	-2,73 (31,76)	-21,29 (44,38)	0,281

Figura 6: Comparación de los niveles de Apo A plasmáticos en cada punto de la SOG entre controles y HF.

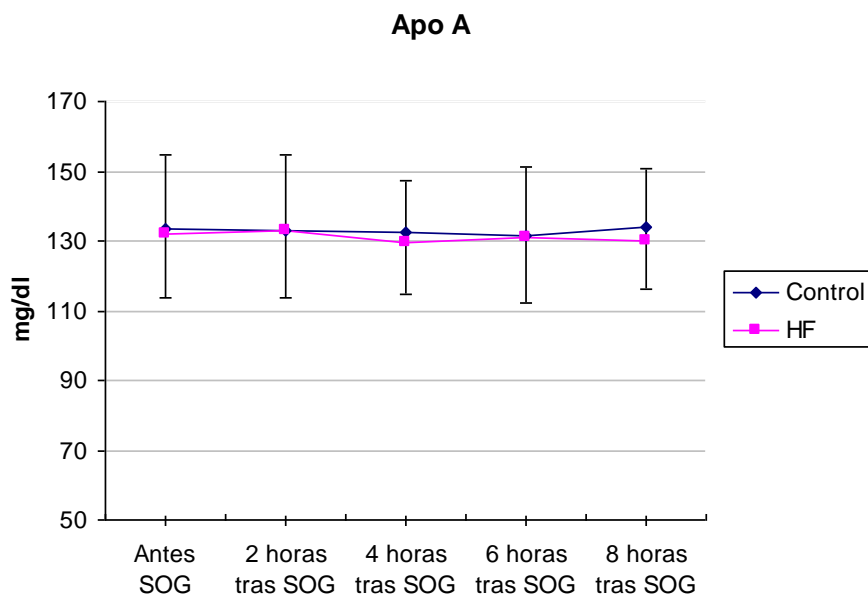


Tabla 10: Área bajo la curva y diferencial del área bajo de la curva de apo A en ambos grupos.

		Controles	HF	p
Apo-A (mg/dl·h)	AUC	1060,68 (146,01)	1046,79 (159,76)	0,885
	d-AUC	-5,51 (52,29)	-9,22 (40,48)	0,451

2.2 Comparación entre grupos de los parámetros del metabolismo glucémico durante la SOG:

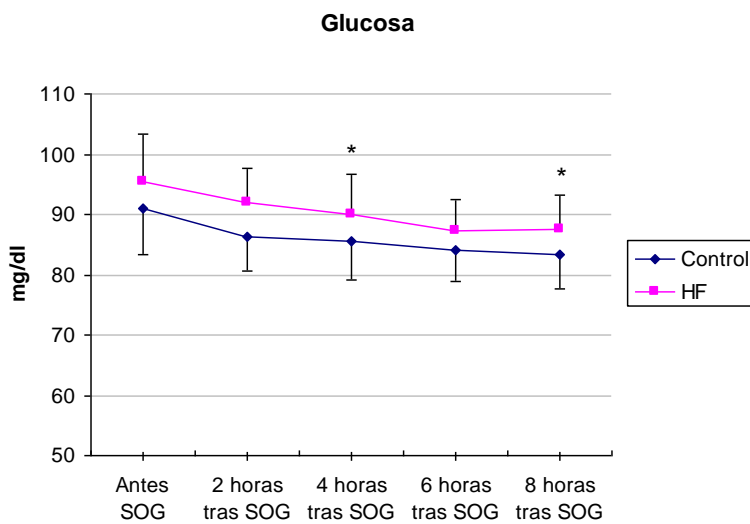
En la tabla 11 se exponen los datos de glucosa, insulina y HOMA. Las concentraciones de los tres parámetros descienden progresivamente a lo largo de la SOG, alcanzando los valores mínimos a las 8 horas. En los valores de glucemia hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos a las 4 y 8 horas tras la SOG. El nivel de HOMA es significativamente superior a las 2 horas en el grupo de HF. Las figuras 7 a 9 reflejan gráficamente los resultados.

Tabla 11: Niveles de glucosa, insulina y HOMA antes y a las 2, 4, 6 y 8 horas después de la SOG: controles frente a HF.

		Antes SOG	2 horas tras SOG	4 horas tras SOG	6 horas tras SOG	8 horas tras SOG
Glucosa (mg/dl)	Controles	91,09 (7,84)	86,41 (5,67)	85,64 (6,51)	84,18 (5,32)	83,27 (5,68)
	HF	95,50 (9,67)	92,00 (9,05)	90,07 (6,08)*	87,21 (5,86)	87,43 (6,51)*
Insulina (µU/ml)	Controles	5,75 (2,98)	5,47 (3,02)	4,61 (2,57)	3,67 (2,74)	3,29 (1,64)
	HF	8,06 (5,17)	8,66 (5,36)	6,69 (4,77)	5,99 (4,41)	4,93 (3,23)
HOMA	Controles	1,21 (0,75)	1,17 (0,66)	0,98 (0,55)	0,76 (0,57)	0,66 (0,36)
	HF	1,96 (1,40)	2,02 (1,35)*	1,50 (1,08)	1,29 (0,95)	1,08 (0,73)

*p<0,05 comparado con el grupo control en cada punto de la SOG.

Figura 7: Comparación de los niveles de glucemia plasmática en cada punto de la SOG entre controles y HF.



* p<0,05

Figura 8: Comparación de la insulinemia plasmática en cada punto de la SOG entre controles y HF.

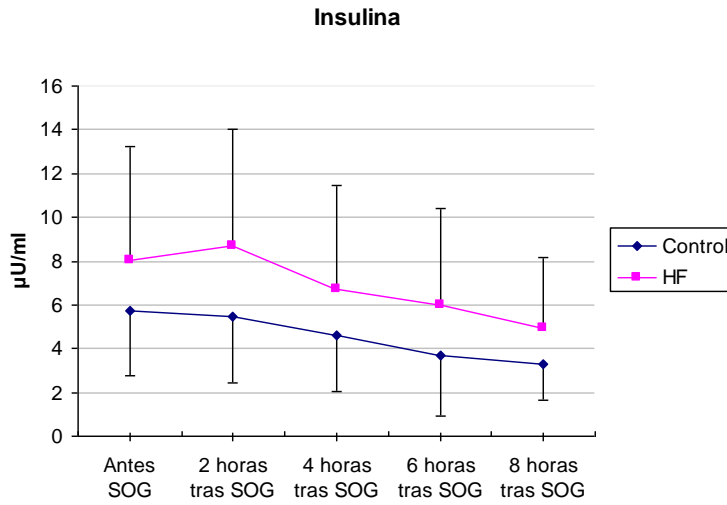
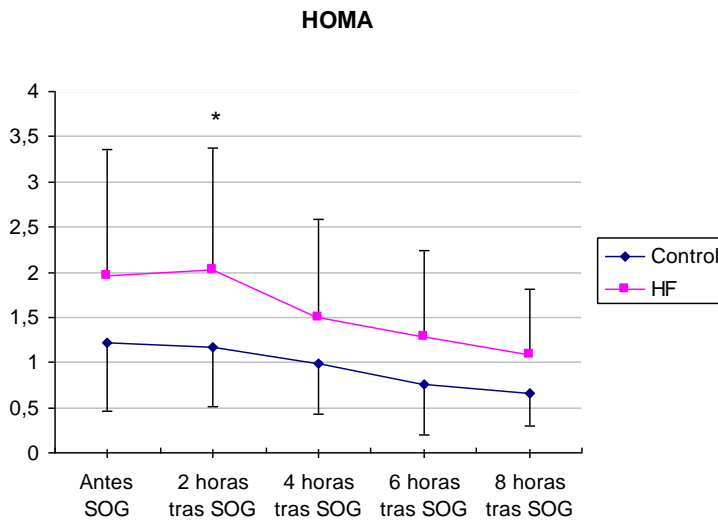


Figura 9: Comparación de la resistencia a la insulina medida por HOMA en cada punto de la SOG entre controles y HF.



* $p < 0,05$

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las áreas bajo la curva de las concentraciones de glucosa y HOMA entre controles y HF (Tabla 12).

Tabla 12. Áreas bajo la curva y diferencial del área bajo la curva de glucosa, insulina y HOMA en ambos grupos.

		Controles	HF	p
Glucosa (mg/dl·h)	AUC	678,68 (57,31)	721,50 (51,98)	0,049
	d-AUC	-40,95 (39,28)	-42,5 (49,91)	0,860
Insulina (µU/ml·h)	AUC	36,37 (17,87)	55,64 (34,96)	0,061
	d-AUC	-9,42 (17,12)	-8,83 (13,73)	0,810
HOMA	AUC	7,70 (3,76)	12,66 (8,28)	0,019
	d-AUC	-1,95 (4,68)	-3,05 (4,31)	0,377

2.3. Comparación entre grupos de los parámetros de oxidación durante la SOG:

En la tabla 13 quedan reflejados los valores de los parámetros de oxidación del grupo completo antes y tras la SOG. Los valores de GSSG, el cociente GSSG/GSH, el MDA y las LDL oxidadas son significativamente superiores en los pacientes con HF respecto a controles en todos los puntos de la SOG. El valor de GSH es significativamente menor en el grupo de HF, tanto en ayunas como durante todo el periodo postprandial.

Tabla 13: Comparación de los parámetros de oxidación en cada punto de la SOG entre controles y HF.

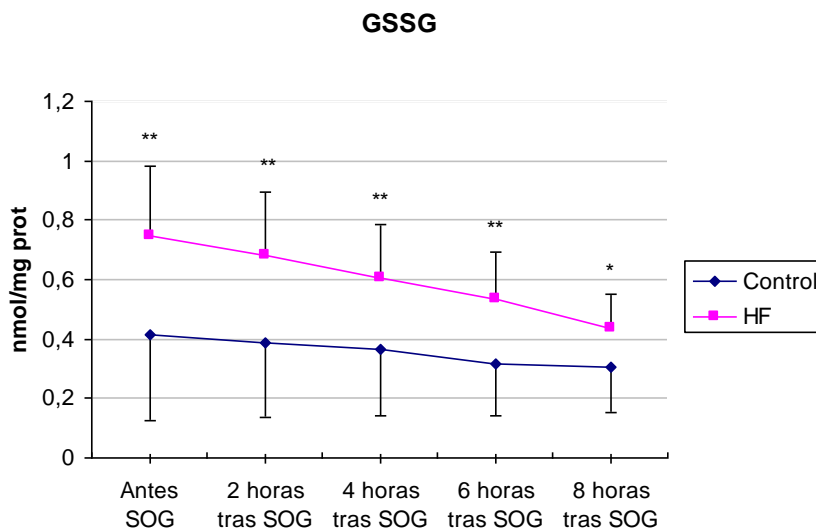
		Antes SOG	2 horas tras SOG	4 horas tras SOG	6 horas tras SOG	8 horas tras SOG
GSSG (nmol/mg prot)	Controles	0,412 (0,284)	0,390 (0,251)	0,368 (0,225)	0,315 (0,175)	0,303 (0,152)
	HF	0,747 (0,235)**	0,682 (0,213)**	0,607 (0,176)**	0,532 (0,160)**	0,436 (0,117)*
GSH (nmol/mg prot)	Controles	23,106 (2,405)	23,559 (2,189)	23,940 (1,903)	24,500 (1,595)	24,916 (1,273)
	HF	19,979 (1,523)**	20,977 (1,222)**	21,767 (1,076)**	22,748 (1,099)**	23,964 (0,824)*

GSSG/GSH (%)	Controles	0,019 (0,016)	0,018 (0,013)	0,016 (0,011)	0,013 (0,008)	0,012 (0,007)
	HF	0,038 (0,014)**	0,033 (0,011)**	0,028 (0,009)**	0,024 (0,007)**	0,018 (0,005)*
MDA (U/mg prot)	Controles	0,338 (0,388)	0,332 (0,380)	0,323 (0,370)	0,293 (0,329)	0,237 (0,248)
	HF	0,750 (0,264)*	0,740 (0,267)**	0,722 (0,271)**	0,666 (0,250)**	0,554 (0,215)**
LDLox (U/L)	Controles	107,999 (19,999)	-	-	-	117,247 (18,027)
	HF	246,098 (51,865)**	-	-	-	242,040 (46,609)**

*p<0,05, **p<0,01 comparado con el grupo control en cada punto de la SOG.

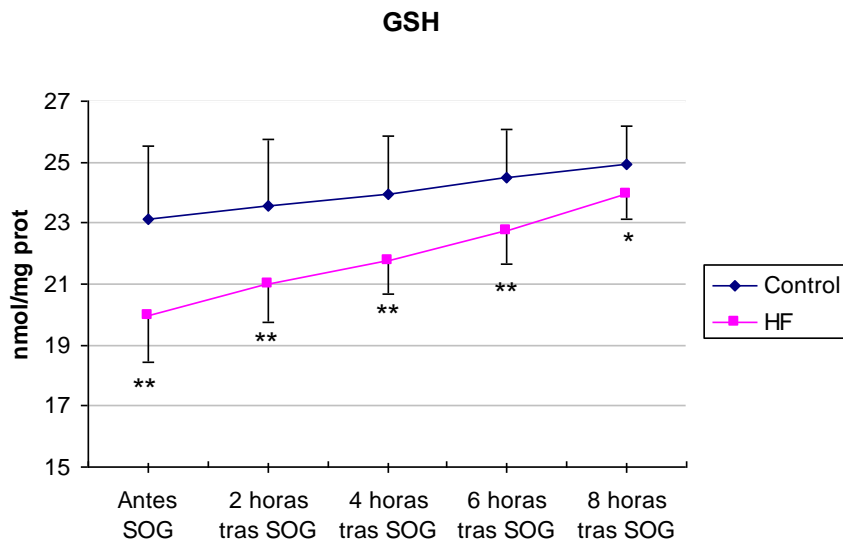
En las siguientes figuras (10 a 14) están representados los marcadores de oxidación en ambos grupos.

Figura 10: Comparación de GSSG en cada punto de la SOG entre controles y HF.



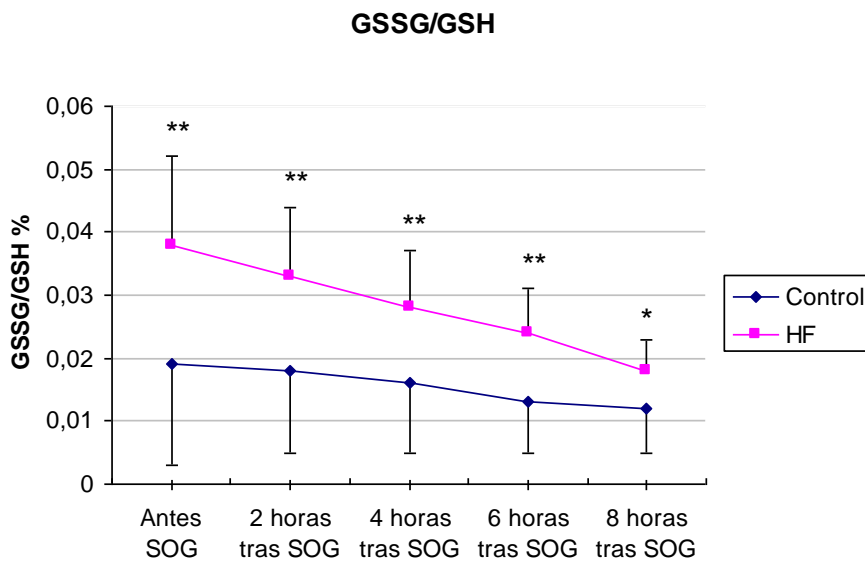
* p<0,05, ** p<0,01.

Figura 11: Comparación de GSH en cada punto de la SOG entre controles y HF.



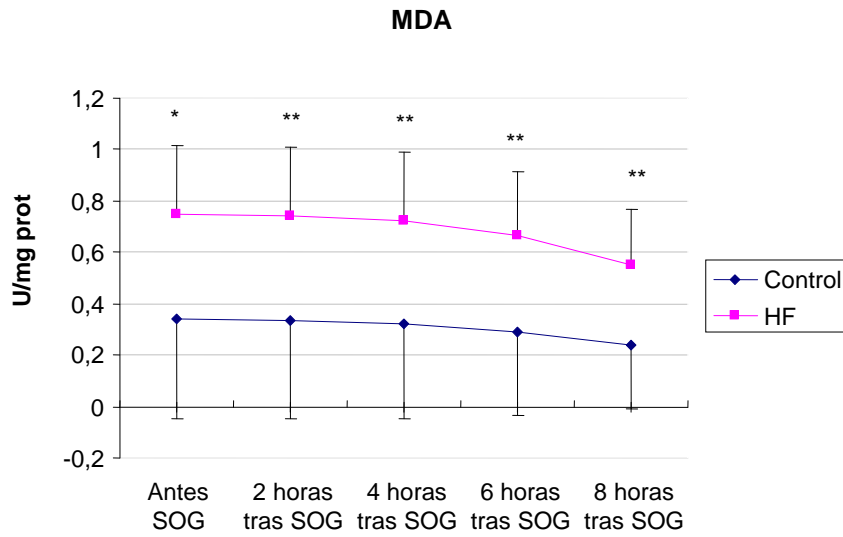
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 12: Comparación del cociente GSSG/GSH en cada punto de la SOG entre controles y HF.



