



**Universidad de Valencia
Departamento de Medicina**

TESIS DOCTORAL

**“EFECTO DE LA SOBRECARGA ORAL CON GRASA
INSATURADA EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO Y EXPRESIÓN DE ARN DE LINFOMONOCITOS
EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

Juan Caro Ibáñez

Licenciado en Medicina y Cirugía
Especialista en Endocrinología y Nutrición

DIRIGIDA POR:

Prof. D. Juan Francisco Ascaso Gimilio.

Prof. D. José Tomás Real Collado.

Valencia 2016



Universidad de Valencia
Departamento de Medicina
Programa de Medicina 3139 - RD99/2011

TESIS DOCTORAL

**“EFECTO DE LA SOBRECARGA ORAL CON GRASA
INSATURADA EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO Y EXPRESIÓN DE ARN DE LINFOMONOCITOS
EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”**

Juan Caro Ibáñez

Licenciado en Medicina y Cirugía
Especialista en Endocrinología y Nutrición

DIRIGIDA POR:

Prof. Dr. Juan Francisco Ascaso Gimilio.

Prof. Dr. José Tomás Real Collado.

Valencia 2016



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

**D. JUAN FRANCISCO ASCASO GIMILIO. Doctor en Medicina y Cirugia.
Catedrático de Universidad del Departamento de Medicina de la Facultad de
Medicina de la Universidad de Valencia.**

**D. JOSÉ TOMÁS REAL COLLADO. Doctor en Medicina y Cirugia. Profesor
titular de Universidad del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina
de la Universidad de Valencia.**

Informan:

Que el trabajo titulado: “EFECTO DE LA SOBRECARGA ORAL CON GRASA INSATURADA EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y EXPRESIÓN DE ARN DE LINFOMONOCITOS EN SUJETOS CON DIABETES MELLITUS TIPO 2”, presentado por D. Juan Caro Ibáñez para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia, ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne los requisitos necesarios para su presentación y lectura.

Y para que conte la presente en Valencia ade.....de 2016.

Fdo. D. Juan Francisco Ascaso Gimilio

Fdo. D. José Tomás Real Collado

A Ángel

Agradecimientos:

-A mi familia y amigos. En especial a mis padres por la educación recibida. A Raquel y a mis hijos, por aguantar las horas de trabajo con paciencia. Sois el principal motivo por el que trato de ser mejor cada día

- Al profesor D. Rafael Carmena porque gracias a él elegí esta maravillosa especialidad. Siempre me transmitió el rigor y la excelencia en el acto médico.

- Al profesor D. Juan F. Ascaso por su cercanía y su apoyo tanto en los buenos como en los malos momentos.

- Al Dr. José T. Real por enseñarme a pensar como médico. Por motivarme por la investigación y por guiarme en este proyecto. Te admiro como profesional y como persona.

- A Geles y a todo el personal de laboratorio por su colaboración, su disponibilidad y su amabilidad.

- A todas las personas que han hecho posible este trabajo. A todos los adjuntos, residentes, y personal de enfermería del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Sin ellos no hubiera sido posible. Todos han sido parte de mi formación.

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AEC: arteroesclerosis
- AGL: ácidos grasos libres
- AGMI: ácidos grasos monoinsaturados
- AGPI: ácidos grasos poli insaturados
- AGS: ácidos grasos saturados
- ARN: ácido ribonucleico
- ASP: proteína estimulante de la acilación
- CETP: cholesteryl ester transfer protein
- cHDL: colesterol HDL
- cLDL: colesterol LDL
- CLS: síndrome de Coffin-Lowry
- cVLDL: colesterol VLDL
- DM: diabetes mellitus
- ECV: enfermedad cardiovascular
- eNOS: sintetasa de óxido nítrico endotelial
- EO: estrés oxidativo
- GSH: glutatión reducido
- GSSG: glutatión oxidado
- HbA1c: Hemoglobina glicosilada
- HOMA: Homeostasis Model Assessment
- HTA: Hipertensión arterial
- IL: interleucina
- IMC: índice de masa corporal
- IMC: índice de masa corporal
- LCT: triglicéridos de cadena larga
- LPL: lipoproteinlipasa
- LPP: lipemia posprandial
- LRT: lipoproteínas ricas en triglicéridos
- MAPK: Mitogen-activated protein kinases

- MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1
- MDA: malondialdehido
- n-3: ácidos grasos de la serie omega
- n-6: ácidos grasos de la serie omega 6.
- NF- κ β : nuclear factor κ β .
- NO: óxido nítrico
- ONOO-: peroxinitritos
- PAI-1 :inhibidor del activador del plasminógeno-1
- PKC: protein kinasa c
- QM: quilomicrones
- RI: resistência a la insulina
- ROS: reactive oxygen species
- SO-: anión superóxido
- SOD(s): superóxido dismutasa(s)
- SOG: sobrecarga oral grasa
- TA: Tension arterial
- TBARS: thiobarbituric reactive acid substances
- TG: triglicéridos
- TNF α : factor de necrosis tisular α .

Índice

Agradecimientos:.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS	X
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABLAS	XV
1.- Antecedentes	1
1.1.- Arteriosclerosis y el riesgo cardiovascular.....	1
1.2.- Diabetes Mellitus	2
1.3.- Diabetes Mellitus y el riesgo cardiovascular	2
1.4.- Dislipemia diabética y el riesgo cardiovascular	3
1.5.- Lipemia postprandial.....	5
1.6.-Disfuncion endotelial transitoria.	8
1.7.- Estrés oxidativo	9
1.8.- Estrés Oxidativo, sobrecarga oral grasa y Diabetes Mellitus tipo 2.....	10
1.9.- Otros parámetros	14
2.- Hipótesis de trabajo.....	18
3.-Objetivos	19
3.1.-General	19
3.2.-Específicos	19
4.- Sujetos y metodología	20
4.1.- Sujetos	20
4.2.- Métodos.....	22
5.- Análisis estadístico.....	25
5.1.- Diseño	26
5.2.- Procedimiento de intervención.....	26
6.- Resultados	29
6.1.- Comparación de los parámetros analizados en ayunas en el grupo completo:	29
6.2.- Comparación de los parámetros analizados en el grupo completo a nivel.....	34
6.3.- Incrementos de los parámetros analizados en el grupo completo a nivel postprandial: controles frente a DM2.	45
6.4.- Estudio de expresión de genes en linfomonocitos en situación postprandial.	49

7.- Discusión.....	54
7.1.- Evaluación de la muestra	54
7.2.- Selección de pacientes.....	54
7.3.- Evaluación del test de sobrecarga grasa.....	56
7.4.- Evaluación de lipemia basal y postprandial	57
7.5.- Metabolismo glucídico.....	58
7.6.- Estrés oxidativo.....	60
7.7.- Expresión genes implicados	63
8- Conclusiones	68
Referencias bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1.- Lipemia postprandial.....	6
Fig. 2.- Síntesis de Oxido Nítrico.....	11
Fig. 3.- Formación de ONOO y consumo de de NO.....	11
Fig. 4.- Oxidación de acidos grasos libres.....	12
Fig. 5.- Características generales del grupo.....	30
Fig. 6.- Datos bioquímicos en ayunas.....	31
Fig. 7.- Datos oxidación en ayunas.....	32
Fig. 8.- Comparación de los TG durante la SOG.....	34
Fig. 9.- Comparación de la glucemia durante la SOG.....	35
Fig. 10.- Comparación de Insulinemia durante la SOG.....	36
Fig. 11.- Evolución de la HOMA durante la prueba.....	37
Fig. 12.- Comparación de GSSG durante la SOG.....	38
Fig. 13.- Comparación GSH durante la SOG.....	39
Fig. 14.- Comparación MDA durante la SOG.....	41
Fig. 15.- Comparación GSSG/GSH entre ambos grupos durante la SOG.....	41
Fig. 16.- Incremento de triglicéridos.....	42
Fig. 17.- Incremento de glucemia.....	43
Fig. 18.- Incremento de insulina.....	43
Fig. 19.- Incremento de GSSG.....	44
Fig. 20.- Incremento de GSH.....	44
Fig. 21.- Incremento de MDA.....	45
Fig. 22.- Expresión genes basal.....	47
Fig. 23.- Expresión de genes en controles durante la SOG.....	47
Fig. 24.- Expresión de genes en DM2 durante la SOG.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Composición Supracal ^R sabor neutro.....	28
Tabla 2.- Características generales del grupo completo.....	29
Tabla 3.- Datos bioquímicos en ayunas.....	30
Tabla 4.- Datos de oxidación en ayunas.....	32
Tabla 5.- Comparación de valores de triglicéridos obtenidos durante la SOG.....	33
Tabla 6.- Comparación de nivel de glucosa durante la SOG.....	35
Tabla 7.- Comparación de niveles de insulina durante la SOG.....	36
Tabla 8.- Niveles de HOMA durante la realización de la prueba.....	37
Tabla 9.- Comparación de GSSG entre ambos grupos durante la SOG.....	38
Tabla 10.- Comparación de GSH entre ambos grupos durante la SOG.....	39
Tabla 11.- Comparación de MDA entre ambos grupos durante la SOG.....	40
Tabla 12.- Comparación de GSSG/GSH entre ambos grupos durante la SOG.....	41
Tabla 13.- Expresión de genes en situación basal (ayuno).....	46
Tabla 14.- Expresión de genes en el grupo de control durante la SOG.....	47
Tabla 15.- Expresión de genes durante la SOG en pacientes diabéticos.....	48
Tabla 16.- Expresión de genes con mayores diferencias entre grupos en situación basal.....	49
Tabla 17.- Proporción de acidos grasos contenidos en diferentes alimentos.....	53

1.- Antecedentes

1.1.- Arteriosclerosis y el riesgo cardiovascular

La enfermedad cardiovascular (ECV) es muy frecuente en la población general, es responsable de la primera causa de mortalidad en el mundo desarrollado, afectando a la mayoría de los adultos de más de 60 años de edad. (1)

La arteriosclerosis (AEC) es responsable de los casos de ECV. La ECV es causada por una variedad de factores, que a menudo actúan de manera conjunta. Estos factores conducen a un mayor riesgo de placas de ateroma en las arterias coronarias y otros lechos arteriales (2) (3) generando así la progresión de la AEC.

Estos factores causantes de ECV se conocen de diferentes estudios experimentales y epidemiológicos. Entre estos estudios se incluyen los siguientes trabajos poblacionales: el Framingham Heart Study (4), Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT)(5), y el Chicago Heart Association Project(6) and Industry). En estas publicaciones se incluyen a más de 380.000 sujetos, 21.000 de los cuales murieron de enfermedad coronaria. Estos trabajos muestran una clara relación entre valores de colesterol total y cLDL elevados con la incidencia de ECV. Estos grandes estudios concluyen que los principales factores de riesgo cardiovascular son el colesterol total ≥ 240 mg / dl ($\geq 6,22$ mmol / L), presión arterial sistólica ≥ 140 mmHg, presión arterial diastólica ≥ 90 mmHg, el tabaquismo y la diabetes mellitus (DM).

Por tanto la DM, se relaciona como un factor claro de progresión de AEC y de este modo de riesgo cardiovascular.