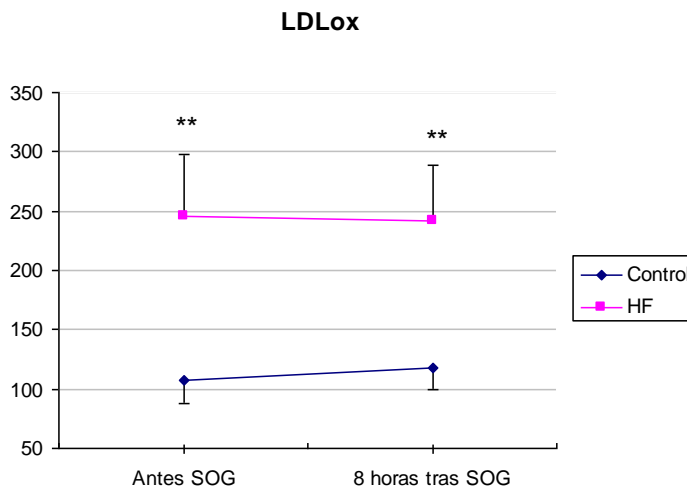
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 13: Comparación del MDA en cada punto de la SOG entre controles y HF.



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 14: Comparación de las LDL oxidadas en cada punto de la SOG entre controles y HF.



** $p < 0,01$.

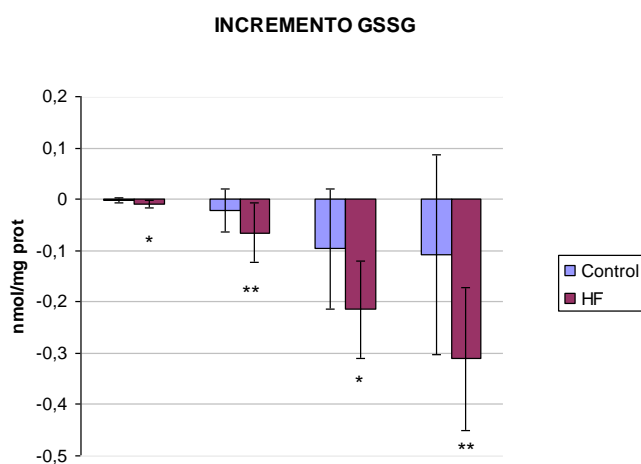
En la tabla 14 se exponen las áreas bajo la curva de los parámetros de oxidación. Las AUC y los d-AUC de GSSG, el cociente GSSG/GSH y MDA son significativamente superiores en el grupo de HF. El AUC y el d-AUC de GSH es significativamente superior en el grupo control.

Tabla 14: Área bajo la curva y diferencial del área bajo la curva de los parámetros de oxidación en ambos grupos.

		Controles	HF	p
GSSG (nmol/mg prot)	AUC	2,862 (1,697)	4,825 (1,424)	0,004
	d-AUC	-0,435 (0,616)	-1,151 (0,574)	0,006
GSH (nmol/mg prot)	AUC	192,032 (14,263)	174,920 (8,011)	0,006
	d-AUC	7,174 (7,555)	15,095 (5,864)	0,005
GSSG/GSH (%)	AUC	0,125 (0,086)	0,225 (0,072)	0,005
	d-AUC	-0,028 (0,042)	-0,079 (0,044)	0,006
MDA (U/mg prot)	AUC	2,471 (2,790)	5,560 (2,036)	0,007
	d-AUC	-0,234 (0,350)	-0,448 (0,207)	0,019

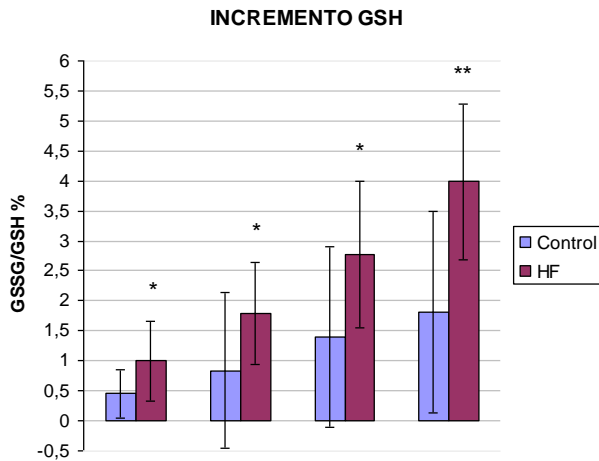
Las siguientes figuras (15 a 18) muestran los incrementos respecto al nivel basal de los parámetros oxidación a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG en controles frente a HF. Los decrementos en los niveles de GSSG y el cociente GSSG/GSH y el incremento en los niveles de GSH son significativamente superiores en los pacientes HF en todos los puntos de la SOG. Los decrementos de MDA son significativamente superiores en el grupo de HF a las 6 y 8 horas tras la SOG.

Figura 15: Comparación del incremento de GSSG respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



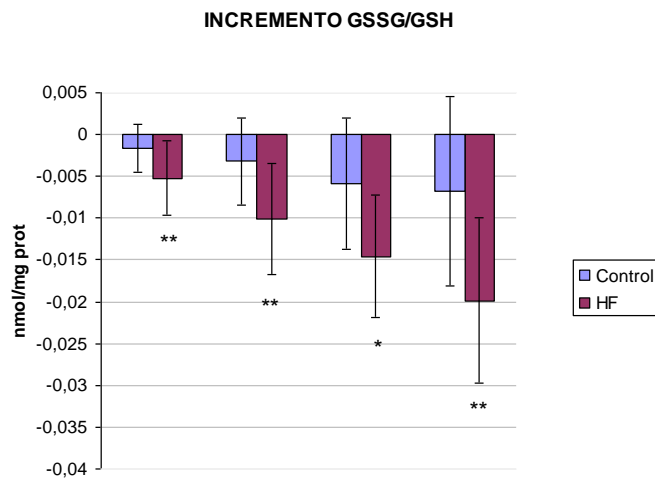
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 16: Comparación del incremento de GSH respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



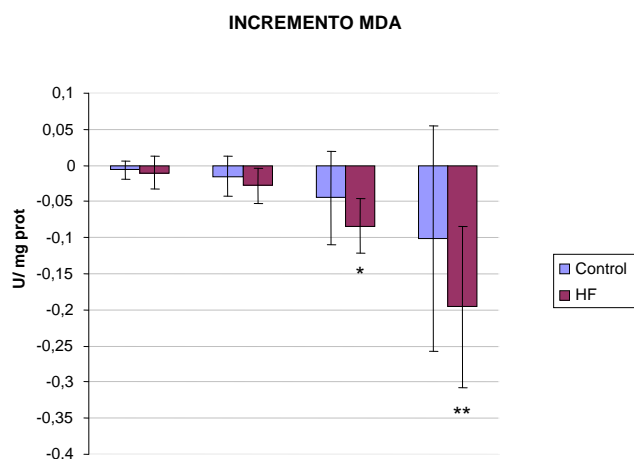
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 17: Comparación del incremento del cociente GSSG/GSH respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



$p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura 18: Comparación del incremento de MDA respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.4. Comparación entre grupos de los parámetros de inflamación durante la SOG.

En la tabla 15 y en las figuras 19 a 26 se exponen los valores de los parámetros de inflamación del grupo completo antes y después de la SOG. Únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de eotaxina basal entre pacientes HF y controles. Las citocinas proinflamatorias (IL1 β , IL6, IL8, IFN γ y eotaxina) en los pacientes HFh tienen valores superiores tanto a nivel basal como tras la SOG, aunque sin alcanzar la significación estadística. En el caso de TNF α y MCP1 ambos grupos parten de valores similares, aunque durante el periodo postprandial el grupo HF mantiene valores inferiores al grupo control, sin ser estadísticamente significativo. En el caso de MIP1 α , los valores son superiores en el grupo control durante todo el estudio.

Tabla 15: Comparación de los parámetros de inflamación en cada punto de la SOG entre controles y HF.

		Antes SOG	2 horas tras SOG	4 horas tras SOG	6 horas tras SOG	8 horas tras SOG
TNF α	Controles	7,24 (5,83)	7,55 (5,30)	7,19 (5,76)	6,65 (5,35)	7,00 (4,90)
	HF	7,021 (4,83)	5,38 (3,99)	5,47 (3,42)	5,46 (4,08)	5,93 (3,89)

IL 1 β	Controles	0,72 (0,71)	0,81 (0,56)	0,65 (0,52)	0,57 (0,52)	0,63 (0,54)
	HF	2,08 (2,92)	1,74 (2,47)	1,86 (3,03)	1,52 (1,83)	1,63 (1,91)
IL 6	Controles	12,51 (21,27)	13,51 (21,98)	14,36 (21,10)	14,64 (22,40)	14,79 (19,32)
	HF	42,65 (76,74)	42,99 (78,89)	48,98 (88,07)	31,94 (61,37)	33,98 (64,93)
IL 8	Controles	4,13 (3,66)	5,05 (5,92)	4,01 (3,39)	3,53 (2,95)	3,85 (3,35)
	HF	10,88 (13,98)	11,69 (13,28)	11,38 (14,52)	8,29 (11,18)	7,81 (9,75)
INF γ	Controles	12,97 (14,43)	16,95 (14,79)	10,98 (10,64)	8,28 (7,60)	11,14 (12,37)
	HF	22,57 (36,96)	13,39 (23,14)	16,28 (31,31)	12,75 (16,33)	16,09 (20,38)
MCP1	Controles	92,31 (37,50)	93,08 (32,99)	89,40 (28,18)	86,25 (21,37)	83,17 (21,54)
	HF	90,08 (41,42)	77,39 (28,90)	73,97 (28,22)	76,51 (31,97)	72,59 (26,45)
MIP 1 α	Controles	39,17 (35,48)	37,77 (35,99)	38,77 (35,87)	37,37 (36,34)	41,37 (40,83)
	HF	23,76 (27,71)	27,43 (26,35)	20,23 (23,94)	18,55 (23,23)	21,09 (27,90)
Eotaxina	Controles	56,56 (18,58)	60,96 (26,08)	60,69 (25,92)	62,35 (23,31)	62,03 (19,63)
	HF	84,33 (33,56)*	72,22 (27,93)	74,62 (35,33)	73,95 (32,40)	70,14 (24,05)

* p < 0,05 comparado con el grupo control en cada punto de la SOG

Figura 19: Comparación de TNF α en cada punto de la SOG entre controles y HF.

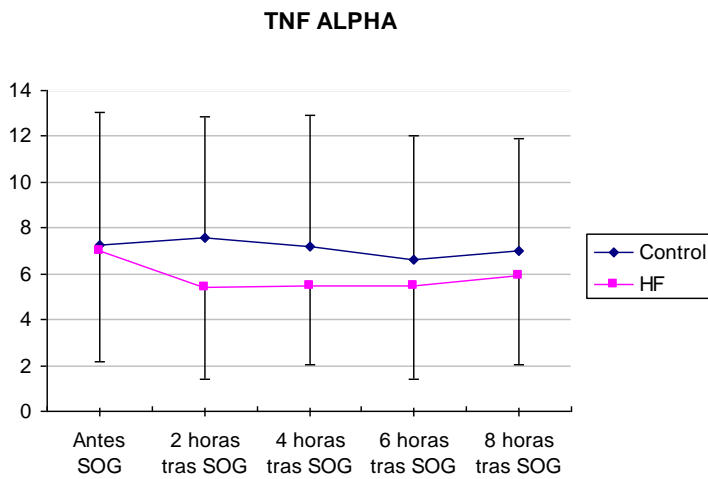


Figura 20: Comparación de IL β en cada punto de la SOG entre controles y HF.

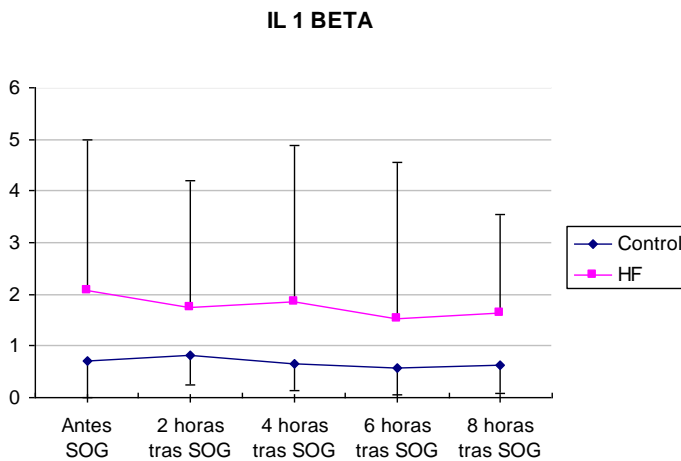


Figura 21: Comparación de IL 6 en cada punto de la SOG entre controles y HF.

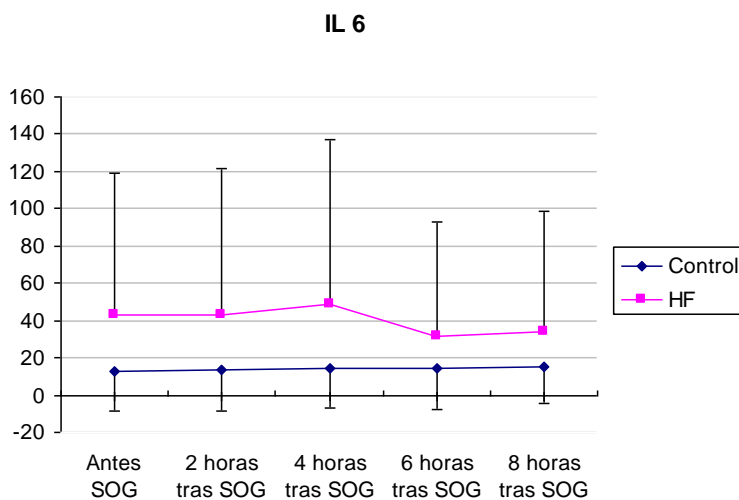


Figura 22: Comparación de IL 8 en cada punto de la SOG entre controles y HF.

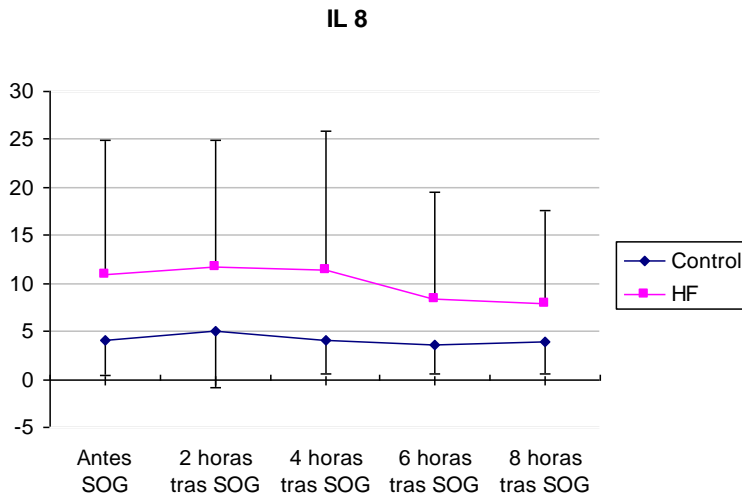


Figura 23: Comparación de INF γ en cada punto de la SOG entre controles y HF.

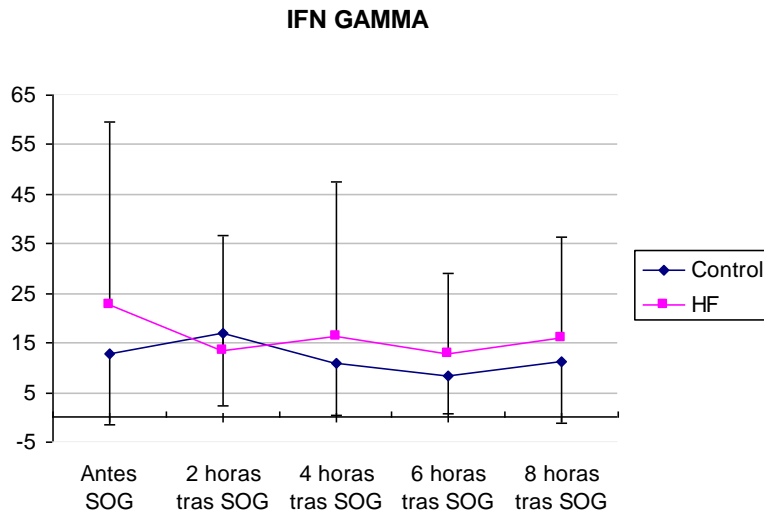
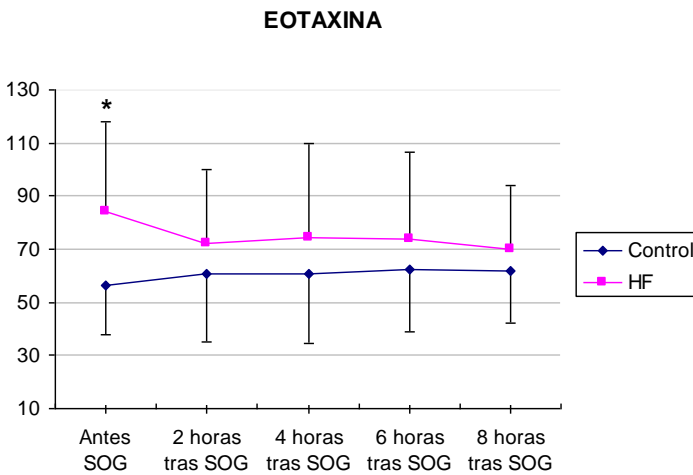


Figura 24: Comparación de eotaxina en cada punto de la SOG entre controles y HF.