1.2.- Diabetes Mellitus

El término Diabetes Mellitus (DM) describe varias enfermedades del metabolismo de los carbohidratos, que se caracterizan por la hiperglucemia crónica. Esta enfermedad se debe a un déficit relativo o absoluto en la secreción de insulina, junto con diversos grados de resistencia periférica a la acción de la insulina. Su diagnóstico se basa en una de las cuatro alteraciones siguientes: hemoglobina A1C (HbA1c), la glucemia en ayunas, la glucosa elevada al azar con síntomas, o valores anormales en la prueba de sobrecarga oral de glucosa. (7)(8)

La DM es un problema creciente de salud pública en todo el mundo. En el año 2003, afectaba a 194 millones de personas en el mundo, y se espera que esta cifra se duplique en una sola generación, hasta llegar a los más de 330 millones en el año 2025 (9). En los EEUU entre 1976 y 1988, la prevalencia entre personas de 40-74 años, ascendió del 11,4% al 14,3%(10). En España disponemos actualmente de datos validados acerca de la prevalencia de DM en varias comunidades autónomas(11). Las tasas se sitúan entre el 6 y el 10% de la población general (11). Según datos del reciente estudio “Valencia”(12), la prevalencia observada de DM en ciudadanos de la Comunidad Valenciana mayores de 18 años es del 13,9 %. De estos enfermos, el 45,8% desconocen padecer la enfermedad.

1.3.- Diabetes Mellitus y el riesgo cardiovascular

A parte de la importancia en cuanto a frecuencia, debemos considerar la DM2 no sólo como una enfermedad en la que está alterada la glucemia, sino también como una patología en la que confluyen otros factores de riesgo cardiovascular como la obesidad, la dislipemia, agregación familiar, ausencia de ejercicio, tabaquismo y la hipertensión arterial (HTA).(13)(14)(15). Cabe destacar que la DM2 también es considerada un factor de riesgo cardiovascular de forma independiente. (16)

Esta situación hace de la DM2 una enfermedad con elevada prevalencia de complicaciones vasculares (tanto micro como macroangiopáticas), llamadas complicaciones crónicas. La DM2 es actualmente la primera causa de ceguera, de insuficiencia renal terminal y de amputación no traumática de extremidades. Por otra parte y, tal como apuntamos en párrafos anteriores, la DM2 es uno de los factores más importantes de ECV(17) siendo la principal causa de mortalidad en el paciente con diabetes mellitus.

La mortalidad cardiovascular en pacientes recién diagnosticados es tres veces mayor que en población sana(18). Este fenómeno es proporcional al nivel de HbA1c, siendo más elevado el riesgo en pacientes con niveles superiores a 7%. Como cabe esperar, los años de evolución de la enfermedad también incrementan el riesgo (19).

La ECV representa más del 70% de las muertes en individuos con DM2(20)(21). Siendo los episodios cardiovasculares cuatro veces más frecuentes que en población sana (22), afectando a pacientes más jóvenes y teniendo estos episodios una mayor tasa de mortalidad que en sujetos sanos(23). Además, el riesgo de episodios cerebrovasculares se multiplica por 10 en paciente diabéticos de menos de 55 años. (24)

1.4.- Dislipemia diabética y el riesgo cardiovascular

Como hemos citado anteriormente, la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos es muy alta. Entre otros, se sabe que un 70% de las personas con diabetes tienen dislipidemia (25)(17).Esta alteración en el metabolismo lipídico de los pacientes con DM2 es lo que conocemos como dislipémia diabética. La dislipemia diabética es la responsable de un mayor riesgo de ECV en pacientes diabéticos tal y como se apuntaba en el anterior apartado. (26)

La prevalencia de hipercolesterolemia en la DM2 es similar respecto a la de la población general. Sin embargo, la hipertrigliceridemia moderada y el cHDL disminuido es de 2 a 4 veces más frecuente en la población diabética que en la no

diabética (27). Aunque el cLDL suele ser normal o estar levemente incrementado, frecuentemente existe un predominio de partículas LDL pequeñas y densas (fenotipo B de las LDL) y también un aumento del número de partículas aterogénicas (de densidad muy baja -VLDL-, intermedia -IDL y baja-LDL-), y del colesterol no-HDL (28)(29). Por tanto, la dislipemia diabética se define por la presencia de la tríada aterogénica : hipertrigliceridemia moderada, cHDL bajo y predominio de LDL pequeñas y densas e hiperapoB.(30)

Se postula que esta alteración lipídica está influida por el hiperaflujo de ácidos grasos libres producido por la resistencia a la insulina, propia de la DM2. (31). También existen líneas de investigación que apoyan que la producción aumentada de cVLDL hepática en la DM2 condiciona la dislipemia diabética.(32). Algunos autores consideran que las alteraciones lipídicas y la alteración en la glucemia están íntimamente relacionadas, influyéndose de forma recíproca. La dislipoproteinemia produce toxicidad sobre la célula beta, y la hiperglucemia es responsable de la oxidación de las partículas de cLDL(33).

Sabemos que la incidencia de la enfermedad cardiovascular en la DM es de 2 a 5 veces mayor y el pronóstico después del episodio es peor (34). El riesgo de que un DM tengo un episodio cardiovascular es comparable al de los sujetos no diabéticos con enfermedad cardiovascular previa (35). Así mismo destacar que la mortalidad en pacientes diabéticos es 4 veces mayor que en no-diabéticos con cifras similares de colesterol.(36).

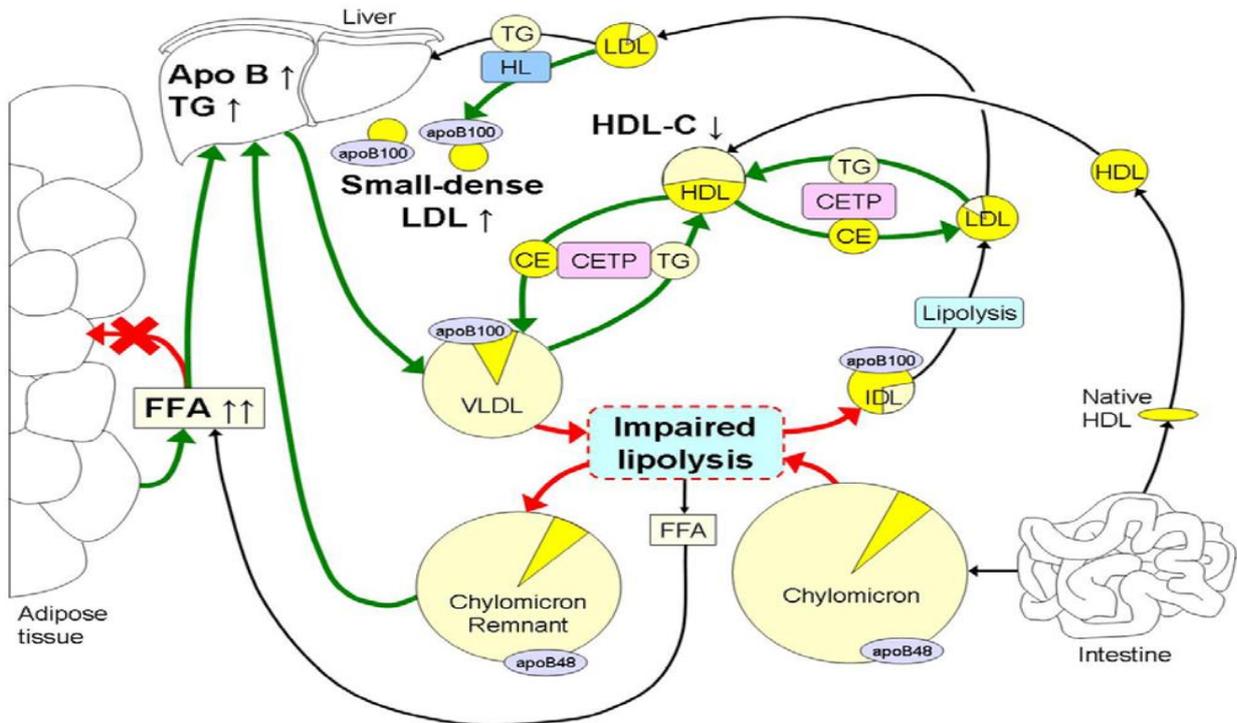
Esto nos hace pensar que deben existir otros mecanismos, a parte de los conocidos, que modulen la marcada incidencia y gravedad de episodios cardiovasculares de la población con DM2. Nuestro grupo de investigación piensa que una de estas alteraciones es la lipemia postprandial y la modulación de factores de riesgo no clásicos en situación postprandial como el estrés oxidativo. En este sentido, la diferente expresión de genes en situación postprandial puede abrir caminos en el estudio de la heterogeneidad de riesgo de los pacientes con DM2 y explicar el riesgo residual de estos sujetos.

1.5.- Lipemia postprandial

Históricamente, el riesgo cardiovascular ha sido estudiado y analizado en situación de ayuno. Sin embargo, en los últimos años se le reconoce mayor papel a la situación postprandial y su efecto metabólico en el riesgo cardiovascular. Esta importancia metabólica del periodo posterior a la ingesta es mayor en pacientes con DM2. Existen numerosos estudios observacionales que evidencian un aumento de riesgo en relación a niveles elevados de triglicéridos postprandiales(37–39). Diversos estudios concluyen que el pico de triglicéridos a los 2-4 horas postingesta es el mayor predictor de ECV(40)(41).

La lipemia postprandial es el conjunto de alteraciones metabólicas que se producen como resultado de la acumulación de partículas lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRTs) (quilomicrones (QM), VLDL y sus remanentes) en plasma aproximadamente 6-10 horas después de una comida grasa (42)(43). Tanto los quilomicrones como las VLDL son aclaradas de la circulación sistémica por las lipasas, dando lugar a partículas más pequeñas. Estas partículas pueden atravesar la pared vascular favoreciendo así la disfunción endotelial y el depósito de colesterol en espacio subendotelial.(44). Este fenómeno se ve favorecido en situación postprandial ya que las lipasas tienen actividad limitada, dificultando la eliminación de dichas partículas proaterogénicas (45).

Figura 1. Lipemia postprandial.(46)



El pico de triglicéridos postprandiales, suele alcanzarse en sujetos normolipémicos a las 3-4 horas de la ingesta de grasa. A las 8 h se vuelve a la situación basal(47). En la lipemia postprandial se altera el intercambio entre los diferentes ésteres de colesterol(48). Esta alteración del intercambio lipídico se concreta en el papel de la “cholesteryl ester transfer protein” (CETP). Esta proteína de síntesis hepática aumenta su actividad según los niveles de triglicéridos plasmáticos y dietéticos (49) (50). Sus acciones son: la disminución de cHDL y el aumento de LRT, ya que disminuye la expresión de la LPL (51). Por tanto, CETP favorece la arteriosclerosis y es estimulada por los niveles de lípidos circulantes.

En segundo lugar, incidir en el efecto de hipertrigliceridemia postprandial sobre las partículas LDL y HDL. Las LDL no modifican sus niveles en periodo postprandial, sin embargo, se convierten en menos hidrolizables por la lipasa hepática, favoreciendo así la aparición de partículas pequeñas y densas (43). Las LDL también se oxidan en periodo postprandial, produciendo una desnaturalización de APO B 100 (52). En tercer lugar, las HDL ricas en triglicéridos son más rápidamente aclaradas del plasma en

periodo postprandial, lo que disminuye su poder antiaterogénico (53). Esta disminución se ha evidenciado tanto en pacientes diabéticos como en sanos tras SOG, siendo el aclaramiento mayor en pacientes DM2. Los niveles de HDL postprandial se correlaciona inversamente con el IMC en los pacientes con DM2. El grado de la insulina-resistencia como una anomalía subyacente - no DM per se - determina el grado de lipemia postprandial (54)(55). En conclusión, los pacientes con DM2 presentan un aclaramiento más lento de estas partículas proaterogénicas, lo que condiciona una evolución más rápida hacia la disfunción endotelial, ECV y episodios cardiovasculares. La disminución de las HDL en periodo postprandial en pacientes DM2 también contribuye a la disfunción endotelial ya que supone un descenso de partículas antiaterogénicas.