* $p < 0,05$

Figura 25: Comparación de MCP1 en cada punto de la SOG entre controles y HF.

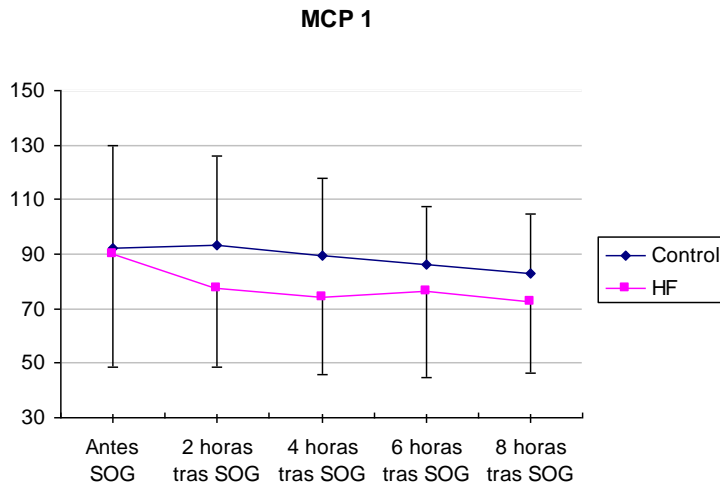
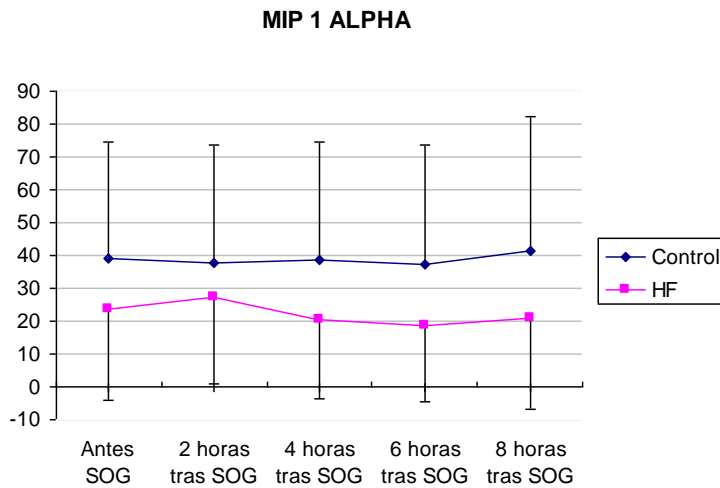


Figura 26: Comparación de MIP 1 α en cada punto de la SOG entre controles y HF.



En la tabla 16 se exponen las áreas bajo la curva de los parámetros de inflamación comparando entre controles y HF. No se hallaron diferencias en las AUC de las interleucinas entre ambos grupos. El incremento en el AUC de la eotaxina fue significativamente menor en el grupo de HF; no se observaron diferencias significativas en los incrementos del AUC en los otros parámetros.

Tabla 16: Área bajo la curva y diferencial del área bajo la curva de los parámetros de inflamación en ambos grupos.

		Controles	HF	<i>p</i>
TNF α	AUC	54,67 (39,000)	41,97 (31,406)	<i>0,171</i>
	I-AUC	-6,763 (12,677)	-12,491 (15,134)	<i>0,420</i>
IL 1β	AUC	5,19 (3,778)	13,14 (18,499)	<i>0,765</i>
	I-AUC	-0,898 (3,233)	-3,207 (11,865)	<i>0,152</i>
IL 6	AUC	109,20 (168,754)	292,89 (518,355)	<i>0,414</i>
	I-AUC	10,338 (11,506)	13,008 (25,753)	<i>0,987</i>
IL 8	AUC	32,46 (28,069)	74,49 (84,812)	<i>0,089</i>
	I-AUC	0,605 (12,905)	-0,001 (13,760)	<i>0,561</i>
INF γ	AUC	89,52 (78,767)	115,19 (192,810)	<i>0,359</i>
	I-AUC	-12,562 (52,754)	-58,322 (109,296)	<i>0,072</i>
Eotaxina	AUC	474,50 (168,427)	596,08 (241,224)	<i>0,210</i>
	I-AUC	24,473 (75,367)	-78,60 (111,743)	<i>0,003</i>
MCP-1	AUC	691,85 (178,399)	618,40 (237,98)	<i>0,396</i>
	I-AUC	-50,435 (191,832)	-102,287 (133,492)	<i>0,135</i>
MIP-1-α	AUC	300,03 (285,299)	168,87 (184,616)	<i>0,146</i>
	I-AUC	17,649 (57,920)	-20,089 (74,782)	<i>0,097</i>

Por otro lado, se han calculado los incrementos respecto al valor basal de los parámetros inflamatorios a lo largo de la SOG. En las siguientes figuras (Fig 27 a 34) se muestran los resultados. Ambos grupos experimentaron incrementos negativos de TNF- α , IL1 β e IFN- γ y positivos de IL6, sin objetivar diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los incrementos de IL 8 fueron positivos en las primeras 4 horas y pasaron a ser negativos a partir de las 6 horas; en esta citocina encontramos un incremento superior en los HF a las 4 horas frente a los controles. Los incrementos de eotaxina y MIP1 α fueron ligeramente positivos en controles y negativos en HF, encontrando diferencias significativas entre ambos en todos los puntos de la SOG para la eotaxina y a las 6 y 8 horas para el MIP1 α .

Figura 27: Comparación del incremento de TNF α respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.

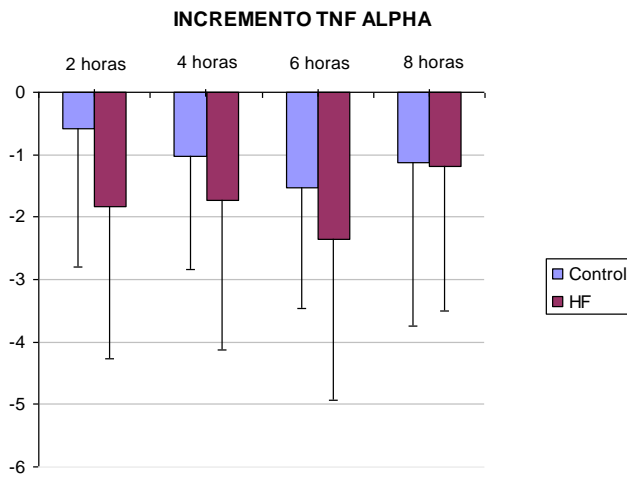


Figura 28: Comparación del incremento de IL 1 β respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.

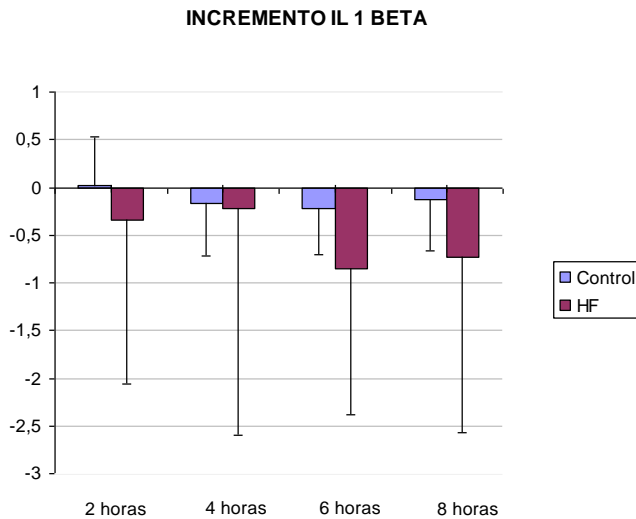


Figura 29: Comparación del incremento de IL 6 respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.

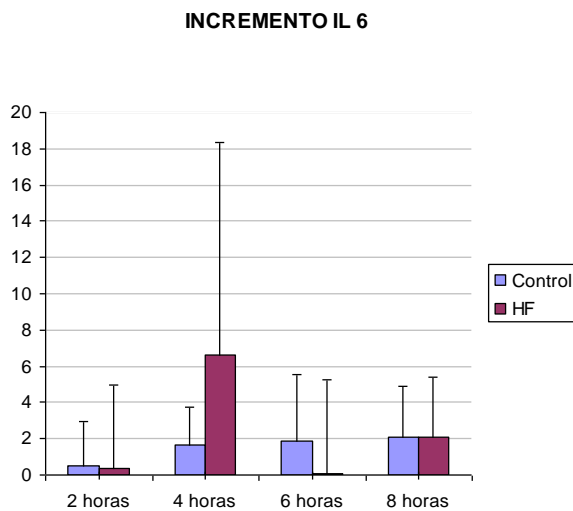
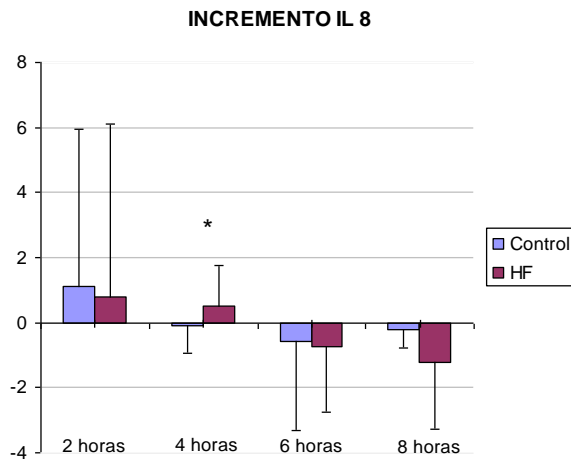


Figura 30: Comparación del incremento de IL 8 respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



***p<0,05**

Figura 31: Comparación del incremento de IFN γ respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.

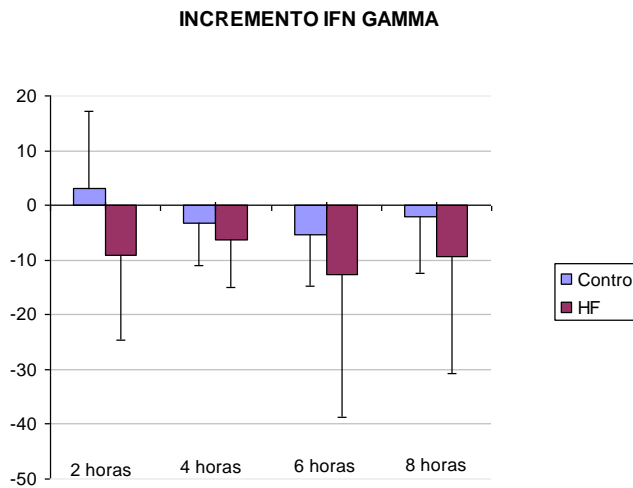
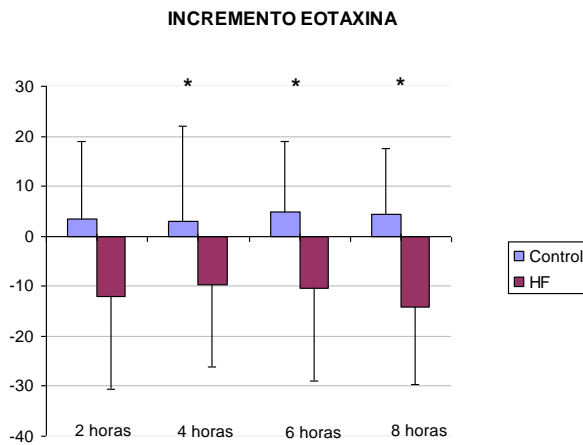


Figura 32: Comparación del incremento de eotaxina respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



***p<0,05**

Figura 33: Comparación del incremento de MCP-1 respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.

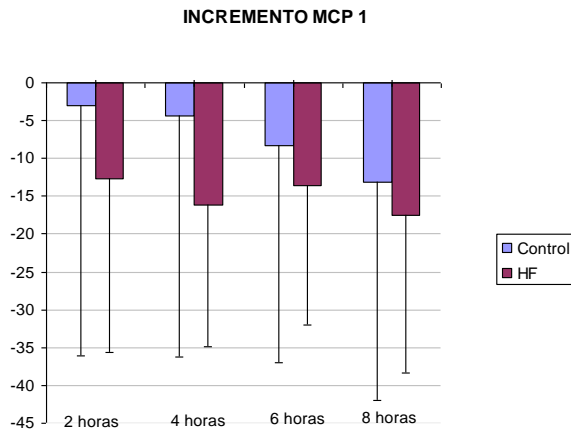
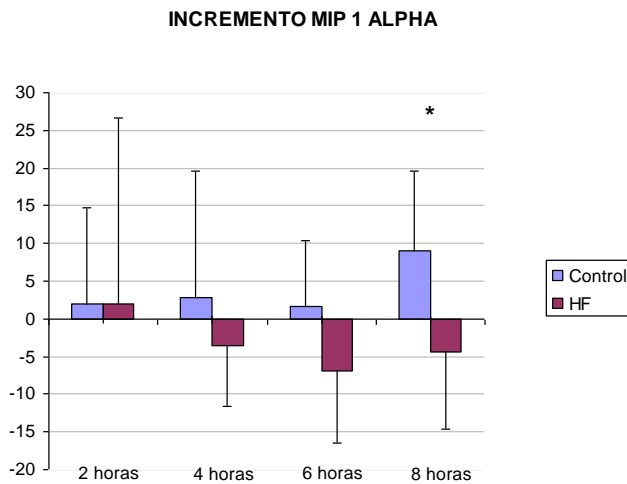


Figura 34: Comparación del incremento de MIP-1 α respecto del nivel basal en cada punto de la SOG entre controles y HF.



* $p < 0,05$

3. Estudio de intervención con la sobrecarga de ácidos grasos insaturados.

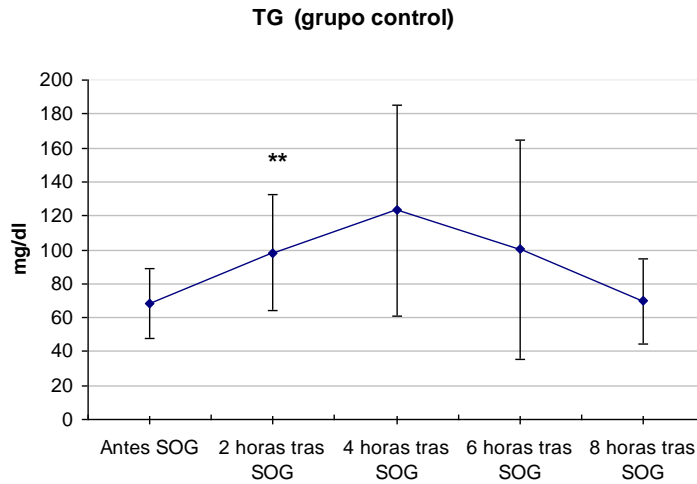
3.1. Efecto de la SOG en la trigliceridemia:

3.1.1. Resultados en el grupo control:

La SOG aumentó las concentraciones de TG de 68,54 (20,66) mg/dl a un máximo de 123,23 (62,21) mg/dl a las 4 horas, aunque no fue estadísticamente significativo ($p=0,935$, *test de Wilcoxon para datos apareados*); el valor de TG a las 2 horas sí fue

estadísticamente superior al nivel basal ($p < 0,001$). La trigliceridemia alcanzó el nivel basal a las 8 horas (figura 35).

Figura 35: Trigliceridemia a lo largo de la SOG en el grupo control: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal.

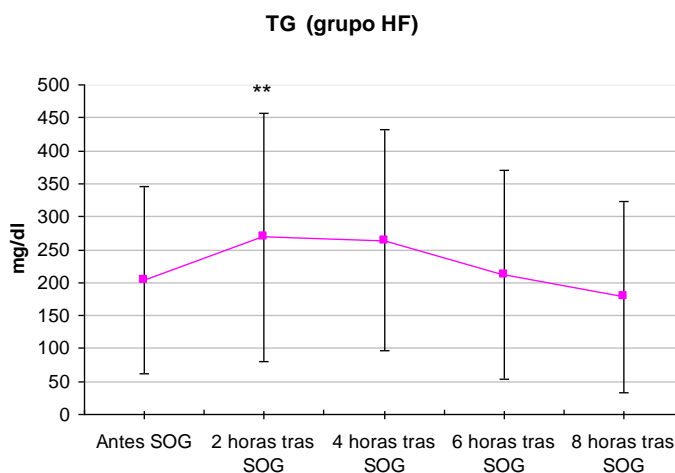


**** $p < 0,01$**

3.1.2. Resultados en el grupo HF:

En los pacientes HF, el punto máximo se alcanzó a las dos horas siendo estadísticamente diferente al nivel de trigliceridemia en ayunas ($p 0,008$). Las concentraciones de TG volvieron al nivel basal a las 8 horas (Fig 36).