En resumen, en situación postprandial existe una serie de modificaciones del perfil lipídico que favorecen la AEC. Estas alteraciones se concretan en aumento de LRTs incremento de partículas LDL pequeñas y densas y aumento de LDL oxidado En contrapartida, aparece un aclaramiento aumentado de partículas HDL lo que disminuye la protección frente a la AEC. Todos estos procesos son más acusados en la población diabética.

1.6.-Disfuncion endotelial transitoria.

Existen evidencias que demuestran que tras sobrecarga oral lipídica se produce una disfunción endotelial transitoria (56) (57) iniciada por las alteraciones lipídicas arriba descritas. Esta disfunción es de mayor grado en pacientes con DM2 (58). Esta afectación endotelial se concreta en una serie de alteraciones tanto celulares como bioquímicas.

Existe un aumento de leucocitos tras sobrecarga oral grasa tanto en DM2 como en sanos(43,59). Este incremento es proporcional a la elevación de los triglicéridos postprandiales. Los leucocitos aumentan cuando has transcurrido 60 minutos de la ingesta grasa. Dentro de la población de leucocitos se ha objetivado como los linfocitos no aumentan, viéndose incrementadas las poblaciones de monocitos y de neutrófilos.(60) Los niveles de neutrófilos permaneces elevados durante horas llegando a niveles normales a las 8 horas de la SOG.

Se ha observado que tras SOG, la expresión de CD11b aumenta en neutrófilos y monocitos. Entre las funciones de CD11 se encuentra la inmunofenotipificación de linfocitos T CD11a. Estos, al unirse con CD18 forman integrinas (moléculas de adhesión leucocitaria) que interaccionan con ICAM-1, presentes en el endotelio. Por tanto, estas moléculas de CD11a/CD18 son esenciales para el proceso de migración y activación de los leucocitos (61). Por otra parte, la síntesis de CD66b también se ve incrementada en situación postprandial en los neutrófilos (62).Del mismo modo la expresión de CD66b también se relacionada con aumento de adhesión a paredes vasculares por parte de estas partículas modulando la función de CD11/CD18(63).

Los leucocitos no solo aumentan en situación postprandial, además estos interactúan con las partículas grasas. Existen evidencias experimentales que demuestran que la presencia de VLDL y QM favorece la conversión de monocitos en macrófagos(64). Esto puede estar mediada, entre otros, por la proteína quimio táctica de monocitos (MCP-1), ya que se ha comprobado que los LRTs aumentan la producción de esta

proteína.(65). Esta activación celular también parece estar mediada por la NFκB. Asimismo, los macrófagos son capaces de captar las partículas remanentes de colesterol y convertirse en células espumosas (66). Estas son las responsables y principales protagonistas de la progresión de las placas de ateroma.

Por tanto, en situación postprandial existe un incremento de células inflamatorias que se ven activadas por citoquinas, incrementándose su adhesión endotelial, produciendo así daño vascular.

Aparte de la afectación celular se ha visto que los LRTs promueven un estado procoagulante en situación postprandial. Esta predisposición a la coagulación está motivada por la hiperactivación del factor VII a través del factor XII activado (67)(68). Otra vía que se encuentra favorecida en presencia de LRTs es el factor IX y la vía intrínseca. También está descrito que las elevadas concentraciones de VLDL aumentan los niveles de PAI-1 (69). Todas estas alteraciones condicionan un estado procoagulante favoreciéndose la evolución de la placa hacia la trombosis.

1.7.- Estrés oxidativo

La instauración del proceso de estrés oxidativo ocurre por la existencia de un desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes. Este desbalance se puede dar tanto por producción aumentada de radicales libres, como por un descenso de la eliminación de los mismos. 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 celular(70). 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(71). Este aumento de elementos oxidantes desencadena una serie de reacciones de oxidación en diferentes componentes sanguíneos. Entre otras cabe destacar la oxidación de lipoproteínas, y la

eliminación del óxido nítrico (NO) circulante. Esta oxidación de biomoléculas conduce a una pérdida de sus funciones fisiológicas, al descontrol homeostático y al potencial daño oxidativo de las células y tejidos(72). La importancia del EO y los productos a los que da lugar, radica en su implicación en el desarrollo de las enfermedades crónicas adquiridas, tales como la obesidad, la arteriosclerosis y la ECV, la diabetes, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer (73). Por tanto, el EO juega un papel importante en patologías de elevada frecuencia y morbi-mortalidad.

1.8.- Estrés Oxidativo, sobrecarga oral grasa y Diabetes Mellitus tipo 2

Como hemos visto, durante la fase postprandial existen diferentes vías inflamatorias que se ven activadas favoreciéndose la aterosclerosis. Esto apoya el artículo de Zilverstmidt et al que en 1979 ya consideraban la aterosclerosis como un fenómeno de origen postprandial (44). Otro aspecto también estudiado es la alteración del EO en el periodo postprandial, este se ve incrementado en la fase postprandial favoreciéndose también la disfunción endotelial. Este aumento de EO está relacionado con la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia postprandial (74). Una comida rica en grasa es una fuente directa de EO (75). Por lo tanto, el EO postprandial que se produce de forma recurrente después de cada ingesta, inicia un ciclo casi continuo de disfunción endotelial (76)

En esta disfunción existen varios mediadores implicados. El óxido nítrico (NO) es uno de los mediadores más importantes en la protección endotelial, ya que tiene poder antiadhesión, antifibrinolítico, y anticoagulante. Este es sintetizado a partir de la arginina y el oxígeno molecular. Su producción viene catalizada por la eNOS (endotelial nitric oxide synthase) y es dependiente de cofactores como la BH4. Figura 2.(77) El daño vascular esta producido, entre otros, por el radical superóxido (SO), el cual se acumula como resultado de la oxidación de los lípidos a nivel mitocondrial. Este es reducido por el NO. Esta reacción, tiene como resultado la disminución de biodisponibilidad de NO y la formación de peroxinitrito (ONOO). Estos dos mecanismos conducen a la aterogénesis. Figura. 3 (78).

Figura.2 Síntesis de Óxido Nítrico. (77)

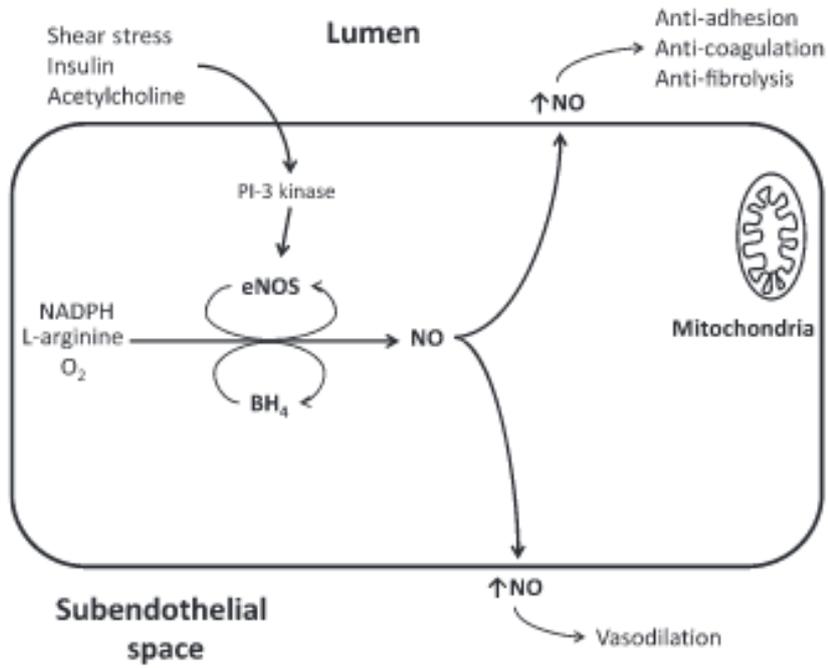
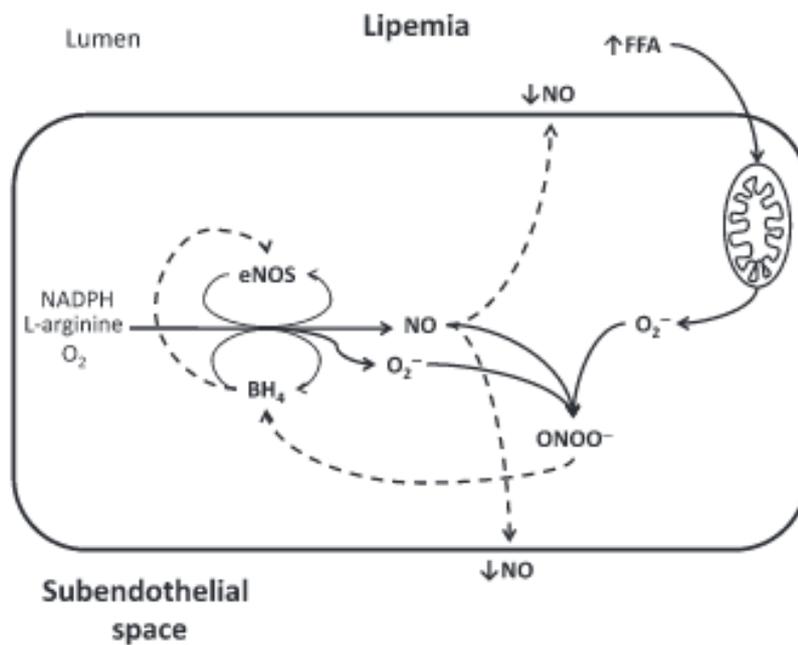


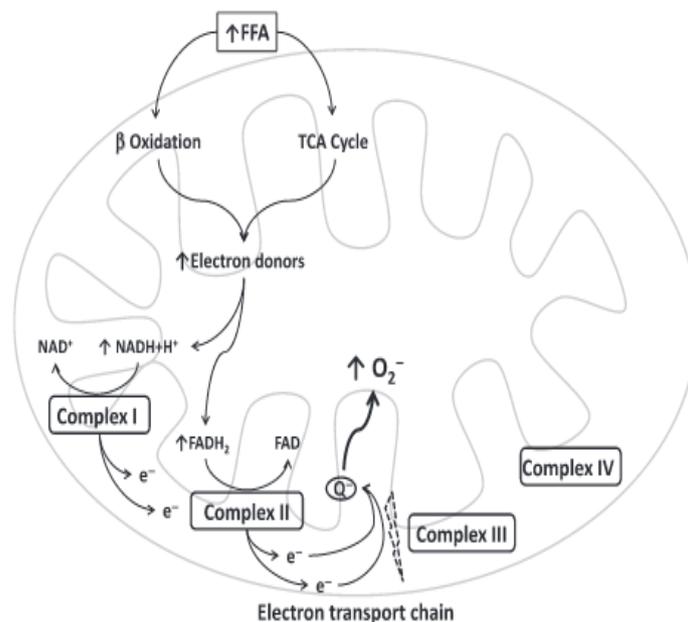
Figura. 3. Formación de ONOO⁻ y consumo de NO. (77)



Otro fenómeno importante es la formación de SO en situación postprandial. Como hemos citado anteriormente existe un aumento del flujo de ácidos grasos libres (AGL) tras ingesta. Estos se depositan en tejido hepático, muscular y también en el endotelio (79). Este aumento de flujo produce oxidación mitocondrial de AGL mediante el ciclo de ácido tricarboxílico, creando así una sobreproducción de donantes de electrones (NADH y FADH). Estos donan sus electrones al oxígeno molecular aumentando los niveles de radical SO. Figura 4

Por tanto, el aumento de triglicéridos circulantes en el periodo postprandial conduce a un aumento del EO, ya que incrementa las concentraciones de ONOO y radical SO. Este aumento de sustancia oxidantes se ve acompañado por una disminución de la biodisponibilidad de NO.

Figura.4. Oxidación de ácidos grasos libres. (77)



Por otra parte, los pacientes con DM2 presentan un aumento de EO. Este juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad y en sus complicaciones. La influencia en la patogénesis se concreta en su acción sobre la secreción de insulina y sobre la resistencia a la misma (80).

La alteración de la secreción se produce por disfunción de la célula beta (81). La glucolipototoxicidad está mediada por el EO (82) produciéndose daño sobre la función endocrina del páncreas, generándose así un déficit en la liberación insulina. Las señales de transducción ligadas a la secreción de la insulina se ven afectadas por el incremento de EO en paciente con DM2. Se ha visto que el EO afecta a señales como el phosphatidil inositol disminuyendo la captación de glucosa por parte del músculo(83) . La kinasa 1, también se ve alterada con el aumento de EO alterándose la señalización de la insulina. (84). Finalmente, en este contexto, la actividad de la tirosina kinasa se ve modificada, interaccionando la respuesta sobre el receptor de insulina (85).

El EO también favorece la alteración del metabolismo glucosado influyendo sobre la resistencia a la insulina (86). La sobreproducción de ROS es un potente trigger en la resistencia a la insulina y en el desarrollo de DM2(87). En estudios en ratones diabéticos se ha objetivado aumento de producción de H₂O₂ y NADPH en tejido adiposo(88).

El EO también juega un papel importante en el desarrollo de las diferentes complicaciones de la diabetes influyendo de este modo en la neuropatía(89), oftalmopatía (90) y en nefropatía (91). Las alteraciones en el EO que se han objetivado en la DM y que son las responsable de las complicaciones son la activación de la vía de los polioles (92), el aumento de la concentración intracelular de productos avanzados de la glicación (AGEs)(93), el aumento de receptor de AGEs (94), la activación de protein quinasa c (PKC) (95), y la activación de la vía de la hexosamina.

En estudios de sobrecarga oral grasa se han objetivado diferentes alteraciones del EO. Tras SOG se produce un descenso de la GSH reductasa y disminución de la expresión de la PPAR γ (96). Esto produce disminución de actividad de la superóxido dismutasa

(SOD), lo que disminuye el aclaramiento de SO. La disminución PPARg en periodo postprandial está relacionado con niveles de insulinresistencia (97). Por tanto, todas estas alteraciones conllevan un aumento de EO en periodo postprandial que se debe agravar en pacientes con DM.

Es importante destacar que el tipo de grasa ingerida producirá diferentes respuestas metabólicas, bioquímicas y celulares. Existen estudios que evidencian diferencias en LPP cuando la grasa es insaturada, mejorando parámetros inflamatorios y de EO en comparación con estudios que utilizan grasa saturada. (98,99). Ursini et al (52) vieron como la inclusión de antioxidantes como el vino tinto disminuía la oxidación del LDL en situación postprandial, lo que minimizaba su efecto perjudicial. En otro trabajo, se demostró que una dieta con grasas saturadas tiene un efecto contrario, disminuyendo los niveles de HDL postprandial, e incrementando los parámetros de EO postprandial. (53) Eso ha motivado la realización de diversos estudios de intervención en los que se objetivo que las dietas ricas en grasa insaturada mejoran la disfunción endotelial disminuyendo así los eventos coronarios y la mortalidad cardiovascular. (100)

1.9.- Otros parámetros

Existen otras variables que han sido también analizados en diferentes trabajos. La adiponectina es una hormona sintetizada exclusivamente por el tejido adiposo que participa en el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos. Diversos estudios han comprobado que la adiponectina aumenta la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo (101). La hipoadiponectinemia es un parámetro presente en pacientes DM2, obesos, en pacientes con ECV establecida y con esteatosis hepática no alcohólica. Tras SOG se produce un descenso de la adiponectina. Esta disminución es mayor en pacientes diabéticos. Tanto los niveles previos como su descenso tras sobrecarga se relaciona con los niveles de insulinemia, presión arterial, HDL e IMC (102). La hipoadiponectinemia se ha relacionado en múltiples trabajos con un aumento de riesgo cardiovascular. (103–105)

La quimiocina y molécula de adhesión fractalquina y sus receptores CX3 y CR1 (106) han surgido como reguladores de interés en la inflamación y la AEC (102). No se encontró ninguna diferencia significativa en los valores de fractalquina en pacientes con enfermedad coronaria y en pacientes diabéticos. Considerando que los niveles de fractalquina en los controles eran inferiores.

Otra molécula estudiada es la proteína estimulante de la acilación (ASP). La ASP es un producto de la escisión de la proteína del complemento C3. La ASP es un potente esterificador de ácidos grasos, aumenta su captación e inhibe la lipasa sensible a hormona(107,108). Además produce un aumento en la liberación de insulina en las células beta(109). Es una molécula que se ha relacionada con la patogénesis de la obesidad(110). La concentración plasmática de ASP y la expresión de C3mRNA en tejido adiposo fueron mayores en los grupos de los obesos, que en los sujetos no obesos (49). Sus niveles son también mayores en pacientes DM2 y con ECV(111,112). Tras SOG no se modificó la concentración de plasmática de ASP. La concentración plasmática basal de ASP y la expresión de C3mRNA se correlacionaron negativamente con la sensibilidad a la insulina y de forma positiva con la magnitud de la lipemia postprandial en obesos, pero no en pacientes con diabetes tipo 2. La expresión de ARNm de C3 no está regulada por la insulina(111) (113) .

En resumen, la DM2 supone un elevado riesgo cardiovascular, que se relaciona con IR. Este aumento de riesgo cardiovascular viene determinado no solo por la presencia de alteraciones bioquímicas basales. En este desarrollo del proceso arteriosclerótico interviene muchos factores celulares, inflamatorios y de EO. Estos se encuentran activados en fase postprandial.

1.10.- Expresión de genes en situación postprandial

Se ha descrito en los anteriores párrafos el estudio bioquímico, molecular, celular, y de EO en SOG. Siguiendo con las pruebas de provocación metabólica, se ha propuesto el análisis de la expresión genética y la transcriptómica como diana de estudio en situación postprandial. Las células mononucleares en sangre periférica (PBMCs.) son una población celular cuyo análisis de expresión genética es sencillo. Se ha propuesto el estudio en otros tejidos como hígado o tejido adiposo, pero metodológicamente es más complejo.(114) Además, O`Grada et al han demostrado que existe una correlación entre la expresión genética de tejido adiposo y de PBMCs, lo que permite transpolar los resultados de expresión en PBMCs con lo que probablemente esté ocurriendo en tejido adiposo. Otros grupos de trabajo han mostrado que la grasa postprandial interactúa con los PBMCs activando o inhibiendo diferentes genes. A pesar de esto, los resultados obtenidos en estudios en los que se evaluaba la expresión génica postprandial son limitados y contradictorios.

La expresión génica en situación postprandial está regulada por múltiples factores. Entre ellos se incluyen factores dietéticos, condiciones fisiológicas, patológicos y de estilo de vida. La interacción de tantos factores hace imposible extraer conclusiones sobre el efecto de los diferentes tipos de nutrientes sobre el riesgo cardiovascular. (115)

Sin embargo, cuando realizamos la sobrecarga con grasa insaturada los resultados son más concluyentes. En esta situación experimental se puede analizar mejor la expresión en PBMCs. Los trabajos en los que se utiliza grasa insaturada han evidenciado una mejora en los factores implicados en el desarrollo de la arterosclerosis. Nuestro grupo de trabajo ya tiene publicados resultados en los que se vio mejoría del EO tras SOG en pacientes con hipercolesterolemia familiar.(99)

Existen pocos trabajos que estudien la expresión de genes en situación postprandial (116). Esta expresión en sujetos sanos normolipidémicos depende del contenido en grasa, tipo de grasa y contenido de hidratos de carbono de la dieta de prueba o sobrecarga empleada. Pensamos que en pacientes con diabetes tipo 2 la expresión de

genes de linfomonocitos, células clave en el proceso arteriosclerótico, durante la SOG puede ayudar a conocer mejor que ocurre en situación postprandial, en un modelo con insulinresistencia donde existen muy pocos datos al respecto.

2.- Hipótesis de trabajo

La diabetes tipo 2 es un modelo humano de resistencia a la insulina y alteración de la lipemia postprandial. Esta LPP alterada facilita el inicio de la arteriosclerosis y genera disfunción endotelial mediada por la expresión de genes. En situación postprandial en pacientes diabéticos debe existir una modificación de marcadores de estrés oxidativo y del perfil de expresión de ARN en linfomonocitos, células clave del inicio de la arteriosclerosis. No se conoce el efecto de la SOG con grasa insaturada en marcadores de EO y perfil de expresión de ARN de linfomonocitos en sujetos con DM.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la grasa insaturada debe disminuir el EO postprandial y que la expresión de ARN de linfomonocitos debe ser diferente en sujetos con DM2 frente a la de sujetos control.

3.-Objetivos

3.1.-General

Conocer y comparar los marcadores de EO y el perfil de expresión de ARN en linfomonocitos en ayunas y su modificación durante la SOG con grasa insaturada en sujetos control y pacientes con diabetes tipo 2.

3.2.-Específicos

a) Analizar y comparar las modificaciones del sistema glutatión (GSSG, GSH) durante la SOG en sujetos sanos y con DM2.

b) Estudiar y comparar el perfil de expresión de ARN en linfomonocitos en situación de ayuno (basal) en controles sanos y con DM2.

c) Analizar y comparar el efecto de la SOG en el perfil de expresión de ARN en linfomonocitos de sujetos control y sujetos con DM2.

d) Identificar genes y vías metabólicas regulados por la grasa insaturada en situación postprandial.

4.- Sujetos y metodología

4.1.- Sujetos

Se estudiaron dos grupos de sujetos:

Grupo 1: sujetos con diabetes tipo 2

Grupo 2: sujetos sanos (grupo control)

El grupo 1 procede de la Unidad de Diabetes y de la de Lípidos y Arteriosclerosis del Servicio de Endocrinología y Nutrición de nuestro hospital. El grupo 2 (controles) procede de investigadores, personal y sujetos donantes de sangre y plasma de nuestro centro y de sujetos sanos que por diversos motivos acuden a las consultas. La selección de la muestra se hizo de forma aleatoria.

4.1.1- Definición de los grupos a estudiar:

Grupo 1

Criterios diagnósticos de diabetes

Glucemia en ayunas < 200 mg/dl.

TG en ayunas < 400 mg/dl

Tratados con dieta y metformina (850 mg x 2)

Grupo 2

Perímetro de cintura inferior a 102 cm en el varón y 88 cm en la mujer

CT < 200 mg/dL, TG < 150 mg/dL y apoB < 120 mg/dL.

Glucemia basal < 100 mg/dl.

Ausencia de antecedentes personales o familiares de dislipemia, cardiopatía isquémica precoz, hipertensión arterial o diabetes.

Criterios de inclusión en el estudio

Edad: 18-65 años.

Ambos sexos.

Criterios de control sano.

Criterios diabetes tipo 2.

Genotipo E3/E3 de apo E.

Criterios de exclusión

Variaciones ponderales >10 % del peso corporal total en los últimos tres meses.

Medicación que interfiera con los perfiles de expresión de ARN (fármacos hipolipemiantes, antihipertensivos, antidiabéticos orales (excepto metformina), AINES y suplementos nutricionales) y que no puedan ser retirada 4 semanas antes del estudio.