Figura 36: Trigliceridemia a lo largo de la SOG en el grupo HF: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal.



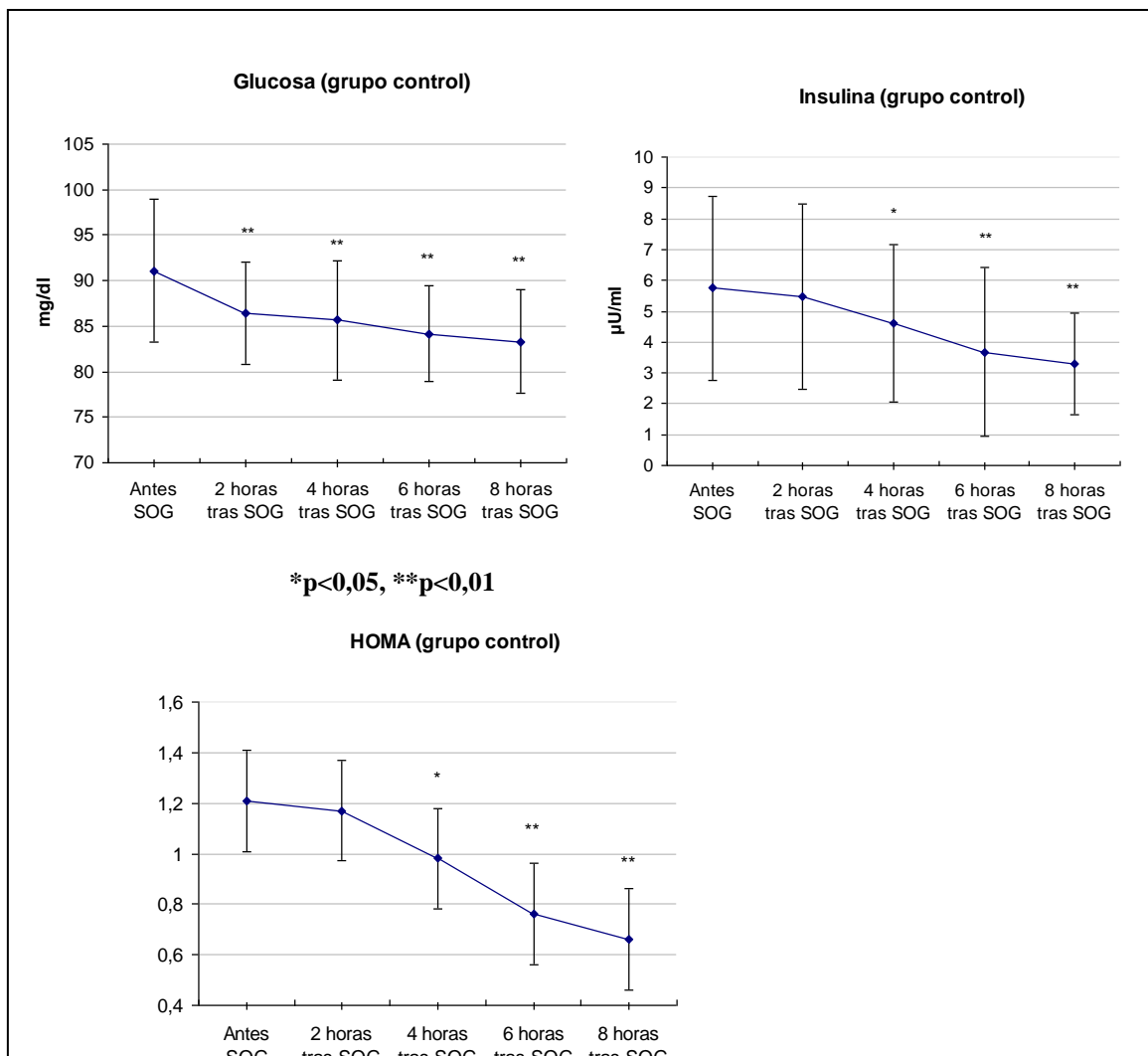
**** $p < 0,01$**

3.2. Efectos de la SOG en los parámetros del metabolismo glucémico.

3.2.1 Resultados en el grupo control:

Se objetiva un descenso significativo en la glucemia a partir de las 2 horas y en la insulinemia y HOMA a partir de las 4 horas, alcanzando los niveles mínimos a las 8 horas tras la SOG (figura 37).

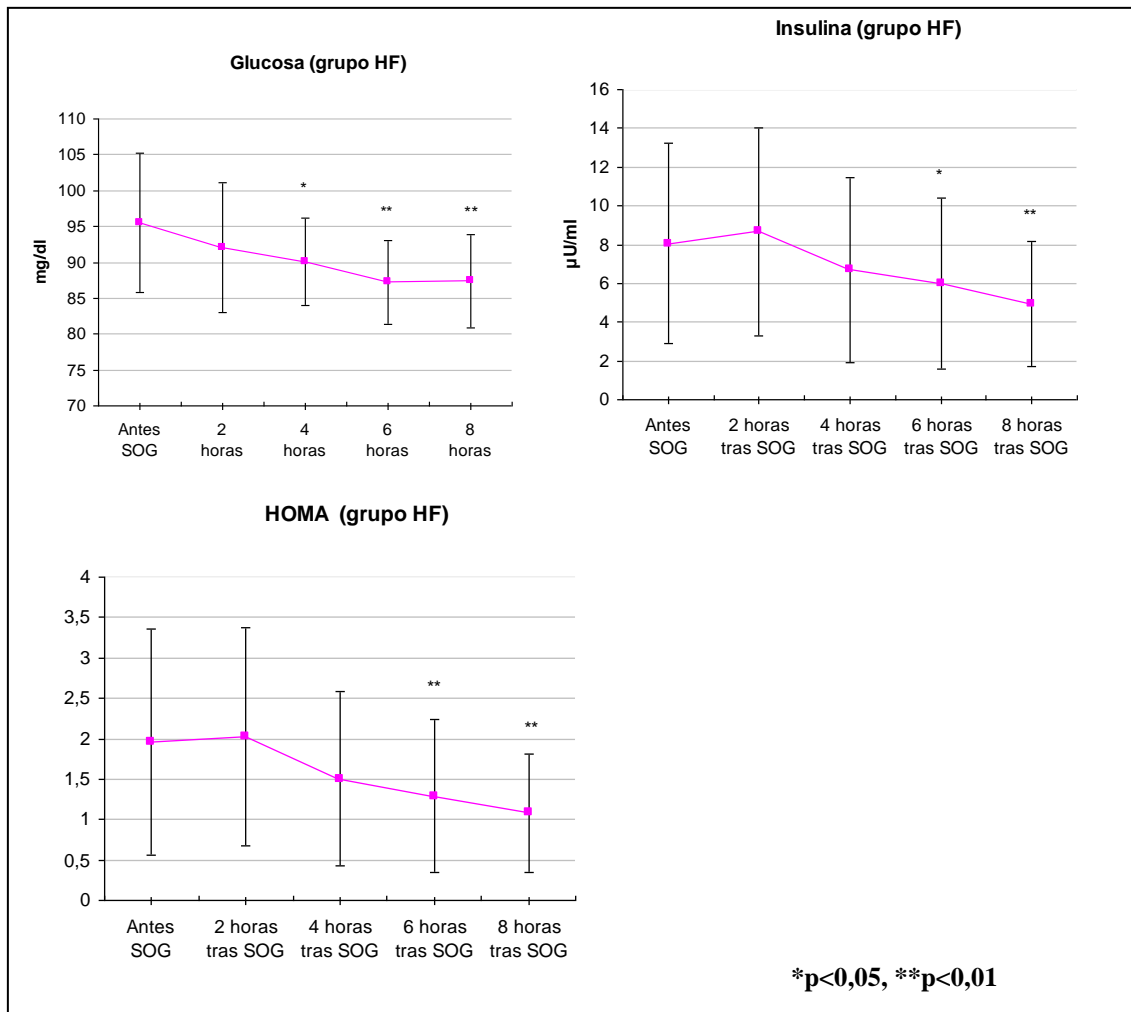
Figura 37: Parámetros del metabolismo glucémico en el grupo control: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal.



3.2.2 Resultados en el grupo HF:

Objetivamos descensos significativos en la glucemia a partir de las 4 horas y en la insulinemia y HOMA a partir de las 6 horas (figura 38).

Figura 38: Parámetros del metabolismo glucémico en el grupo HF: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal.

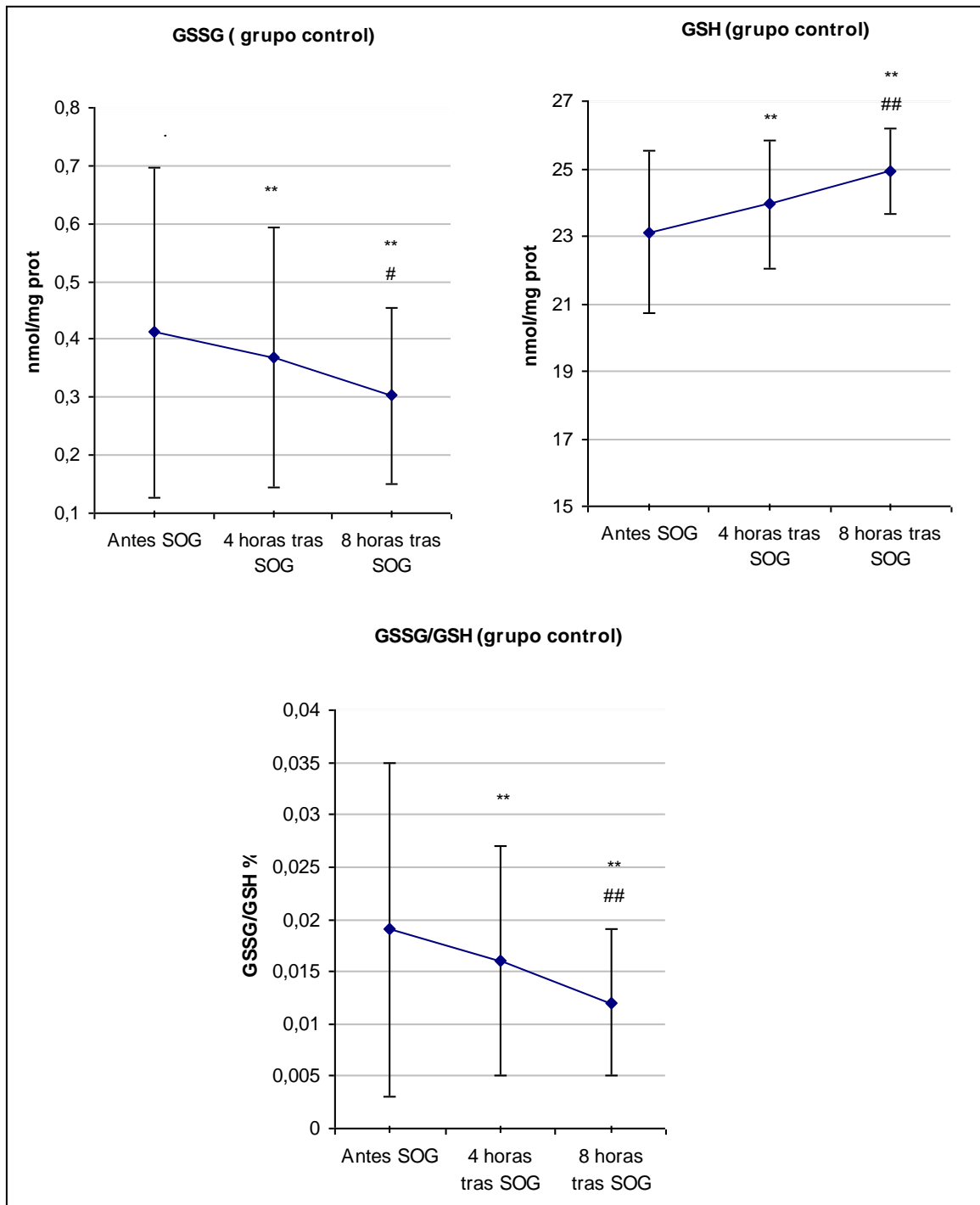


3.3. Efectos de la SOG en el sistema glutatión:

3.3.1. Resultados en el grupo control:

Se observa un descenso progresivo de los valores plasmáticos de GSSG y aumento de GSH, con lo que el cociente GSSG/GSH desciende durante el periodo postprandial. Existen diferencias estadísticamente significativas en los valores de GSSG, GSH y cociente GSSG/GSH a las 4 y 8 horas tras la SOG comparados con el nivel en ayunas, así como al comparar los valores entre las 4 y 8 horas (figura 39).

Figura 39: Sistema glutation durante la SOG en el grupo control: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal y a las 4 horas.

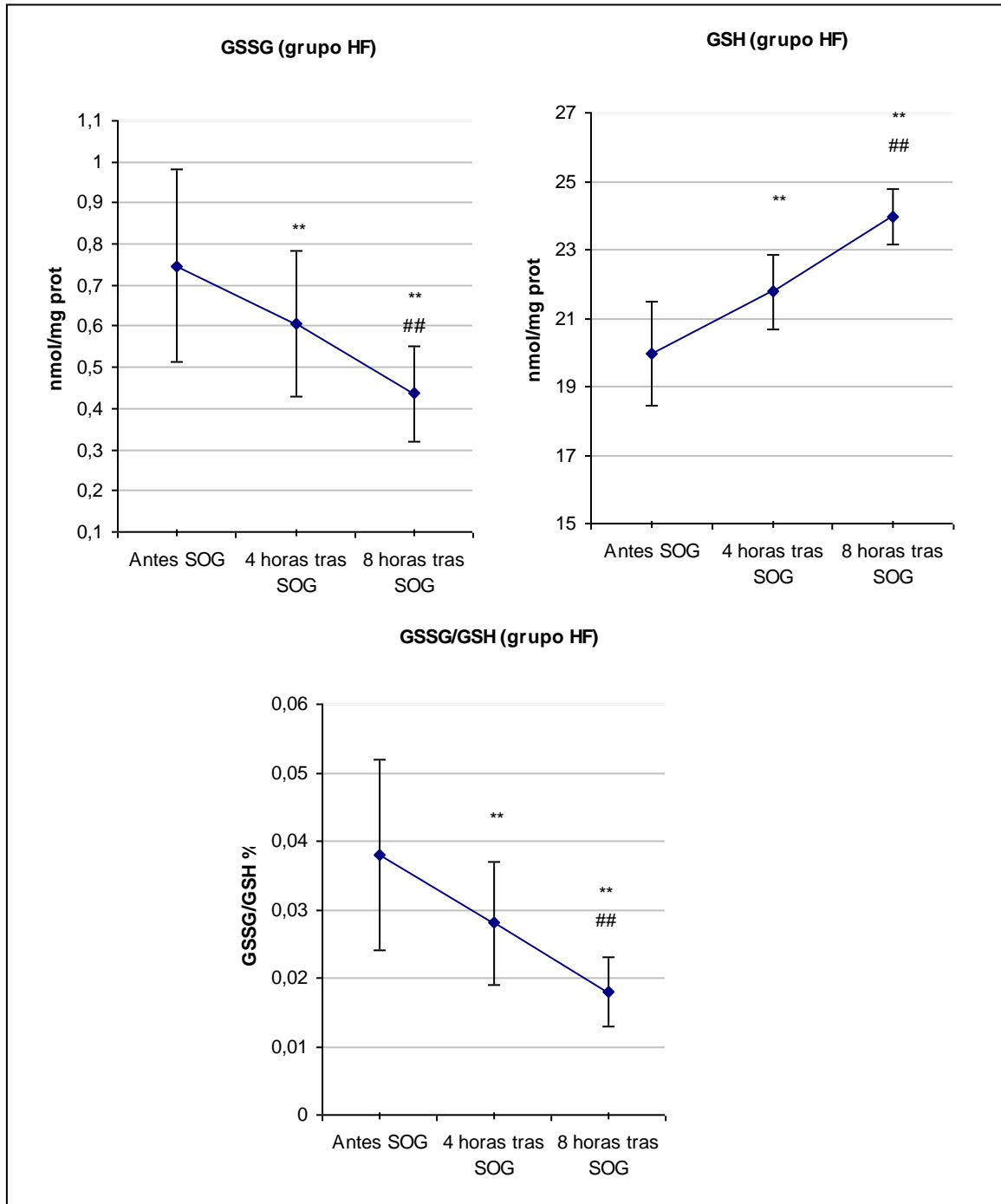


* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el valor de antes de la SOG.
 # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado con el valor de las 4 horas tras la SOG.

3.3.2. Resultados en el grupo HF:

Se observan los mismos cambios que los referidos en el grupo control: aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de GSH con descenso significativo de los niveles de GSSG y el cociente GSSG/GSH (figura 40).

Figura 40: Sistema glutatión durante la SOG en el grupo HF: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal y a las 4 horas.



* p<0,05, ** p <0,01 comparado con el valor de antes de la SOG.