Cualquier proceso de tipo infeccioso, inflamatorio o alérgico que acontezca en el momento del estudio o durante las 6 semanas previas.

Obesidad grave (IMC > 35 kg/m²)

Ingesta de alcohol > 30 g/día.

Fumador activo, independientemente del número de cigarrillos/día, o ex fumador desde hace menos de 6 meses.

Embarazo-lactancia (hasta los tres meses posteriores)

Enfermedad neoplásica.

Antecedentes personales de cardiopatía isquémica (angor pectoris, infarto agudo de miocardio, angioplastia transluminal, by-pass aorto-coronario) o accidente cerebrovascular.

GOT y/o GPT y/o GGT x 2 veces la normalidad.

Insuficiencia hepática o cirrosis hepática.

TSH > 10 mU/mL

Creatinina > 1,5 mg/dL o macroalbuminuria.

Retinopatía avanzada o laserterapia

Criterios de PNP grave (NSS o NDS > 6)

4.2.- Métodos

4.2.1.-Parámetros o variables

En los sujetos que cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión y firmaron el consentimiento informado se determinaron los siguientes parámetros en situación basal. Se entiende por situación basal un periodo de lavado de 6 semanas en aquellos pacientes que tomen los fármacos motivo de exclusión del estudio (comentados previamente), excepto la toma de metformina.

4.2.2.- Clínicos

Registro del hábito tabáquico. En los exfumadores se recogerá el número de cigarrillos / día fumados durante cuántos años y en qué año lo dejó.

Consumo de alcohol con registro de gramos / día.

Ejercicio físico reflejando los minutos / semana realizados.

Fármacos de uso habitual u ocasional que coincidan con la fecha del estudio.

Procesos de tipo inflamatorio, infeccioso o alérgico padecidos.

Problemas cardiovasculares presentados hasta la fecha de inclusión.

Determinación de la presión arterial con esfigmomanómetro de mercurio.

4.2.3.- Antropométricos

Peso en Kg.

Talla en m.

IMC en kg/m².

Perímetro de la cintura determinada en el punto medio entre el borde costal inferior y la cresta iliaca, expresada en cm.

4.2.4.- Bioquímicos y genéticos

Hemograma y bioquímica estándar.

Colesterol total y triglicéridos por método colorimétrico en situación de 12 horas de ayuno.

cHDL tras precipitación con polianiones.

cLDL por diferencia $CT - (cHDL + cVLDL)$.

Apoproteínas B y AI por inmunoturbimetría.

Insulinemia por ELISA.

Cálculo del índice HOMA ($\text{glucosa} * \text{insulina} / 22,5$).

Determinación del genotipo de la apo E (PCR digestión enzimática).

4.2.5.- Metodología EO

Se midieron GSSG, GSH y MDA por métodos estandarizados.

Para el estudio de los parámetros del EO, la sangre se recogió en tubos heparinizados y se conservaron en frío (4°C) para su inmediato procesamiento que varía según el análisis a realizar.

La medición de los parámetros se determinó mediante cromatografía de alta presión (HPLC) y detección UV, haciendo uso de patrones apropiados y siguiendo la metodología descrita previamente.(117,118)

4.2.6.- Metodología de estudio de los niveles de ARN

Se extrajo ARN total de los linfomonocitos separados anteriormente mediante sistemas comerciales.

Los estudios de expresión se realizaron en 3 puntos de la curva de sobrecarga oral grasa: 0, 4 y 8 horas. De esta forma se consideran los puntos más representativos de la lipemia postprandial: basal, máximo y final.

Estos estudios se realizaron con microchips de expresión de la casa Illumina (sistema iScan): HumanHT-12 v3 Expression BeadChip, según las indicaciones del fabricante. Estos microchips permiten el análisis simultáneo de 12 muestras en cada plataforma. Concretamente, estos microchips permiten el estudio de más de 25.000 transcritos por medio de 48.000 sondas, y presentan la ventaja que estas sondas corresponden a transcritos que han sido anotados en bases de datos de reconocido prestigio como NCBI (National Center for Biotechnology Information) RefSeq (Build 36.2, Rel 22) y UniGene (Build 99). Nuestro laboratorio dispone de los aparatos necesarios (termocicladores, escáner) para llevarlos a cabo. Se analizó a qué rutas metabólicas pertenecen los genes diferencialmente expresados.

5.- Análisis estadístico

La población a estudio proviene de pacientes asistidos en el Servicio de Endocrinología y Nutrición de nuestro Centro.

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 25% y modificaciones de las variables críticas superiores al 30% entre controles y sujetos con diabetes. La muestra comprenderá un mínimo de 10 sujetos por grupo, apareados por edad y sexo. Esto es debido a que las diferencias esperadas son muy importantes y se magnifican tras SOG como hemos encontrado en estudios previos con población hipercolesterolémica (99) y obesa.

El estudio estadístico se realizó con el programa informatizado Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software (versión 15, SPSS, Chicago, IL, USA).

Debido al tamaño de la muestra, utilizamos test no paramétricos: U de Mann-Whitney para comparar variables cuantitativas entre grupos y el test de Wilcoxon para comparar variables cuantitativas intragrupo. Para determinar el grado de relación entre dos variables cuantitativas, utilizamos el coeficiente de correlación de Spearman. Además, se calcularon incrementos; también áreas bajo la curva (área bajo la curva, e incremento del área bajo la curva) mediante el programa StatsGraphic.

El análisis de los datos obtenidos con los microchips de expresión se realizó usando programas bioinformáticos especialmente diseñados para ello. Se utilizó el programa estadístico R y el módulo Bioconductor, y los paquetes BASH, Beadarray, y limma. BASH permite la corrección de artefactos espaciales. Beadarray es un paquete especialmente diseñado para el estudio de expresión diferencial con chips de Illumina, y permite realizar todo el pre procesamiento necesario: corrección del ruido de fondo, y normalización, así como el estudio de calidad de las imágenes obtenidas. Por último, limma permite realizar el tratamiento estadístico. El estudio de las rutas metabólicas se realizará mediante el paquete GOSTats.

5.1.- Diseño

Se trata de un estudio de intervención nutricional con modulo de grasa insaturada (Supracal) y comparativo entre grupo de pacientes con DM2 y sujetos sanos.

5.2.- Procedimiento de intervención

En la Unidad Metabólica de nuestro centro se determinaron los parámetros clínicos y biológicos mencionados. El estudio de intervención se explicó en la unidad de dietética (semana -6). Si los pacientes aceptaban continuar se les retiraba la medicación (periodo de lavado de 6 semanas, en el caso de que los lleven) y volvían a la Unidad para recogida de datos clínicos y biológicos basales (0).

5.2.1.- Período de lavado S (-6) a S (-1)

A los pacientes que cumplan los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, tras aceptar participar en el estudio y firmar el consentimiento informado se les realizó una anamnesis y exploración física completas. Se interrumpía durante seis semanas el tratamiento médico seguido hasta entonces, en caso de que lo llevaran. Durante esas 6 semanas consumirán una dieta hipocolesterolemiantes estandarizada tipo NCEP- II. El consumo de calorías totales será similar al que realizaban antes de entrar en el estudio (dieta isocalórica). Los sujetos serán instruidos para realizar ejercicio físico y mantener un estilo de vida similar durante el estudio.

5.2.2.- Intervención S (0)

En S (0) tras 12 horas de ayuno se determinaron los parámetros clínicos y biológicos basales. A continuación, se sometía al paciente a una sobrecarga oral estandarizada de grasa con ácidos grasos insaturados (80%), especialmente mono insaturados (60% del total), y se determinaron las variables biológicas de interés (lípidos, parámetros de RI y expresión de genes en linfomonocitos) a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la sobrecarga oral de grasa.

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 de 50 g/m² de Supracal ® durante 5'. La composición del preparado se muestra en la tabla 1. Tras la ingesta y durante todo el estudio se mantuvo un reposo relativo. 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 internacional 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

-mono insaturados g: 28,2

-poli insaturados: 10

-% LCT: 100%

-relación $\omega 6$: $\omega 3 > 20:1$

-Na g: <10.

Perfil de ácidos grasos: g por 100g de ácidos grasos

Áurico (C₁₂) <1

Mirística (C₁₄) <1

Palmítico (C₁₆) 10

Esteárico (C₁₈) 3

Oleico (C_{18:1}) 58

Rinológico (C_{18:2}) 20

α -rinológico (C_{18:3}) <1

Araquidónico (C₂₀) 1

Eicosaenoico (C_{20:1}) 1

Behénico (C₂₂) 3

Lignocérico (C₂₄) 1

6.- Resultados

6.1.- Comparación de los parámetros analizados en ayunas en el grupo completo: controles frente a DM2.

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 pacientes DM2 en ayunas.

6.1.1.- Características generales

En la tabla 2 se observan las características generales del grupo completo, como edad, sexo, peso, IMC y cintura. Son grupos comparables en edad. Se observan diferencias estadísticamente significativas en cintura en IMC y en tensión arterial, como cabría esperar.

Tabla 2. Características generales del grupo completo.

		N	Media	Desv. típica	p
EDAD (años)	CONTROL	18	48,78	11,650	
	DIABETES	16	53,75	9,140	
IMC(kg/m ²)	CONTROL	18	26,2133	3,22205	0,01
	DIABETES	16	30,1019	2,69164	
CINTURA(cm)	CONTROL	18	91,42	9,456	0,01
	DIABETES	16	102,63	8,397	
TAS(mmHg)	CONTROL	18	116,56	12,200	0,01
	DIABETES	16	129,38	8,024	
TAD(mmHg)	CONTROL	18	74,17	10,326	<0,01
	DIABETES	16	79,06	4,419	

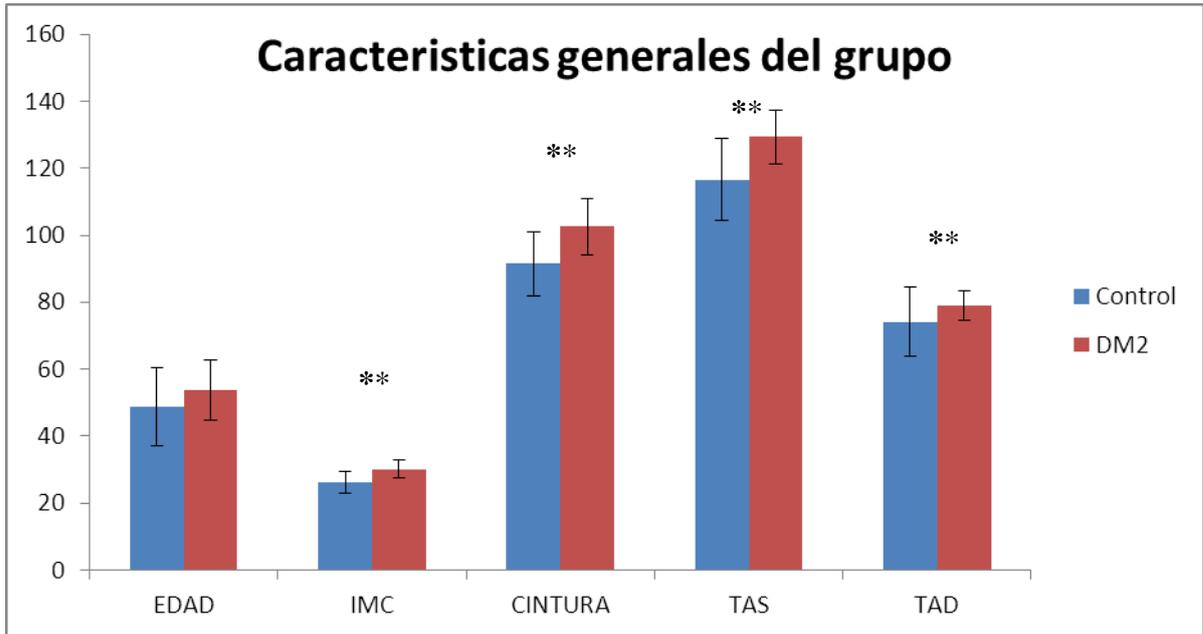
IMC: Índice de masa corporal

TAS: Tensión arterial sistólica

TAD: Tensión arterial diastólica

Desviación tip: Desviación típica

Figura 5. Características generales del grupo completo



* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

6.1.2.- Datos bioquímicos en ayunas.

En la tabla 3 resumimos los principales resultados bioquímicos en ayunas de los sujetos estudiados. Encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en los valores de CT, TG, cHDL y cLDL.

Tabla 3. Datos bioquímicos en ayunas

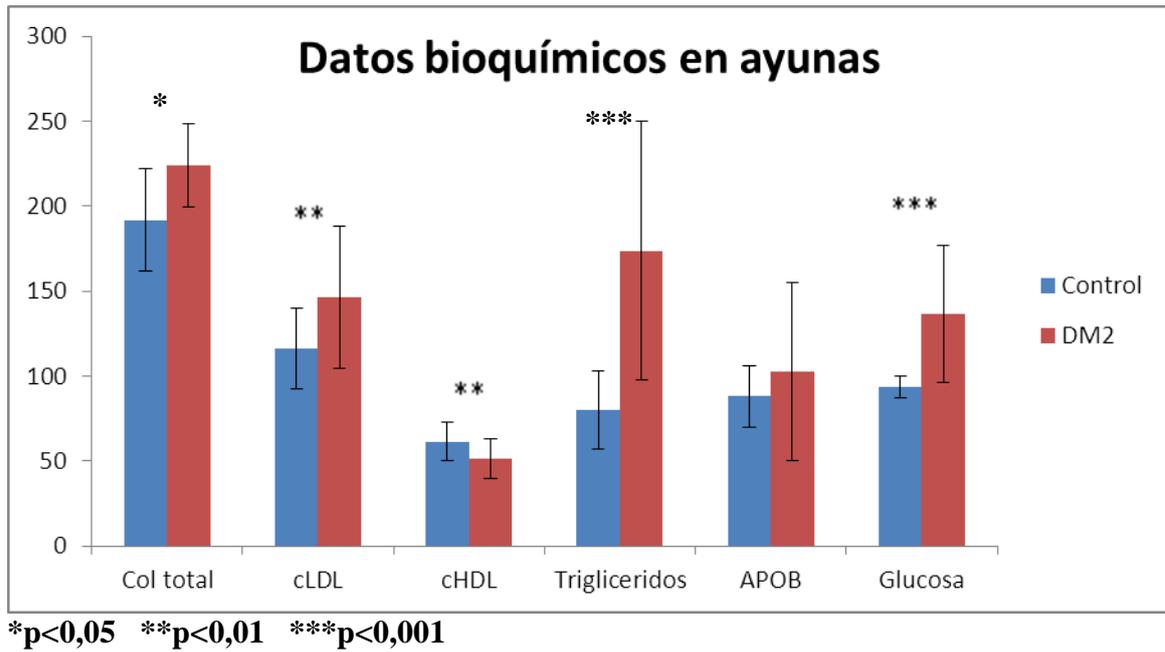
		N	Media	Desv. típica	p
Col total(mg/dl)	CONTROL	18	191,83	29,908	<0,05
	DIABETES	16	223,75	52,621	
cLDL(mg/dl)	CONTROL	18	116,39	23,858	<0,01
	DIABETES	16	146,44	41,932	
cHDL (mg/dl)	CONTROL	18	61,33	11,298	<0,01
	DIABETES	16	51,06	11,630	
Triglicéridos (mg/dl)	CONTROL	18	79,94	22,758	<0,001
	DIABETES	16	173,81	76,337	
APOB(mg/dl)	CONTROL	18	88,17	17,978	
	DIABETES	16	102,75	24,455	
GLUCOSA(mg/dl)	CONTROL	17	93,59	6,305	<0,01
	DIABETES	16	136,56	40,296	

Col total: Colesterol total

cLDL: Colesterol LDL

cHDL: Colesterol HDL

Figura 6. Datos bioquímicos en ayunas



6.1.3.- Datos de oxidación en ayunas.

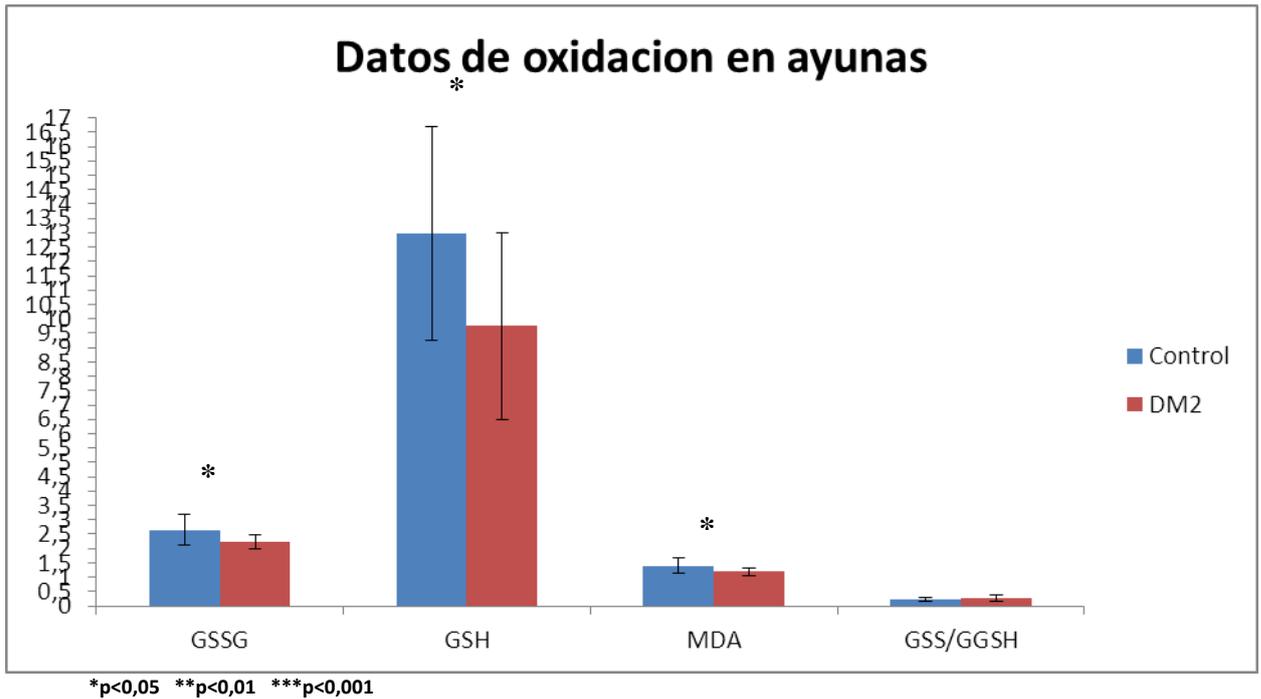
En la tabla 4 quedan reflejados los valores de los parámetros biológicos de oxidación del grupo completo. Se objetivan diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros de estrés oxidativo estudiados.

Tabla 4. Datos de oxidación en ayunas

		N	Media	Desv. típica	p
GSSG (mcg/M)	CONTROL	14	2,64197	,528646	<0,05
	DIABETES	16	2,24269	,248727	
GSH (mcg/M)	CONTROL	14	12,9721	3,740994	<0,05
	DIABETES	16	9,74952	3,249955	
MDA (mcg/M)	CONTROL	14	1,40531	,281195	<0,05
	DIABETES	16	1,19292	,132302	
GSSG/GSH	CONTROL	14	,2191	,07389	
	DIABETES	16	,2587	,10320	

GSSG: Glutación oxidado (mcgM) GSH: Glutación reducido (mcgM) MDA: Malondialdehido (mcgM)

Figura 7. Datos de oxidación en ayunas



6.2.- Comparación de los parámetros analizados en el grupo completo a nivel postprandial: controles frente a DM2.

En las tablas y figuras que se exponen a continuación comparamos las características bioquímicas y los parámetros de oxidación a nivel basal y a las 2, 4, 6 y 8 horas tras la SOG del grupo de controles frente al de los pacientes DM2.

6.2.1.- Comparación entre grupos en los valores de triglicéridos durante la SOG:

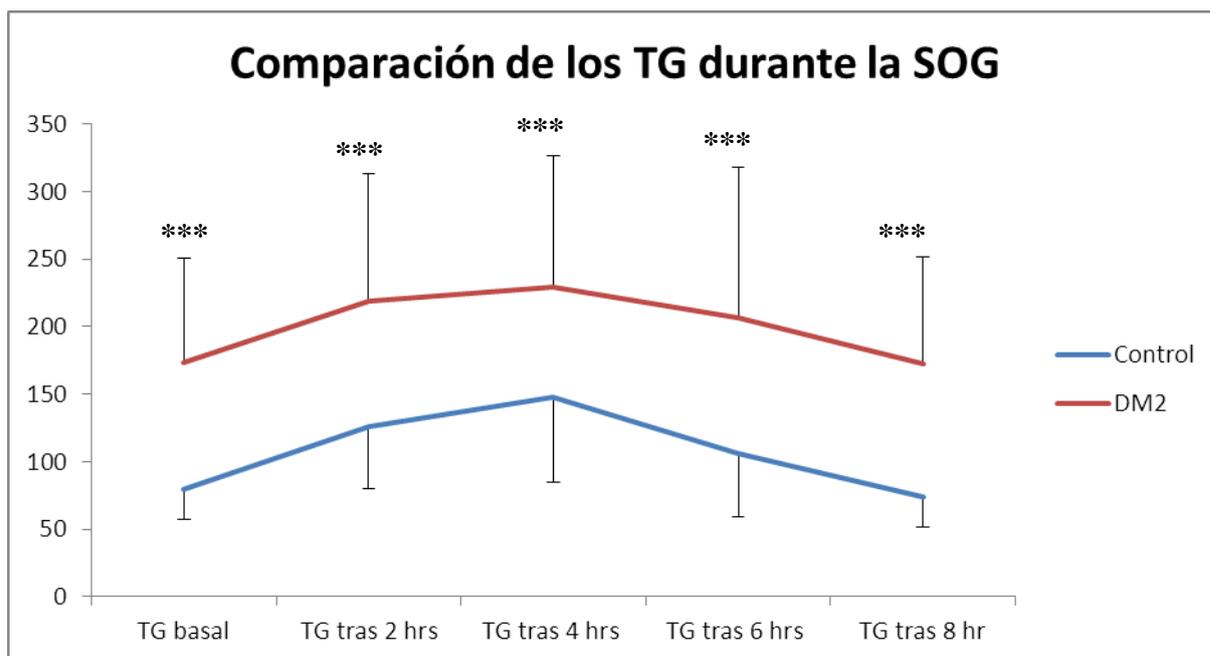
En la tabla 5 quedan reflejados los valores de triglicéridos de ambos grupos antes y después de la SOG. Los niveles de triglicéridos aumentaron más en pacientes con DM2 respecto a pacientes sanos. Las diferencias son estadísticamente significativas en todos los puntos de la SOG.