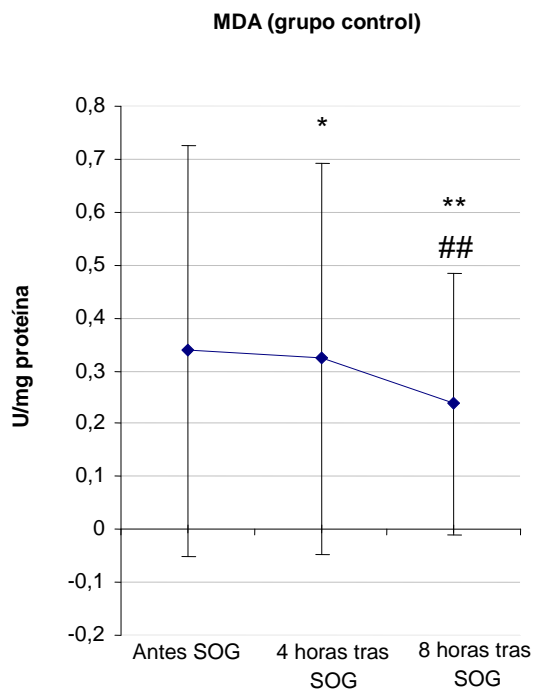
p<0,05, ## p<0,01 comparado con el valor de las 4 horas tras la SOG.

3. 4. Efectos de la SOG en el MDA plasmático:

3.4.1. Resultados en el grupo control:

Encontramos un descenso significativo en la concentración de MDA a las 4 y 8 horas respecto del nivel basal, así como a las 8 horas comparado con el valor alcanzado a las 4 horas (fig 41).

Figura 41: MDA durante la SOG en el grupo control: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal y a las 4 horas.



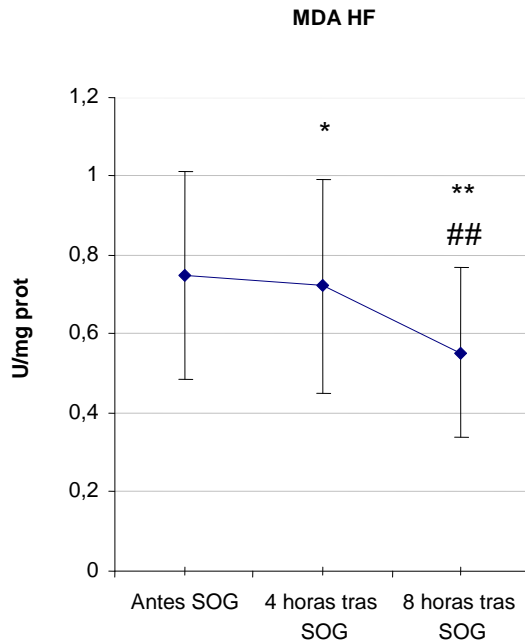
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el valor de antes de la SOG.

$p < 0,01$ comparado con el valor de las 4 horas tras la SOG.

3.4.2. Resultados en el grupo HF:

Al igual que en el grupo control, existe un descenso significativo a lo largo de la SOG en los niveles de MDA (Fig 42).

Figura 42: MDA durante la SOG en el grupo control: comparación de los valores postprandiales con el nivel basal y a las 4 horas.



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el valor de antes de la SOG.
$p < 0,01$ comparado con el valor de las 4 horas tras la SOG.

3. 5. Efectos de la SOG en los parámetros de inflamación sistémica.

3. 5.1. Resultados en el grupo control:

Se compararon los incrementos alcanzados las 4 y 8 horas tras la SOG en el grupo control con respecto a los valores en ayunas. Los incrementos negativos de TNF α a las 4 y 8 horas y los incrementos positivos de IL6 a las 4 y 8 horas y de MIP1- α a las 8 horas fueron estadísticamente significativos (fig 43 y 44).

Figura 43: Parámetros de inflamación con incrementos positivos durante la SOG en el grupo control: comparación de los incrementos en los valores postprandiales a las 4 y 8 horas con el nivel basal.

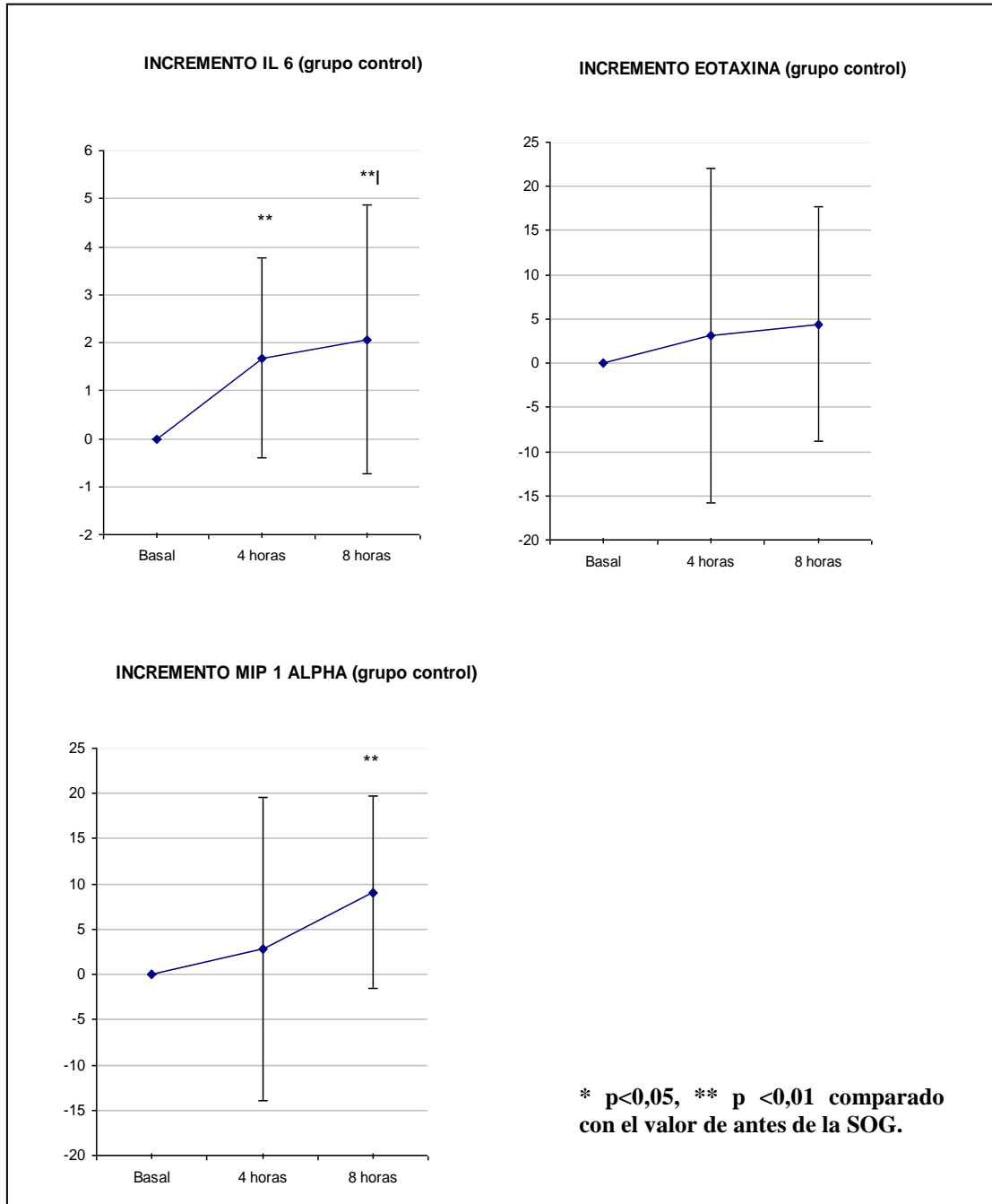
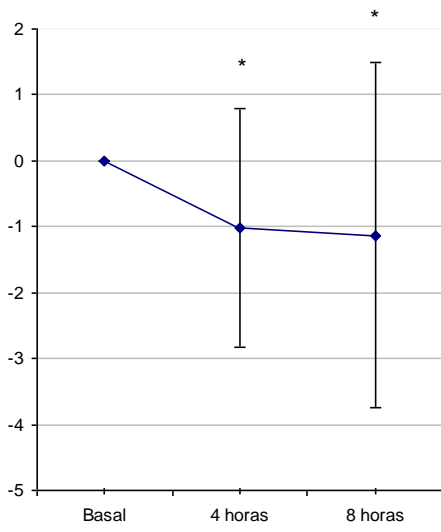
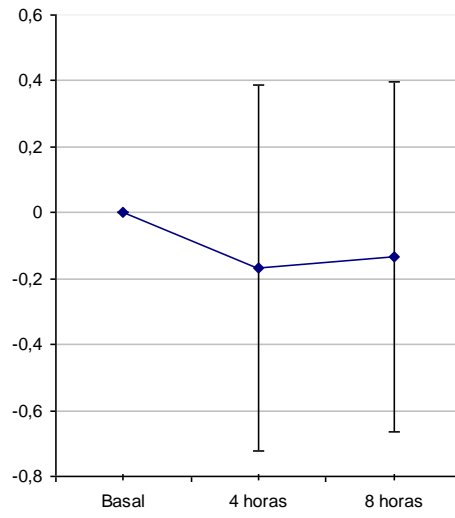


Figura 44: Parámetros de inflamación con incrementos negativos durante la SOG en el grupo control: comparación de los incrementos en los valores postprandiales a las 4 y 8 horas con el nivel basal.

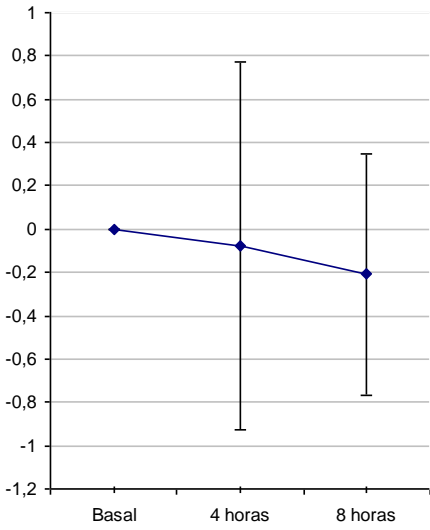
INCREMENTO TNF ALPHA (grupo control)



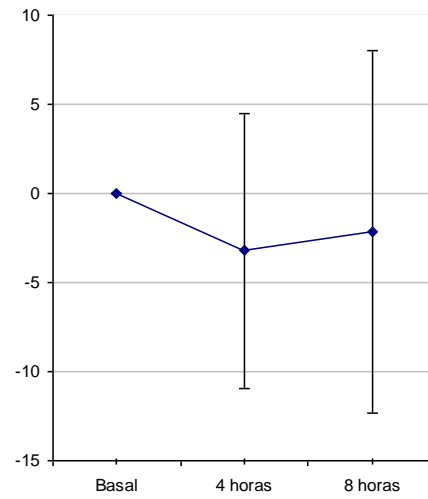
INCREMENTO IL 1 BETA (grupo control)



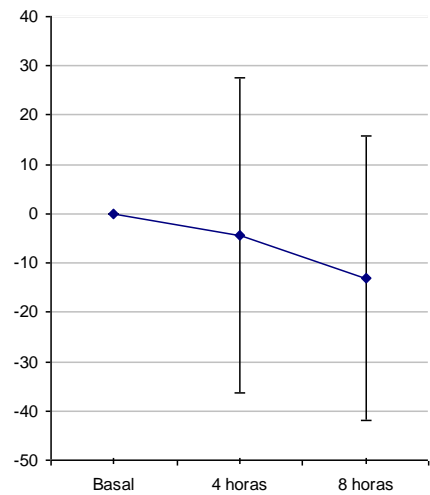
INCREMENTO IL 8 (grupo control)



INCREMENTO IFN GAMMA (grupo control)



INCREMENTO MCP 1 (grupo control)



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el valor de antes de la SOG.

3. 5.2. Resultados en el grupo HF:

En el grupo HF, los incrementos significativos respecto a los valores basales fueron: incrementos negativos en TNF α a las 8 horas, IL 8 a las 8 horas y eotaxina a las 4 y 8 horas e incrementos positivos en IL6 a las 4 y 8 horas e IL8 a las 4 horas (fig 45 y 46).

Figura 45: Parámetros de inflamación con incrementos positivos durante la SOG en el grupo HF: comparación de los incrementos en los valores postprandiales a las 4 y 8 horas con el nivel basal.

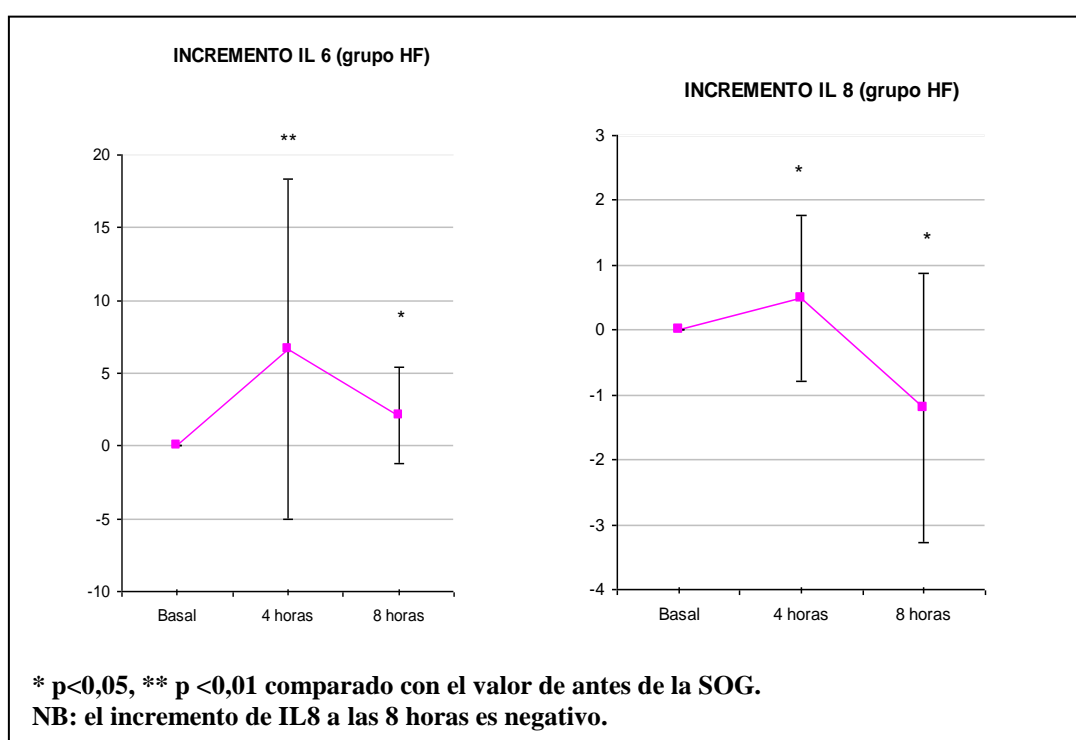
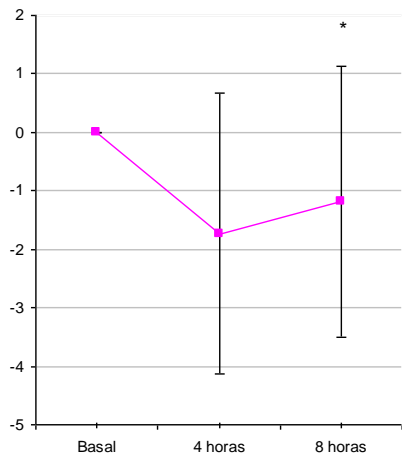
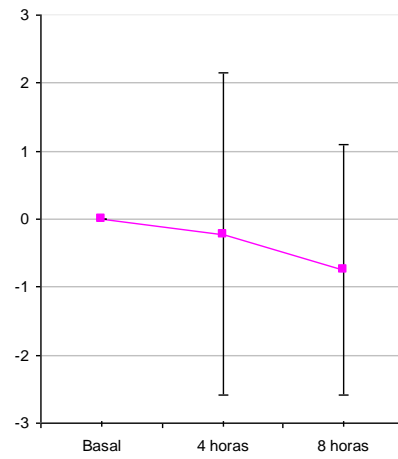


Figura 46: Parámetros de inflamación con incrementos negativos durante la SOG en el grupo HF: comparación de los incrementos en los valores postprandiales a las 4 y 8 horas con el nivel basal.