Tabla 5. Comparación de valores de triglicéridos obtenidos durante la SOG

		N	Media	Desv. típica	p
TG basal	CONTROL	18	79,94	22,758	<0,001
	DIABETES	16	173,81	76,337	
TG tras 2 horas	CONTROL	18	126,06	46,296	<0,001
	DIABETES	16	218,88	111,332	
TG tras 4 horas	CONTROL	18	147,89	62,846	<0,001
	DIABETES	16	229,56	96,808	
TG tras 6 horas	CONTROL	18	105,61	46,810	<0,001
	DIABETES	16	206,50	94,312	
TG tras 8 horas	CONTROL	18	73,61	22,070	<0,001
	DIABETES	16	171,94	79,780	

TG: Triglicéridos (mg/dl)

Figura 8. Comparación de los TG durante la SOG



***p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001**

6.2.2.- Comparación entre grupos de los parámetros del metabolismo glucémico durante la SOG:

En la tabla 6, 7 y 8 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 e insulinemia hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en todos los puntos de la SOG.

Tabla 6. Comparación de nivel de glucosa durante SOG

		N	Media	Desv. típica	p
GLUCOSA basal (mg/dl)	CONTROL	17	93,59	6,305	<0,01
	DIABETES	16	136,56	40,296	
GLUCOSA 2 hrs(mg/dl)	CONTROL	18	90,44	5,711	<0,01
	DIABETES	16	117,06	28,466	
GLUCOSA 4 hrs (mg/dl)	CONTROL	18	89,39	5,720	<0,01
	DIABETES	16	106,31	23,680	
GLUCOSA 6 hrs (mg/dl)	CONTROL	18	86,56	5,159	<0,01
	DIABETES	16	101,19	20,252	
GLUCOSA 8 hrs (mg/dl)	CONTROL	18	86,72	5,613	<0,01
	DIABETES	16	103,69	19,506	

Glucosa en mg/dl

Figura 9. Comparación de la glucemia durante la SOG

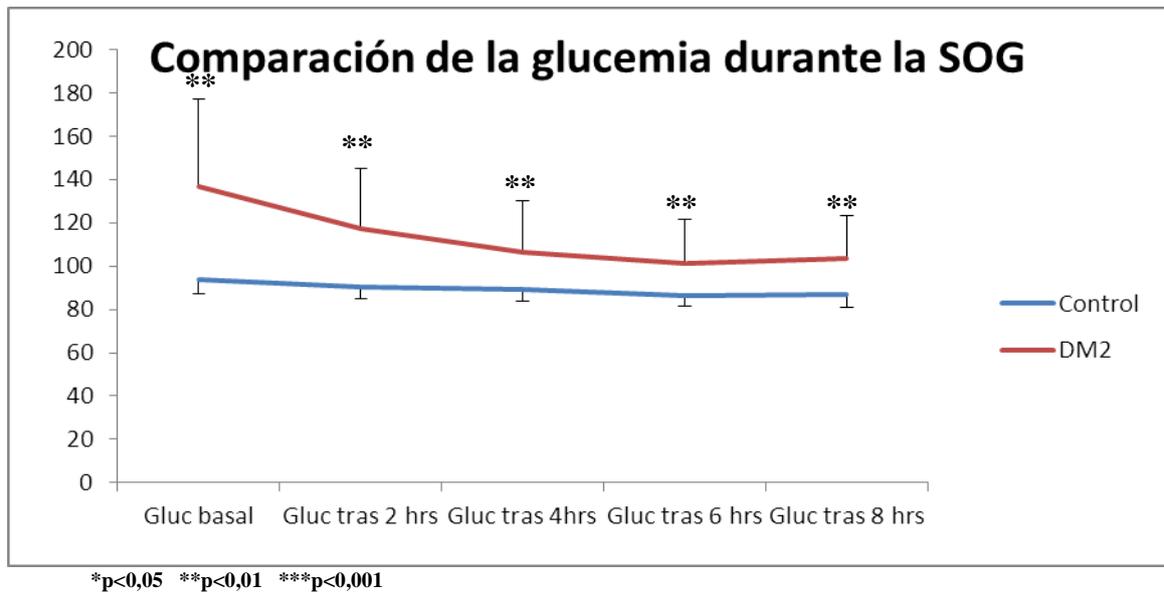


Tabla 7. Comparación de niveles de insulina durante la SOG.

		N	Media	Desv. típica	p
INSUL basal(mU/ml)	CONTROL	18	7,361	3,5130	<0,01
	DIABETES	16	14,913	10,5751	
INSUL 2 hrs(mU/ml)	CONTROL	16	5,444	3,0811	<0,01
	DIABETES	12	11,325	7,3126	
INSUL 4 hrs(mU/ml)	CONTROL	16	4,631	1,8643	<0,01
	DIABETES	12	11,333	6,3204	
INSUL 6 hrs(mU/ml)	CONTROL	16	3,838	2,1159	<0,01
	DIABETES	12	10,358	5,1634	
INSUL 8 hrs(mU/ml)	CONTROL	15	3,373	1,8379	<0,01
	DIABETES	12	7,825	3,6189	

Insula: Insulina (mU/ml)

Figura 10. Comparación de insulinemia durante la SOG

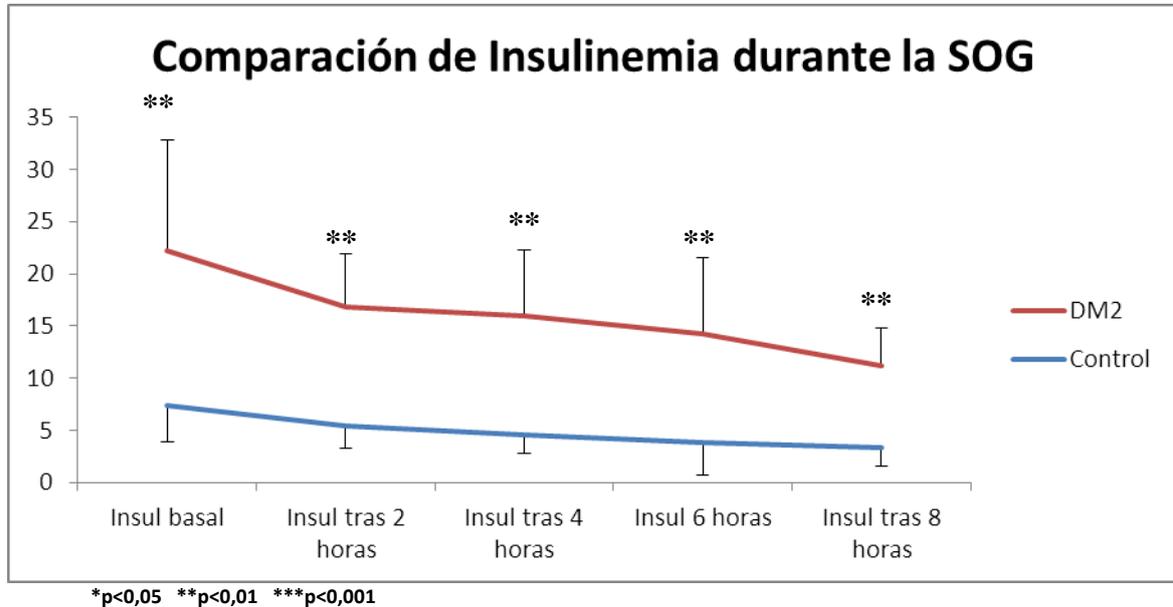
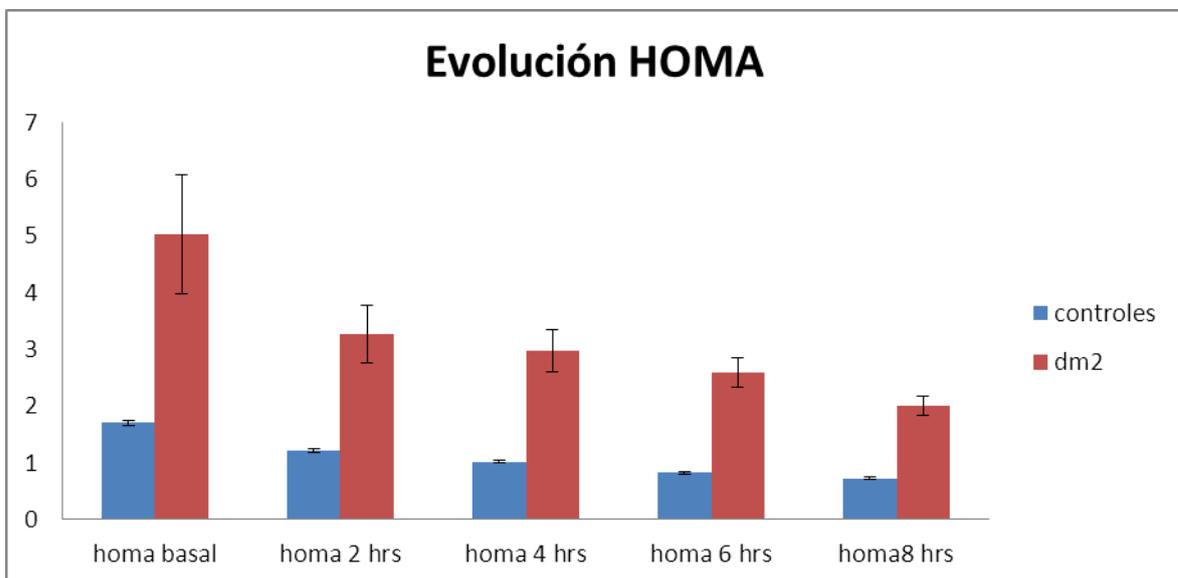


Tabla 8. Niveles de HOMA durante la realización de la prueba.

		N	Media	SD
HOMA basal	CONTROL	17	1,70102714	0,05469004
	DIABETES	16	5,02844267	1,05218328
HOMA tras 2 horas	CONTROL	18	1,21569225	0,04344731
	DIABETES	16	3,27334444	0,51397647
HOMA tras 4 horas	CONTROL	18	1,02213602	0,02633036
	DIABETES	16	2,97484254	0,36954833
HOMA tras 6 horas	CONTROL	18	0,82028958	0,02695291
	DIABETES	16	2,58796548	0,2581955
HOMA tras 8 horas	CONTROL	18	0,72223842	0,02547193
	DIABETES	16	2,00339321	0,17429695

Figura 11. Evolución de Homa Durante la prueba.



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

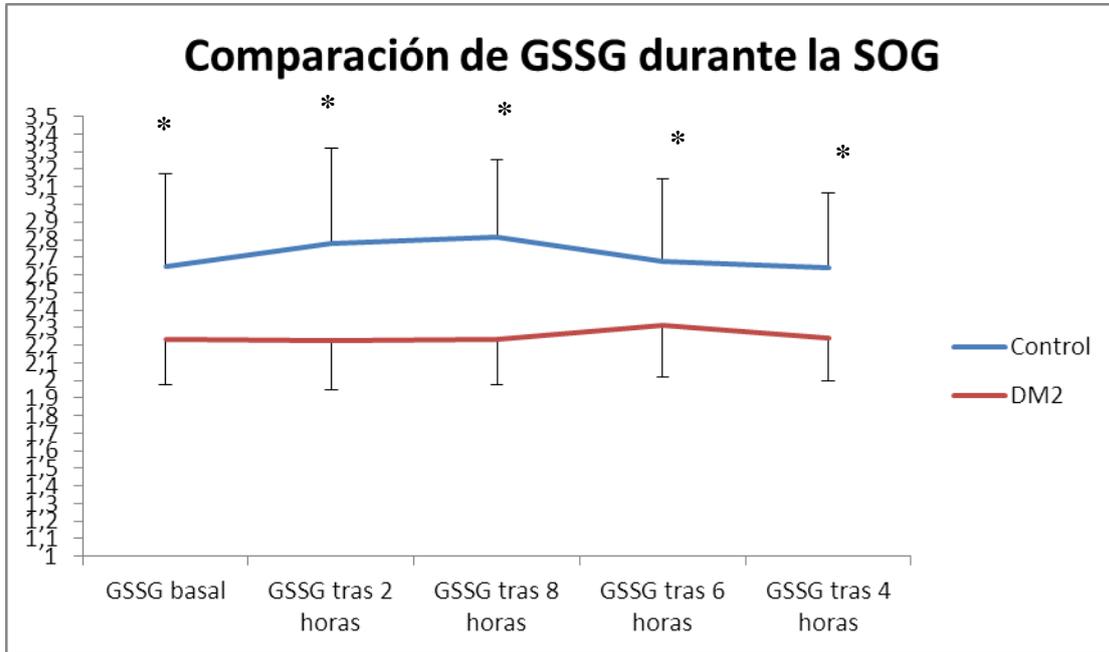
En la tablas de este apartado quedan reflejados los valores de los parámetros de oxidación del grupo completo antes y tras la SOG. Los valores obtenidos en pacientes diabéticos son superiores en todos los valores de la SOG. Estas diferencias tienen significación estadística. El único valor en el que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas es la GSSG/GSH.