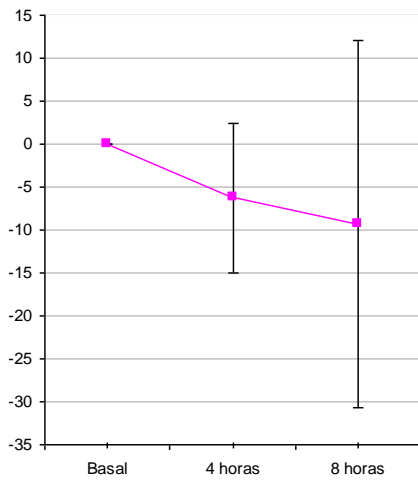
INCREMENTO TNF ALPHA (grupo HF)



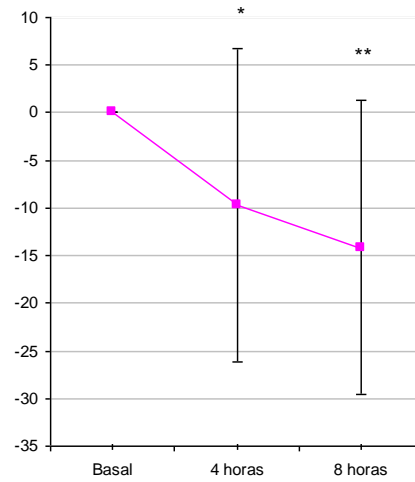
INCREMENTO IL 1 BETA (grupo HF)



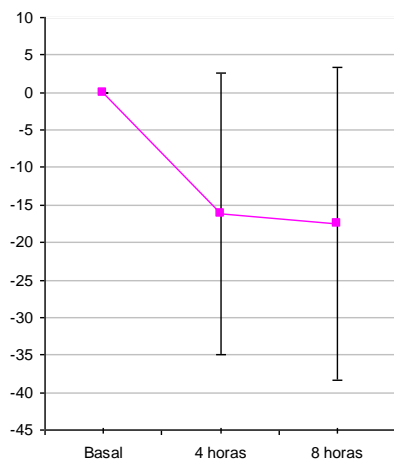
INCREMENTO IFN GAMMA (grupo HF)



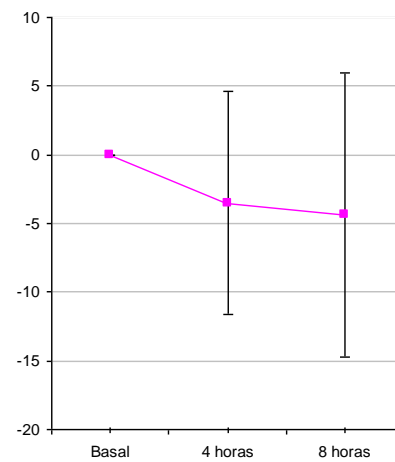
INCREMENTO EOTAXINA (grupo HF)



INCREMENTO MCP 1 (grupo HF)



INCREMENTO MIP 1 ALPHA (grupo HF)



* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con el valor de antes de la SOG.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La HF es una hipercolesterolemia monogénica que conlleva un alto riesgo de arteriosclerosis precoz, especialmente cardiopatía coronaria isquémica. La hiperlipemia postprandial se ha asociado con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular arteriosclerótica. Por otra parte, la inflamación y la oxidación se han relacionado con el inicio y desarrollo de arteriosclerosis. En el presente trabajo hemos estudiado la presencia de oxidación e inflamación tras una sobrecarga oral grasa rica en ácidos grasos monoinsaturados en sujetos sanos y con HF.

1. Evaluación del test de sobrecarga grasa y la selección de pacientes.

Los niveles de trigliceridemia postprandial varían por factores nutricionales y genéticos, por lo que seleccionamos una muestra y una comida homogénea y bien caracterizada para evitar esta variabilidad. Ambos grupos eran comparables en género e IMC. Las mujeres eran premenopáusicas, para evitar la influencia negativa de la menopausia en la lipemia postprandial ¹⁵⁶. El nivel de HOMA, como medida de resistencia a la insulina, era comparable en ambos grupos. Es sabido que, el grado de sensibilidad a la insulina es un factor determinante de la respuesta lipémica postprandial en sujetos sanos ^{157,158}, atribuyéndole una alteración de la supresión de la producción hepática de VLDL y la liberación de ácidos grasos libres por el tejido adiposo mediada por la insulina ¹⁵⁹. La actividad física aeróbica reduce significativamente la lipemia postprandial en un 24-35% y aumenta la actividad de la LPL ¹⁶⁰. Por ello, los sujetos estudiados no practicaban ningún deporte de competición, se evitó la práctica de ejercicio físico intenso el día previo y se mantuvo un reposo relativo durante la realización de la SOG. Ninguno de los pacientes era fumador, ya que se han visto aumentos de hasta 50% en el incremento postprandial de triglicéridos en fumadores habituales, sin cambios en la trigliceridemia basal ¹⁶¹. Asimismo, se excluyeron los pacientes con ingesta >30 g/día de alcohol y no se permitió la ingesta de alcohol el día previo a la SOG. El etanol parece estimular la secreción de partículas grandes de VLDL ¹⁶², aumenta la síntesis de ácidos grasos y reduce su aclaramiento plasmático ¹⁶³. Se conoce que diversos polimorfismos pueden influir en la lipemia postprandial, tales como los genes de lipoteína lipasa, apo CIII, apo A1 y apoA4, CETP, FABP2 y receptor

scavenger, entre otros¹⁶⁰. La Apo E es un componente estructural de varias lipoproteínas y funciona como ligando del *LDLR* y *LRP*, jugando así un papel importante en el metabolismo postprandial al facilitar un aclaramiento más rápido de las lipoproteínas ricas en triglicéridos de la circulación. Las isoformas de Apo E (E2, E3, E4) difieren en su afinidad para unirse a los receptores específicos¹⁶⁴; los sujetos homocigotos de ApoE2 tienen un aclaramiento enlentecido, mientras que los portadores de apoE4 tienen un aclaramiento más rápido de las partículas remanentes¹⁶⁵. En nuestra muestra, todos los pacientes eran homocigotos para E3 con objeto de evitar esta variabilidad. Sin embargo, no se estudiaron otros polimorfismos mencionados anteriormente, que podrían influir en los resultados, explicando en parte las diferencias interindividuales observadas.

En cuanto al preparado lipídico empleado en la SOG, la cantidad de grasa administrada era la contenida en la mayoría de comidas habituales (30-70 g grasa). Dosis menores de 30 g no aumentan trigliceridemia y > 80 g exageran la lipemia postprandial sin relación dosis-dependiente¹⁶⁶. A diferencia de los estudios de lipemia postprandial que utilizan comidas de prueba, en nuestro caso el 100% de los lípidos eran TG de cadena larga, que influyen sobre la trigliceridemia postprandial al entrar a la circulación general en forma de quilomicrones. Las grasas dietéticas contienen diferentes cantidades de ácidos grasos de cadena corta y media, las cuales pasan directamente a circulación portal y tienen un efecto limitado sobre la trigliceridemia postprandial. En el perfil de lípidos se seleccionó una composición basada en las recomendaciones NCEP-1, puesto que nuestro preparado se obtiene a partir de aceites vegetales y es rico en ácidos grasos monoinsaturados (tabla 6).

Tabla 6: Proporción de ácidos grasos contenido en diferentes alimentos

	AGS (%)	AGMI (%)	AGPI (%)	n6 /n3
Supracal®	19,2	56,6	20,2	>20
Aceite oliva	14,4	73	8,6	11,1
Nueces	11	15,7	68,3	5,25
Mantequilla	71,6	25,4	3	2,05

AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; n-3: ácidos grasos de la serie omega 3; n-6: ácidos grasos de la serie omega 6.

En general, los estudios que han evaluado el impacto de la composición de ácidos grasos en el aumento de trigliceridemia postprandial tras una sobrecarga oral grasa han demostrado que no existen diferencias importantes en el tipo de grasa

ingerida. Si bien estudios que han evaluado en número de partículas (mediante la respuesta de Apo B48) sí que han encontrado diferencias en el número y tamaño de las partículas según la composición en ácidos grasos; los efectos son por orden decreciente: AGS >AGMI > AGPI. Las comidas ricas en ácido oleico producen una elevación mayor de apo B-48 que las ricas en poliinsaturados, estimulando la formación de lipoproteínas que contienen apoB48 tanto pequeñas (S[f] 60-400) como grandes (S[f] 60-400) y con un pico postprandial de triglicéridos más estrecho y pronunciado que el inducido por la grasa saturada, si bien las áreas bajo la curva no son diferentes ^{167, 168, 169}.

Nuestra sobrecarga oral grasa no contenía hidratos de carbono ni fibra, para que no alterasen la respuesta lipídica. Se ha visto que las dietas ricas en carbohidratos pueden elevar la hipertrigliceridemia postprandial al alterar la secreción/aclaramiento de las lipoproteínas ¹⁷⁰. La fibra soluble reduce la tasa de digestión de grasa dietética y atenúa la respuesta lipémica postprandial ¹⁷¹.

2. Lipemia postprandial.

En el grupo control, los niveles máximos de TG fueron de 123,23 (62,21) mg/dl a las 4 horas. En el grupo de HF, las máximas trigliceridemias se alcanzaron antes que en los sujetos control, a las 2 horas, manteniéndose elevadas a las 4 horas, y descendiendo posteriormente. En ambos grupos, la trigliceridemia regresó a los valores basales a las 8 horas tras la SOG. Otros investigadores también observaron trigliceridemias máximas entre las 3 y 4 horas tras las SOG en sujetos sanos, aunque con valores muy variables (entre 140 y 210 mg/dl) al existir poca uniformidad entre grupos en cuanto a la cantidad y calidad de la grasa administrada y la variación en las características fenotípicas de los pacientes estudiados ^{172, 173,102}.

En nuestro estudio, los pacientes con HF presentaban mayor nivel de trigliceridemia en ayunas que los controles. Esto podría atribuirse a la mayor edad media en el grupo de sujetos HF, aunque estudios previos con grandes cohortes también han descrito niveles elevados de triglicéridos y lipoproteínas remanentes en ayunas en sujetos con HF¹⁷⁴.

El AUC de TG fue mayor en el grupo de HF, al partir de unos niveles mayores de TG basales. Sin embargo, no hubo diferencias en el diferencial del área bajo la curva de ambos grupos. Así pues, no encontramos una trigliceridemia postprandial patológica en HF comparado con sujetos sanos tras una SOG rica en monoinsaturados. La

trigliceridemia postprandial que medimos refleja el acúmulo en plasma de lipoproteínas como QM, VLDL y sus remanentes. Múltiples estudios han estudiado el metabolismo de los quilomicrones en los pacientes con HF tras una SOG con diversos métodos de marcado, para comprobar si las mutaciones en el *LDLR* disminuyen el metabolismo de estas lipoproteínas. Los resultados son discordantes, con evidencias a favor^{102,106} y en contra^{107,108} de la participación del *LDLR* en el catabolismo de los quilomicrones remanentes. En nuestro estudio no medimos apo B-48 ni se realizó un análisis de las lipoproteínas en cuanto a fracciones, tamaño o composición, por lo que no podemos afirmar que no exista una alteración de la lipemia postprandial en pacientes HF. Los mismos estudios que objetivan un aclaramiento retrasado de los QM remanentes en pacientes HF, tampoco encuentran diferencias en las áreas bajo la curva de los triglicéridos postprandiales comparadas con controles¹⁰²; la trigliceridemia postprandial depende tanto de la lipólisis de los TG como del catabolismo de las lipoproteínas; se sugiere que existiría un aclaramiento postprandial normal de los QM y su paso a QM remanentes, si bien se acumularían las partículas remanentes.

En los pacientes HF, la variabilidad en los niveles de TG postprandiales fue alta, como reflejan las desviaciones estándar de las medias de TG en cada punto de SOG. Otros autores también han mostrado esta variabilidad¹⁷⁵. En el estudio de Kolovou et al¹⁷⁶, en 14 pacientes con HF heterocigota a los que se administraba una comida de prueba, la mitad de los pacientes presentaba una respuesta anormal de TG (definida como haber superado la trigliceridemia máxima alcanzada en los pacientes control en cualquier punto de la SOG), mientras que el 50% restante tenía una respuesta similar al grupo control.

3. Estrés oxidativo.

Los pacientes HF presentan un mayor nivel de EO en situación de ayuno que el grupo control en todos los parámetros analizados. Encontramos aumentos significativos de isoprostanos y 8-oxo-dG urinarios, MDA, LDLox y GSSG plasmáticos y descenso de GSH plasmáticos. Los resultados son acordes con estudios previos, que describían aumentos significativos de los niveles de isoprostanos o MDA plasmáticos en pacientes HF comparado con controles sanos^{64,177}. Nuestro estudio además aporta nuevas alteraciones en la peroxidación lipídica y en el sistema glutatión en los pacientes HF sin enfermedad cardiovascular clínica.

Efe y cols¹⁷⁸, objetivaron una actividad reducida de la GPX en los neutrófilos de pacientes dislipémicos; se sugería que el descenso en la actividad de las enzimas antioxidantes en estos pacientes, conducía a una insuficiente detoxificación de radicales libres producidos en éstas células y contribuía a la peroxidación lipídica. Nuestro grupo comparó la producción de radicales libres entre pacientes HF y controles sanos a nivel preprandial¹⁷⁹. Se analizaron la actividad plasmática de xantín-oxidasa y los niveles de GSH y GSSG linfo-monocitos circulantes. Los pacientes con HF mostraban mayor actividad de xantín-oxidasa así como niveles incrementados de GSSG y disminuidos de GSH con respecto al grupo control. En cuanto al estado antioxidante, también se midieron actividades de SOD, CAT y GPX en linfo-monocitos circulantes sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos. Estos datos reflejan la alteración en la regulación del EO en la HF y la ausencia de una respuesta antioxidante adecuada en linfo-monocitos circulantes, importantes mediadores en el desarrollo de la AT.

Tras la SOG rica en monoinsaturados, en ambos grupos, se produce un descenso progresivo en del cociente GSSG/GSH al producirse un descenso del glutatión oxidado plasmático con aumento del reducido. Lo más llamativo es que la mejoría es mayor en el grupo HF: presentan mayores incrementos del GSH y descensos del GSSG que el grupo control. Los mismos resultados se obtienen con la reducción en la concentración de MDA, siendo superior en el grupo HF a partir de las 6 y 8 horas. Todo esto abre la hipótesis de que ante estímulos adecuados, como fue en nuestro caso la ingesta de grasa con predominio de ácidos grasos monoinsaturados, se activen unos mecanismos antioxidantes conservados en los pacientes HF y mejore el nivel de EO alterado basalmente. A pesar de estos mayores descensos en los parámetros de oxidación en grupo HF, a las 8 horas no alcanzan en ningún caso normalidad, determinada por las concentraciones del grupo control.

Estudios previos de sobrecarga oral grasa en sujetos sanos han mostrado diferentes resultados sobre los parámetros de estrés oxidativo en función del tipo de grasa utilizada. El grupo de Castro-Cabezas¹²⁰ demostró que tras una ingesta rica en grasa saturada utilizando un preparado de nata (cociente poliinsaturados/saturados 0,10%) y a una dosis de 50 g de grasa por m² de superficie corporal, se producía un aumento significativo en la producción de ROS, determinado por la concentración de hidroperóxidos en plasma. Éstos cambios también se producían tras una sobrecarga de glucosa y una comida mixta de grasa y glucosa, pero no tras la ingesta de agua,

descartando así un ritmo circadiano en la variación de éste parámetro. Tsai y cols¹⁴⁵, utilizaron una comida de prueba rica en grasa con 878 Kcal que contenía 50 g de grasa (con 14 g de grasa saturada y 225 mg de colesterol) y determinaron la concentración de GPX plasmática y la excreción urinaria de 8-PGF2 α durante 6 horas tras la ingesta. Objetivaron un descenso significativo en los niveles de GPX a las 2 horas con aumento significativo en la excreción de 8-PGF2 α a las 4 horas tras la comida. A diferencia de estos estudios, otros grupos han utilizado comidas de prueba ricas en ácidos grasos mono y poliinsaturados. Cortés y cols¹⁴⁶, estudiaron el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (n-3) sobre parámetros oxidación en sujetos sanos y en pacientes con hipercolesterolemia moderada (niveles cLDL 173 \pm 22 mg/dl). Emplearon comidas de prueba (1200 Kcal totales con 80 gramos de grasa, de la cual el 35% era saturada y con 120 mg de colesterol) a las que se añadían 25 ml de aceite de oliva, ó bien, 40 g de nueces. En ambos grupos se observaron descensos en las LDLox y sin objetivar cambios en los niveles de ADMA. Por último, el grupo de Lopez Miranda y cols¹⁸⁰, demostró que, tras un periodo de 4 semanas de una dieta rica en AGMI, existía una mayor biodisponibilidad de nitratos, que comparado con dietas ricas en AGS o dietas con bajo contenido graso enriquecidas en ácido α -linolénico. Además, en este grupo y tras un desayuno de prueba rico en AGMI, la biodisponibilidad de NO continuaba siendo superior y la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio era mayor que en los otros grupos. Este estudio refleja la posible influencia positiva de los AGMI junto con su contenido en polifenoles, en la actividad de la NOS y su efecto beneficioso en la protección cardiovascular. Posteriormente, este mismo grupo y en población anciana¹⁸¹, demostró que la dieta mediterránea y el desayuno de prueba ricos en AGMI descendía en periodo postprandial la actividad de GPx y los niveles plasmáticos de peróxidos lipídicos, nitrotirosina y LDLox frente a una ingesta rica en AGS.

En nuestro estudio, los efectos beneficiosos observados en la oxidación sistémica los atribuimos al contenido predominante de AGMI de nuestra SOG, ya que no contenía polifenoles ni otros compuestos antioxidantes característicos del aceite de oliva virgen empleado en los estudios anteriormente citados. Tanto estudios in vitro¹⁸² como de intervención dietética¹⁸³ con aceite de oliva virgen han atribuido los beneficios antioxidantes a su contenido en polifenoles. Sin embargo, en amplios estudios de intervención aleatorizados y multicéntricos¹⁸⁴, el consumo de aceite de oliva ha disminuido significativamente el nivel de EO (excreción urinaria de 8-oxo-dG) y el

efecto ha sido independiente del contenido en compuestos fenólicos y sí relacionado con el contenido en AGMI.

Así pues, hemos objetivado un efecto beneficioso sobre el EO con la ingesta de un preparado de grasa con predominio de AGMI y sin antioxidantes en sujetos sanos, y un beneficio incluso mayor en sujetos HF, que presentaban un EO alterado basalmente.

4. Inflamación.

A diferencia de los parámetros de oxidación, los marcadores de inflamación seleccionados en este estudio no muestran diferencias en ayunas entre ambos grupos con la excepción de la eotaxina, cuyo nivel es significativamente superior en los HF. En general, los niveles basales de las citocinas proinflamatorias (IL1 β , IL6, IL8, IFN γ) son superiores en los pacientes HF, pero no alcanzan la significación estadística; posiblemente para esto necesitásemos una muestra mayor. En un estudio previo¹⁸⁵, con mayor número de sujetos (30 pacientes HF y 30 sujetos controles), nuestro grupo demostró que existían niveles más elevados de marcadores de inflamación de bajo grado en plasma (IL 1, IL6 y PCRas) y mayor actividad de NF-kB en células mononucleares circulantes en los sujetos con HF.

Durante el periodo postprandial, los cambios más significativos continúan siendo en la eotaxina. Los sujetos HF presentan incrementos negativos postprandiales a diferencia de los sujetos control, que no presentan cambios. El diferencial del AUC experimenta un mayor descenso en el grupo HF. Esto refleja un mayor beneficio en los pacientes HF tras el consumo de AGMI en los niveles de eotaxina, si bien a las 8 horas no se alcanzan los valores de normalidad determinados por el grupo control.

TNF α es una de las citocinas proinflamatorias más importantes que juega un papel fundamental en la activación de las células inflamatorias, la expresión genética de varias citocinas proinflamatorias y la activación de NF-kB. Tras la SOG, en ambos grupos se objetivan incrementos negativos significativos respecto a los niveles basales, sin existir diferencias entre ellos. Ambos grupos reducen así los niveles de esta citokina proinflamatoria. También objetivamos en ambos grupos reducciones con respecto al nivel basal de IL1 β , IFN γ y MCP-1, sin alcanzar la significación estadística (figuras 28, 31 y 33). Únicamente, la IL-6 aumenta significativamente tras la SOG en ambos grupos, tanto a las 6 como a las 8 horas. También en los pacientes HF objetivamos incrementos

significativos para IL-8 a las 4 horas, si bien sus niveles descienden significativamente a las 8 horas.

Así pues, en general y con la excepción de la IL-6, objetivamos en ambos grupos una mejoría en los parámetros inflamatorios tras la ingesta de grasa rica en AGMI.

Estudios in vitro con células endoteliales expuestas a ácidos grasos con diferente grado de saturación han demostrado que el ácido oleico no activa el endotelio; mientras que los AGS y AGPI n-6 descienden los niveles de glutatión, activan el factor transcripcional NF-kB y, en el caso de los n-6, aumentan la producción de IL-6 mediada por TNF α ¹⁸⁶. Se demuestra que el ácido oleico puede inhibir y regular a la baja la activación endotelial y la respuesta inflamatoria. Esto se ha comprobado también en un estudio de intervención dietética con sujetos sanos. La ingesta de una comida rica en aceite de oliva no indujo la activación postprandial de NF-kB, que sí se activó tras ingestas ricas en mantequilla o nueces¹⁸⁷. Este mismo grupo ha estudiado la expresión postprandial de ARN mensajero (ARNm) de las citocinas proinflamatorias en células sanguíneas mononucleares¹⁸⁸; observaron que un desayuno rico en mantequilla induce la expresión postprandial de TNF α comparado con un desayuno rico en aceite de oliva o nueces. Además, hubo una mayor respuesta postprandial del ARNm de IL-6 por orden decreciente con los desayunos ricos en AGS>AGMI >AGPI n3.

Biológicamente, TNF α actúa como un desencadenante de la producción de citocinas. Un gran número de agentes reguladores, incluyendo glucocorticoides, proteínas de fase aguda, eicosanoides y receptores solubles, limitan la producción de TNF α . Los lípidos han demostrado ser unos potentes moduladores de la inflamación, ya que un buen número de los compuestos moduladores anteriormente citados provienen de la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana. En nuestro estudio, hemos visto que el perfil dietético de ácidos grasos utilizado ha sido beneficioso, mejorando los marcadores de inflamación sistémica tanto en sujetos sanos como en pacientes con alto riesgo cardiovascular. El análisis de nuestros datos parece sugerir que la ingesta de aceites ricos en AGMI en pacientes con alto riesgo cardiovascular como la HF, puede ser incluso más beneficiosa en la prevención primaria y secundaria de la enfermedad cardiovascular que en la población sana.

VI. CONCLUSIONES.

VI. CONCLUSIONES.

- 1. La SOG empleada en nuestro estudio, rica en ácidos grasos monoinsaturados, mejoró los parámetros de EO y marcadores de inflamación, a pesar de la elevación de la trigliceridemia.**
- 2. Comparados con los controles, los sujetos HF mostraron un mayor nivel de marcadores de inflamación y oxidación tanto a nivel basal como en el periodo postprandial.**
- 3. La mejoría en el perfil de EO e inflamación en los sujetos HF fue superior a la observada en controles, aunque sin llegar a normalizarse. Probablemente esto sea debido a que sus defensas antioxidantes funcionan adecuadamente cuando se administran los estímulos apropiados.**
- 4. La idea general de que una comida rica en grasa aumenta las lipoproteínas ricas en triglicéridos y altera la función endotelial a través del aumento de inflamación y oxidación sistémica debe revisarse, teniendo en cuenta la variable del perfil de ácidos grasos de la ingesta.**

VII. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Marrugat J, Medrano MJ, Tresserras R. La cardiopatía isquémica como causa principal de muerte en España: realidad epidemiológica, necesidades asistenciales y de investigación. *Clin Invest Arterioscl* 2001;13:262-270.
2. Badimón JJ, Badimón L, Fuster V. Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria. *Clin Invest Arterioscl* 2002;14:258-271.
3. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
4. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge M. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:29-38.
5. Ose L. An update on familial hypercholesterolaemia. *Ann Med* 1999;31:13-8.
6. Scientific Steerin committee (SSC) on behalf of the Simon Broome Register Group. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolemia. *BMJ* 1991;303:893.
7. Defesche J. Familial hypercholesterolemia. In: Betteridge J, editor. *Lipids and vascular disease*, vol. 6. London: Martin Dunitz; 2000. p. 65-76.
8. Real JT, Chaves FJ, Ejarque I. Influence of LDL receptor gene mutations and the R3500Q mutation of the apolipoprotein B gene on lipoprotein phenotype of familial hypercholesterolemic patients from a south European population. *Eur J Hum Genet* 2003;11:959-965.
9. Hobbs H, Brown MS, Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* 1992;1:445-66.
10. Sun XM, Neuwirth C, Pateel DD, Knight BL, Soutar AK, with the Familial Hypercholesterolemia Regression Study Group. Influence of genotype at the low density lipoprotein receptor gene locus on the clinical phenotype and response to lipid lowering drug therapy in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1998;136:175-85.
11. Hoeg JM. Homozygous familial hypercholesterolemia: a paradigm for phenotypic variation. *Am J Cardiol* 1993;72:11D-14D.
12. Volh Mc, Gaudet D, Moorjani S, Tremblay G, Perron P et al. Comparison of the effect of two low-density lipoprotein receptor class mutations on coronary heart disease among French-Canadian patients heterozygous for familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Invest* 1997;27:366-73.

13. Gudanson V, Day INM, Humphries SE. Effect on plasma lipid levels of different classes of mutations in the low-density hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1994;17:1717-22.
14. Leren TP, Hjermann I. Is responsiveness to lovastatin in familial hypercholesterolaemia influenced by the specific mutation in the low density lipoprotein receptor gene?. *Eur J Clin Invest* 1995;25:967-73.
15. Chaves FJ, Real JT, García-García AB, Puig O, Ordovas JM, Ascaso JF, Carmena R, Armengod ME. Large rearrangements of the LDL receptor gene and lipid profile in a FH Spanish population. *Eur J Clin Invest* 2001;31:309-317.
16. Real JT, Ascaso JF, Chaves FJ. Asociación de factores lipídicos, genotipo apo E y tipos de mutación del gen del receptor de LDL con el infarto agudo de miocardio en sujetos con hipercolesterolemia familiar heterocigota. *Med Clin* 2002;118: 681-685.
17. Real JT, Chaves FJ, Martínez-Usó I, García-García AB, Ascaso JF, Carmena R. Importance of HDL cholesterol levels and the total/HDL cholesterol ratio as a risk factor for coronary heart disease in molecularly defined heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2001;22:465-471.
18. Cleghorn CL, Skeaf CM, Mann J, Chisholm A. Plant sterol-enriched spread enhances the cholesterol-lowering potential of fat-reduced diet. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:170-6.
19. Amundsen AL, Ose L, Nenseter MS, Ntanios F. Plant sterol ester-enriched spread lowers plasma total and LDL cholesterol in children with familial hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 2002;76:338-44.
20. de Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Slen P, Martín JL, Monjaud I, et al. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 1994;343:1454-9.
21. Perez-Jimenez F, Lopez-Miranda J, Mata P. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis* 2002;163:385-98.
22. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*. 1997;11:118-124.
23. Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:274-278.
24. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231-255.

25. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29-38.
26. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species. Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1988-96.
27. Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:274-278.
28. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-623.
29. Steinberg D . Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997;272:20963-20966.
30. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2008;153: 6-20.
31. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*. 1997;272:20963–20966.
32. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horiguchi H, Shinno K, Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1649–1654.
33. Tsimikas S, Witztum JL. Measuring circulating oxidized low-density lipoprotein to evaluate coronary risk. *Circulation*. 2001;103:1930–1932.
34. Avogaro P, Bon GB, Cazzolato G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. *Arteriosclerosis*. 1988;8:79–87.
35. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, Collen D, Muls E, Van de Werf F. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:844–848.
36. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;103: 955–1560.
37. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: 1162–1167.

38. Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;36:1-21.
39. Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*1997; 17:2309-2315.
40. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest.*1992; 90:136-141.
41. Kunapuli P, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Functional characterization of the ocular prostaglandin F₂ (PGF₂) receptor. Activation by the isoprostane 12-iso-PGF₂. *J Biol Chem.* 1997;272:27147-27154.
42. Lynch SM, Morrow JD, Roberts LJ, Frei B. Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. *J Clin Invest.* 1994; 93: 998-1004.
43. Fontana L, Giagulli C, Cominacini L, Pasini AF, Minuz P, Lechi A, Sala A, Laudanna C. β_2 Integrin-dependent neutrophil adhesion induced by minimally modified low-density lipoproteins is mainly mediated by F₂-isoprostanes. *Circulation.* 2002;106:2434-2441.
44. Davì G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F₂ and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation.* 1999;99:224–229.
45. Aviram M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic. Res.* 2000;33:S85–97.
46. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:9697–9701.
47. Kanauchi M., Nishioka H., Hashimoto T. Oxidative DNA damage and tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy. *Nephron.* 2002;91:327–329.
48. Akagi S, Nagake Y, Kasahara J, Sarai A, Kihara T, Morimoto H, Yano A, Nakao K, Nanba K, Ichikawa H, Makino H. Significance of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in patients with chronic renal failure. *Nephrology. (Carlton).* 2003;8:192–195.

49. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OhdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*. 2004;339:1-9.
50. Hicks JJ, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas MP. Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr*. 2006; 14: 223-226.
51. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-1478.
52. Franco R, Schoneveld OJ, Pappa A, Panayiotidis MI. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113:234-258.
53. Valencia E, Marin A, Hardy G. Glutathione-nutritional and pharmacologic viewpoints: part I. *Nutrition* 2001;17:428-439.
54. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-844.
55. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 2004;44:381-386
56. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalow S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager J.. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium –dependent vasodilatation. *Circulation*. 2003;107:1383-1389.
57. Szöcs K, Lassègue B, Sorescu D, Hilenski LL, Valppu L, Couse L. Upregulation of Nox-based NAD(P)H oxidases in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:21-27.
58. Landmesser U, Merten R, Spiekermann S, Buttner K, Drexler H, Horning B. Vascular extracellular superoxide dismutase activity in patients coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2000;101:2264-2270.
59. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2003;349:1605-1613.
60. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97:1930-1934.
61. Ludwig PW, Hunninghake DB, Hoidal JR. Increased leucocyte oxidative metabolism in hyperlipoproteinaemia. *Lancet*. 1982;2:348–350.
62. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F2 is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3230–3235.

63. Reilly MP, Pratico D, Delanty N. Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:2822–2828.
64. Nourooz-Zadeh J, Smith CCT, Betteridge DJ. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2001;156:435–441.
65. Cracowski JL, Ploin D, Bessard J, Baguet JP, Stanke-Labesque F, Mallion JM, Bost M, Bessard G. Formation of isoprostanes in children with type IIa hipercolesterolemia. *J Cardiovasc Pharmacol.*2001, 38:228-231.
66. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868 –874.
67. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF- κ B controls the global proinflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a proatherogenic program. *NAR.* 2005;33:5308-5319.
68. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond).* 2009;116:219-230.
69. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2137-2142.
70. Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, Gijbels MJ, de Winther MP, Havekes LM, van Vlijmen BJ. Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2005;66:179-185.
71. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin- β decreases the severity of atherosclerosis in Apo E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:656-660.
72. Chi H, Messas E, Levine RA, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a highfat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation.* 2004;110:1678–1685.
73. Paoletti R, Gotto AM, Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* 2004;109[suppl III]:III20-26.
74. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 2003;108:2317-2322.
75. Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;169:203-214.

76. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2364-2367.
77. Song L, Schindler C. IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;177:43-51.
78. Schieffer B, Selle T, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:3493-3500.
79. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;24:2063-2069.
80. Emanuele E, Falcone C, D'Angelo A, Minoretti P. Association of plasma eotaxin levels with the presence and extent of angiographic coronary artery disease. *Atheroscler*. 2006; 186:140-145.
81. Jager S, Kraaijeveld J, Grauss RW, de Jager W, et al. CCL3 (MIP-1 α) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. *J Molec Cell Cardiol*. 2008;45: 446-452
82. Ottestad IO, Halvorsen B, Balstad TR, Otterdal K, Borge GI, Brosstad F, Myhre AM, Ose L, Nenseter MS, Holven KB. Triglyceride-rich HDL3 from patients with familial hypercholesterolemia are less able to inhibit cytokine release or to promote cholesterol efflux. *J Nutr*. 2006;136:877-881.
83. Ureland T, Vissers MN, Wiegman A. Increased inflammatory markers in children with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2006; 36:147-152.
84. Charakida M, Tousoulis D, Skoumas I, Pitsavos C, Vasiliadou C, Stefanadi E, Antoniadou C, Latsios G, Siasos G, Stefanadis C. Inflammatory and thrombotic processes are associated with vascular dysfunction in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2009;204:532-537.
85. van Wissen S, Trip M, Smilde TJ, de Graaf J, Stalenhoef A, Kastelein J. Differential hs-CRP reduction in patients with familial hypercholesterolemia treated with aggressive or conventional statin therapy. *Atherosclerosis* 2002;165: 361-366.
86. Baldassarre D, De Jong A, Amato M, Werba JP, Castelnuovo S, Frigerio B, Veglia F, Tremoli E, Sirtori CR. Carotid intima-media thickness and markers of inflammation, endothelial damage and hemostasis. *Ann Med*. 2008;40:21-44.

87. Watts GF. Postprandial lipaemia in familial hypercholesterolaemia: clinical and metabolic significance. *Atherosclerosis* 2000;148:426-428.
88. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A, Frenneaux MP. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001;154:475-483.
89. Karpe F, Tornvall P, Olivecrona T. Composition of human low density lipoprotein: effects of postprandial triglyceride-rich lipoproteins, lipoprotein lipase, hepatic lipase and cholesteryl ester transfer protein. *Atherosclerosis* 1993;98:33-49.
90. Castro Cabezas M, de Bruin TWA, Kock LAW, de Bruin TW. Postprandial apolipoprotein B100 and apo B48 in familial combined hyperlipemia before and after reduction of fasting plasma triglycerides. *Eur J Clin Invest* 1994;24:669-678.
91. Havel RJ. Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Curr Opin Lipidol* 1995;6:312-316.
92. Mahley RW, Hui DY, Innerarity TL, Beisiegel U. Chylomicron remnant metabolism: role of hepatic liprotein receptors in mediating uptake. *Arteriosclerosis* 1989; 19(suppl):114-118.
93. Hussain MM, Maxfield FR, Más-Olivas J, Tabas I, Ji Z-S, Innerarity TL, Mahley RW. Clearance of chylomicron remnants by the low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 1991;266:13936-13940.
94. Van Dijk MCM, Ziere GJ, boers W, Linthorts C, Bijsterbosch MK, van Berkel TJC. Recognition of chylomicron remnants and β -migrating very-low-density lipoproteins by the remnant receptor of parenchymal liver cells is distinct from the liver α 2-macroglobulin-recognition site. *Biochem J* 1991;279:863-870.
95. Windleer E, Greeve J, Levkau B, Kolb-Bachofen V, Daerr W, Greten H. The human asialoglycoprotein receptor is a possible binding site for low-density lipoproteins and chylomicron remnants. *Biochem J* 1991;276:79-87.
96. Mann CJ, Khallou J, Chevreuril O, Troussard A, Guermani LM, Lunay K et al. Mechanism of activation and functional significance of the lipolysis-stimulated receptor: evidence for a role as chylomicron remnant receptor. *Biochem J* 1995;34:10421-10431.
97. Jäckle S, Rinninger F, Greeve J, Greten H, Windler E. Regulation of the hepatic removal of chylomicron remnants and β -very low density lipoproteins in the rat. *J Lipid Res* 1992; 33:419-29.

98. Niemeier A, Garringfuels M, Heeren J, Angelin B, Beisiegel U. VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res* 1996;37:1733-1742.
99. Kowal RC, Herz J, Goldstein JL, Esser V, Brown MS. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesterol esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5810-5814.
100. Innerarity TL, Pitas RE, Mahley RW. Binding of arginine-rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptor of fibroblasts. *J Biol Chem* 1979;254:4186-4190.
101. Kowal RC, Herz J, Wisgraber KH, Mahley RW, Brown MS, Goldstein JL. Opposing effects of apolipoproteins E and C on lipoprotein binding to low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1990;265:10771-10779.
102. Castro-Cabezas M, de Bruin TWA, Wsterveld HE, Meijer E, Erkelens DW. Delayed chylomicron remnant clearance in subjects with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *J Int Med* 1998;244:299-307.
103. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984;25:1277-1294.
104. Kita T, Goldstein JL, Brown MS. Hepatic uptake of chylomicron remnants in WHHL rabbits: a mechanism genetically distinct from the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982;79:3623-3627.
105. Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Oruga J, Shimada M, Oaci K. Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem* 1996;271:22422-22427.
106. Mamo JCL, Smith D, Yu JCW. Accumulation of chylomicron remnants in homozygous subjects with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 1998;28:379-384.
107. Eriksson M, Angelin B, Henriksson P, Ericsson S, Vitols S, Berglund L. Metabolism of lipoprotein remnants in humans. Studies during intestinal infusion of fat and cholesterol in subjects with varying expression of the low density lipoprotein receptor. *Arterioscler Thromb* 1991;11:827-837.
108. Tremblay AJ, Lamarche B, Ruel I, Hogue JC, Bergeron J, Gagné C, Couture P. Lack of evidencia for reduced plasma apo B48 catabolism in patients with heterozygous

familial hypercholesterolemia carrying the same null LDL receptor gene mutation. *Atherosclerosis* 2004;172: 367-373.

109. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 1998;81:7B-12B.

110. Castelli WP. Epidemiology of triglycerides: a view from Framingham. *Am J Cardiol*. 1992;70(suppl):3H-9H.

111. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglycerides is a risk factor for cardiovascular disease independent of HDL cholesterol, a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*. 1996;3:213-219.

112. Van Wijk JPH, Buirma R, van Tol A, Halkes CJM, De Jaegere PPTH, Plokker HWM, van der Helm YJM, Castro Cabezas M. Effects of increasing doses of simvastatin on fasting lipoprotein subfractions, and the effect of high-dose simvastatin on postprandial chylomicron remnant clearance in normotriglyceridemic patients with premature coronary sclerosis. *Atherosclerosis* 2005;178:147-155.

113. Zilvermit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979; 60:473-485.

114. Bouquist S, Routolo G, Tang R. Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation*. 1999;100:723-728.

115. Speidel MT, Booyse FM, Abrams A. Lipolyzed hypertriglyceridemic serum and triglyceride-rich lipoprotein cause lipid accumulation in and are cytotoxic to cultured human endothelial cells. High density lipoproteins inhibit this cytotoxicity. *Thromb Res*. 1990;58:251-264.

116. Stampfer MJ, Krauss RM, Ma J. A prospective study of triglyceride level, low-density lipoprotein particle diameter, and risk of myocardial infarction. *JAMA* 1996;276:882-888.

117. Bansal S, Buring JE, Rifai N. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 2007;298:309-316.

118. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298:299-308.

119. Jagla A, Schrezenmeir J. Postprandial triglycerides and endothelial function. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2001;109:S533-547.

120. van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Konin EJ, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 2003;44:576-583.
121. Van Oostrom, AJ Rabelink, TJ Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HWM, de Jaegere PPTH, Castro Cabezas M. *Atherosclerosis* 2004;177:175-182.
122. Van Oostrom AJHHM, Plokker HWM, van Asbeck BS, Rabelink TJ, van Kessel K, Jansen EHJM, Stehouwer CDA, Castro Cabezas M. *Atherosclerosis* 2006;185:331-339.
123. Alipour A, van Oostrom AJHHM, Izraelijan A, Collins JM, Frayn KN, Eite JWF, Castro-Cabezas M. *Circulation* 2006;114:S1741.
124. Burdge GC, Calder PC. Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease?. *Br J Nutr.* 2005;93:3-9.
125. Alipour A, Elte JWF, van Zaanen HCT, Rietveld AP, Castro-Cabezas M. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl.* 2008;9:39-44.
126. Moers A, Fenselau S, Scherzenmeir J. Chylomicrons induce E-selectin and VCAM-1 expression in endothelial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105:35-37.
127. Botham KM, Bravo E, Elliot J, Wheeler-Jones CP. Direct interaction of dietary lipids carried in chylomicron remnants with cells of the artery wall: implications for atherosclerosis development. *Curr Pharm Des* 2005;11:2681-3695.
128. Doi H, Kigiyama K, Ohgushi M, Sugiyama S, Matsumara T, Ohta Y, Nakano T, Nakajima K, Yasue H. *Atherosclerosis* 1998;137:341-349.
129. Grieve DJ, Avella MA, Botham KM, Elliott J. Effects of chylomicrons and chylomicron remnants on endothelium-dependent relaxation of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 1998;348:181-190.
130. Kusterer K, Pohl T, Fortmeyer HP, März W, Scharnagl H, Oldenburg A, Angermüller S, Fleming I, Usadel KH, Busse R. Chronic selective hypertriglyceridemia impairs endothelium-dependent vasodilatation in rats. *Cardiovasc Res J.* 1999;42: 783-793.
131. de Koning EJ, Rabelink TJ. Endothelial function in the post-prandial state. *Atheroscler Suppl.* 2002;3:11-16.
132. Castro Cabezas M. Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1090-1093.

133. Patsch JR, Miesenboch G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn JK. Relation of triglyceride metabolism and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb* 1992;12: 1336-1345.
134. Benlian P, De Gennes PL, Foubert L, Zhang H, Gagne SE, Hayden M. Premature atherosclerosis in patients with familial chylomicronemia caused by mutations in the lipoprotein lipase gene. *New Engl J Med* 1996; 335: 848-854.
135. Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000; 11: 451-456.
136. Pal S, Semorine K, Watts GF, Mamo J. Identification of lipoproteins of intestinal origin in human atherosclerotic plaque. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 792-795.
137. Yu KC, Mamo JCL. Chylomicron-remnant-induced foam cell formation and cytotoxicity: a possible mechanism of cell death in atherosclerosis. *Clin Sci* 2000;98:183-192.
138. Batt KV, Patel L, Botham KM, Suckling KE. Chylomicron remnants and oxidised low density lipoprotein have differential effects on the expression of mRNA for genes involved in human macrophage foam cell formation. *J Mol Med* 2004;82:449-458.
139. Libby P. Fat fuels the flame. *Circ Res.* 2007;100:299-301.
140. Trevisan M, Krogh V, Freudenheim J, Blake A, Muti P, Panico S, Farinaro E, Mancini M, Menotti A, Ricci G. Consumption of olive oil, butter, and vegetable oils and coronary heart disease risk factors. The Research Group ATS-RF2 of the Italian National Research Council. *JAMA.* 1990;263:688-692.
141. Fitó M, Guxens M, Corella D, Sáez G. Effect of a traditional mediterranean diet on lipoprotein oxidation. *Arch Intern Med.* 2007;167:1195-1203.
142. Salas-Salvadó J, Garcia-Arellano A, Estruch R, Marquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M. Components of the mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:651-659.
143. Nappo F, Esposito K, Cioffi M, Giugliano G. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *JACC* 2002; 39:1145–1150.
144. Van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Versyden C, Sijmonsma TP. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 2004;177:175-182.

145. Tsai W, Li Y, Lin CC, Chao TH, Chen JH. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clin Sci* 2004;106:315-319.
146. Cortés B, Núñez I, Cofán M, Gilabert R, Ros E. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1666-1671.
147. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-475.
148. Burstein M, Scholnick HR, Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res.* 1970;11:583-595.
149. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
150. Rosseneu M, Vercaemst R, Steinberg KK, Cooper GR. Some considerations of methodology and standardization of apolipoprotein B immunoassays. *Clin Chem* 1983;29:427-33.
151. Brigelius R, Muckel C, Akerboom TPM, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relation to glutathione disulfides. *Biochem Pharmacol.* 1983;32: 2529–2534.
152. Navarro J, Obrador E, Pellicer JA, Asensi M, Viña J, Estrela JM. Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radic Biol Med.* 1997;22:1203–1209.
153. Wong SHY, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN Jr, Sunderman FW Jr. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem.*1987;33:214–220.
154. Garcia-Garcia AB, Blesa S, Martínez-Hervás S, Mansego ML, Gonzalez-Albert V, Ascaso JF, Carmena R, Real JT, Chaves FJ. Semiquantitative multiplex PCR: a useful tool for large rearrangement screening and characterization. *Hum Mutat* 2006;27:822-828.
155. Blesa S, Vernia S, Garcia-Garcia AB, Martínez-Hervás S, Ivorra C, Gonzalez-Albert V, Ascaso JF, Martín-Escudero JC, Real JT, Carmena R, Casado M, Chaves FJ. A new PCSK9 gene promoter variant affects gene expression and causes autosomal dominant hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:3577-3583.

156. Van Beek AP, de Ruijter-Heijstek FC, Erkelens DW, de Bruin TW. Menopause is associated with reduced protection from postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2737-2741.
157. Boquist S, Hamsten A, Karpe F, Ruotolo G. Insulin and non-sterified fatty acid relations to alimentary lipaemia and plasma concentrations of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy middle-aged men. *Diabetologia* 2000, 43;185-193.
158. Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhoy MY, Coulston AM, Jones C, Chen YD, Reaven GM. Relation between insulin resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma lipoprotein lipase activity and postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:320-324.
159. Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med* 1999;246:341-355.
160. Lopez Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr.* 2007;98:458-473.
161. Axelsen M, Eliasson B, Joheim E, Lenner RA, Taskinen MR, Smith U. Lipid intolerance in smokers. *J Intern Med* 1995;237:449-455.
162. Fielding BA, Reid G, Grady M, Humphreys SM, Evans K, Frayn KN. Ethanol with a mixed meal increases postprandial triacylglycerol but decreases postprandial non-esterified fatty acid concentrations. *Br J Nutr* 2000;83:597-604.
163. Pownall HJ, Ballantyne CM, Kimball KT, Simpson SL, Yeshurun D, Gotto AM Jr. Effect of moderate alcohol consumption on hypertriglyceridemia: a study in the fasting state. *Arch Intern Med* 1999;159:981-987.
164. Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1995;36:839-859.
165. Wintraub MS, Eisenber S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest* 1987;80:1571-1577.
166. Lopez-Miranda J, Marin C. Dietary, Physiological, and Genetic Impacts on Postprandial Lipid Metabolism. In: Montmayeur JP, le Coutre J, editors. *Fat detection: taste, texture, and post ingestive effects*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2010. Chapter 17.
167. Sanders TA, de Grassi T, Miller GJ, Morrissey JH. Influence of fatty acid chain length and cis/trans isomerization on postprandial lipemia and factor VI in healthy subjects (postprandial lipids and factor VII). *Atherosclerosis.* 2000;149:413-420.

168. Jackson KG, Robertson MD, fielding BA, Frayn KN, Williams CM. Measurement of apolipoprotein B-48 in the Svedberg flotation rate (S(f)) >400, S(f) 60-400 and S(f) 20-60 lipoprotein fractions reveals novel findings with respect to the effects of dietary fatty acids on triacylglycerol-rich lipoproteins in postmenopausal women. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103:227-237.
169. Black IL, Roche HM, Tully AM, Gibney MJ. Acute-on chronic effects of fatty acids on intestinal triacylglycerol-rich lipoprotein metabolism. *Br J Nutr*. 2002;88:661-669.
170. Roche HM. Dietary carbohydrates and triacylglycerol metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999;58:201-207.
171. Lia A, Andersson H, Mekki N, Juhel C, Senft M, Lairon D. Postprandial lipemia in relation to sterol and fat excretion in ileostomy subjects given oat-bran and wheat test meals. *Am J Clin Nutr*;1997;66:357-365.
172. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Garrido-Sánchez L, Collantes E, Tinahones FJ. Circulating antioxidant defences are decreased in healthy people after a high-fat meal. *Brit J Nutr* 2008;100: 312-316.
173. Uiterwaal CS, Grobbee DE, Witteman JC. Postprandial triglyceride response in young adult men and familial risk for coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1994; 121:576-83.
174. De Sauvage-Nolting PRW, Twickler MB, Dallinga-Thie GM, Buurma RJA, Hutten BA, Kastelein JP. for the Examination of Proband and Relatives in Statin Studies with Familial Hypercholesterolemia (ExPRESS) Study Group. Elevated remnant-like particles in heterozygous familial hypercholesterolemia and response to statin therapy. *Circulation* 2002;106:788-92.
175. Kolovou GD, Kostakou PM, Anagnostopoulou KK. Familial hypercholesterolemia and triglyceride metabolism. *Int J Cardiol*. 2011;147:349-358.
176. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Pilatis ND, Iraklianos S, Housalakis IS, Liberis S. Heterozygote men with familial hypercholesterolemia may have an abnormal triglyceride response post-prandially. Evidence for another predictor of vascular risk in familial hypercholesterolemia. *Int J Clin Pract*, 2005;59:311-317.
177. Pirinccioglu AG, Gökalp D, Pirinccioglu M, Kizil G, Kizil M. Malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl (PCO) levels as biomarkers of oxidative stress in subjects with familial hypercholesterolemia. *Clin Biochem*. 2010;43:1220-1224.

178. Efe H, Deger O, Kirci D, Karahan SC, Örem A, Calapoglu M. Decreased neutrophil antioxidative enzyme activities and increased lipid peroxidation in hyperlipoproteinemic human subjects. *Clin Chim Acta* 1999; 279:155–165.
179. Real JT, Martínez-Hervás S, Tormos MC, Domenech E, Pallardó FV, Sáez-Tormo G, Redon J, Carmena R, Chaves FJ, Ascaso JF, García-García AB. Increased oxidative stress levels and normal antioxidant enzyme activity in circulating mononuclear cells from patients of familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 2010;59:293–298.
180. Fuentes H, López-Miranda J, Pérez-Martínez P, Jiménez Y, Marín C, Gómez P. Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgen olive oil and a low-fat diet enriched with α -linoleic acid on postprandial endothelial function in healthy men. *Br J Nutr* 2008;100:159-165.
181. Yubero-Serrano EM, Delgado-Casado N, Delgado-Lista J, Perez-Martinez P, Tasset-Cuevas I, Santos-Gonzalez M. Postprandial antioxidant effect of the Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women. *Age (Dordr)*. 2010 Dec 18. [Epub ahead of print]
182. Masella R, Vari R, D'Archivio M, Di Benedetto R. Extra virgin olive oil biophenols inhibit cell-mediated oxidation of LDL by increasing the mRNA transcription of glutathione-related enzymes. *J Nutr*. 2004; 134:785–791.
183. Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J. Nutr*. 2004;134: 2314–2321.
184. Machowetzv A, Poulsen HE, Gruendel S, Weimann A, Fito M, Marrugat J. Effect of olive oils on biomarkers of oxidative DNA stress in Northern and Southern Europeans. *FASEB J*. 2007;21:45–52.
185. Real JT, Martínez-Hervás S, García-García AB, Civera M, Pallardó FV, Ascaso JF, Viña JR, Chaves FJ, Carmena R. Circulating mononuclear cells nuclear factor-kappa B activity, plasma xanthine oxidase, and low grade inflammatory markers in adult patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2010;40: 89–94.
186. Hennig B, Meerarani P, Ramadass P, Watkins BA, Toborek M. Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism*. 2000;49:1006-1013.
187. Bellido C, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Pérez-Martínez P, Muriana FJ, Martín-Ventura JL. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1487–91.

188. Jiménez-Gómez Y, López-Miranda J, Blanco-Colio LM, Marín C, Pérez-Martínez P, Ruano J. Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 2009;204:e70-76