Tabla 9. Comparación de GSSG entre ambos grupos durante la SOG

		N	Media	Desv. típica	p
GSSG basal(mcg/M)	CONTROL	14	2,64197	,528646	<0,05
	DIABETES	16	2,24269	,248727	
GSSG 2 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	2,77759	,540471	<0,05
	DIABETES	16	2,22289	,274320	
GSSG 4 hrs(mcg/M)	CONTROL	16	2,81271	,441515	<0,05
	DIABETES	16	2,23666	,261207	
GSSG 6 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	2,67485	,423664	<0,05
	DIABETES	16	2,31096	,290230	
GSSG 8 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	2,64753	,468218	<0,05
	DIABETES	16	2,23570	,258952	

GSSG: Glutation oxidado (mcgM)

Figura 12. Comparación de GSSG durante la SOG



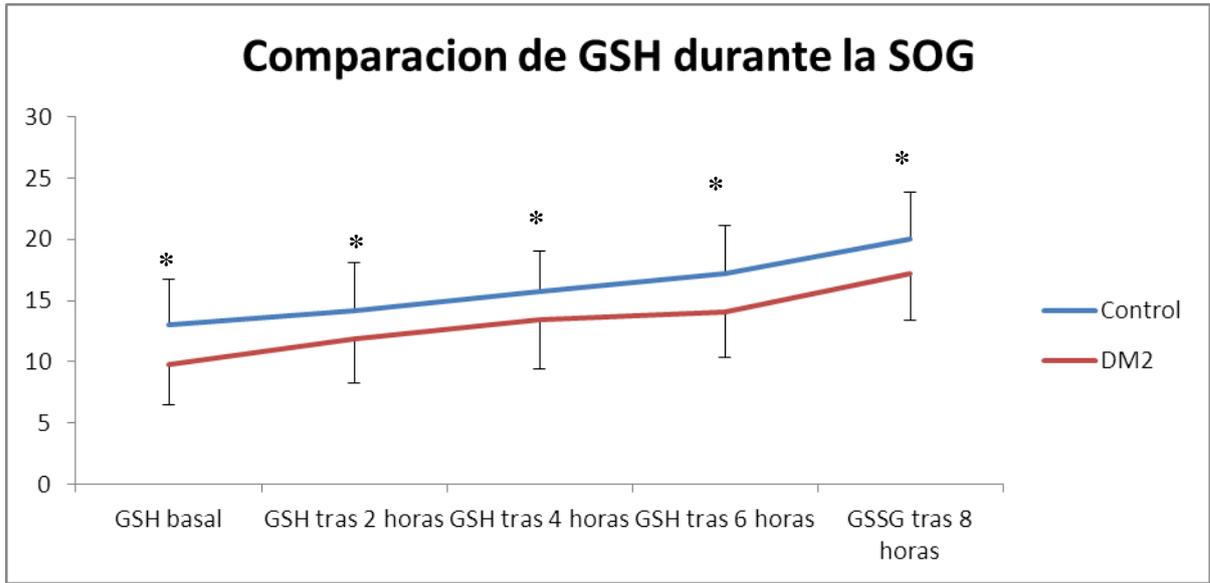
*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,00

Tabla 10. Comparación de GSH entre ambos grupos durante la SOG

		N	Media	Desv. típica	p
GSH basal(mcg/M)	CONTROL	14	12,97216	3,740994	
	DIABETES	16	9,74952	3,249955	<0,05
GSH 2 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	14,13565	4,000549	
	DIABETES	16	11,84487	3,626950	<0,05
GSH 4 hrs(mcg/M)	CONTROL	16	15,70085	3,321940	
	DIABETES	16	13,46064	4,066555	<0,05
GSH 6 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	17,24647	3,928433	<0,05
	DIABETES	16	14,07026	3,767896	
GSH 8 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	20,02292	3,834206	
	DIABETES	16	17,16253	3,740422	<0,05

GSH: Glutación reducido (mcgM)

Figura 13. Comparación de GSH durante la SOG



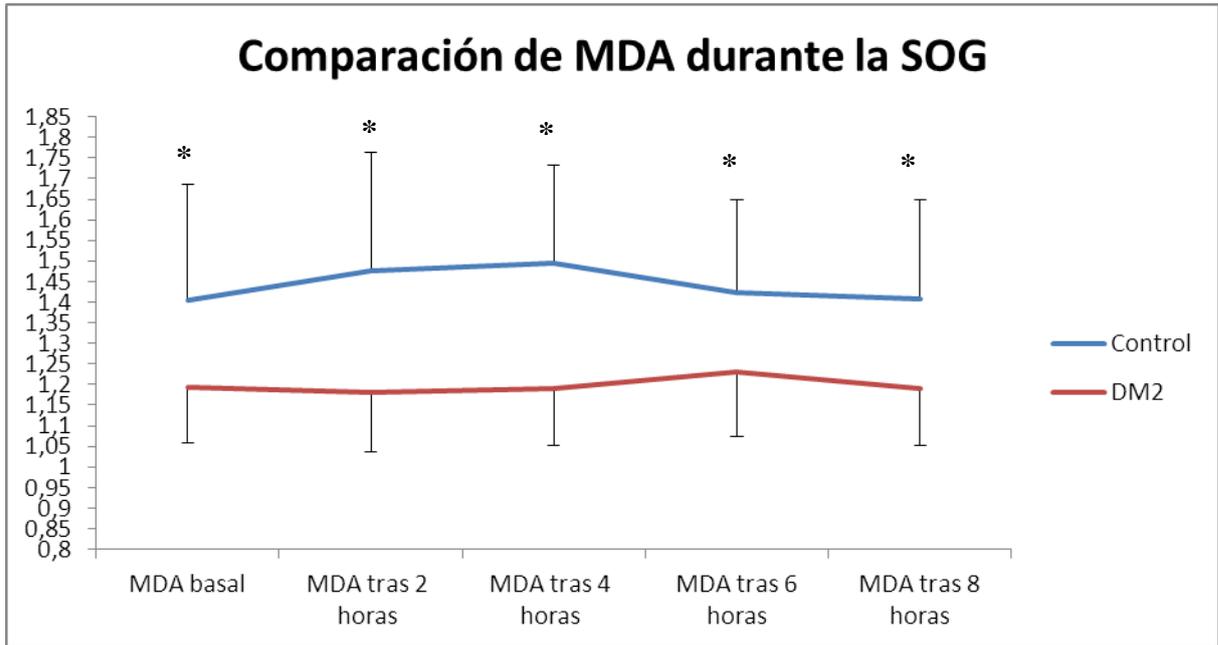
*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tabla 11. Comparación de MDA entre ambos grupos durante la SOG

		N	Media	Desv. típica	p
MDA basal (mcg/M)	CONTROL	14	1,40531	,281195	
	DIABETES	16	1,19292	,132302	<0,05
MDA 2 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	1,47744	,287484	
	DIABETES	16	1,18239	,145915	<0,05
MDA 4 hrs(mcg/M)	CONTROL	16	1,49612	,234848	
	DIABETES	16	1,18971	,138940	<0,05
MDA 6 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	1,42279	,225353	
	DIABETES	16	1,22923	,154378	<0,05
MDA 8 hrs(mcg/M)	CONTROL	17	1,40826	,249052	
	DIABETES	16	1,18920	,137740	<0,05

MDA: Malondialdehido (mcgM)

Figura 14. Comparación de MDA durante la SOG



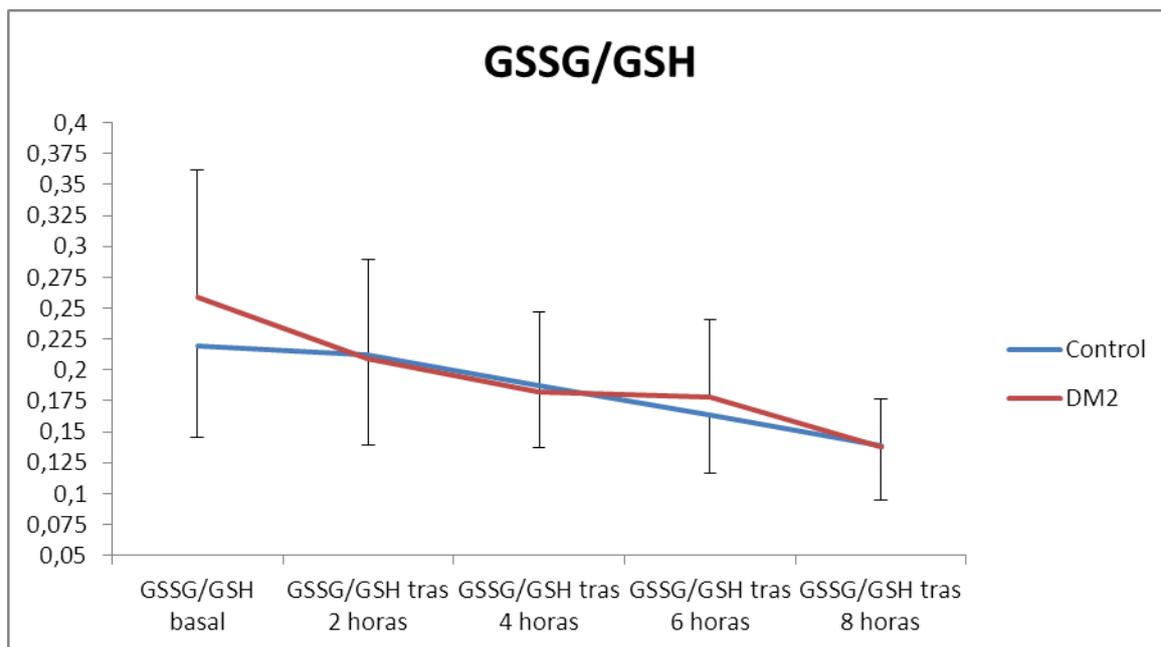
*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tabla 12. Comparación de GSSG/GSH entre ambos grupos durante la SOG

		N	Media	Desv. típica	p
GSSG/GSH basal	CONTROL	14	,2191	,07389	NS
	DIABETES	16	,2587	,10320	
GSSG/GSH 2hrs	CONTROL	17	,2117	,07228	NS
	DIABETES	16	,2088	,08087	
GSSG/GSH 4 hrs	CONTROL	16	,1874	,05061	NS
	DIABETES	16	,1824	,06486	
GSSG/GSH 6 hrs	CONTROL	17	,1635	,04715	NS
	DIABETES	16	,1782	,06198	
GSSG/GSH 8 hrs	CONTROL	17	,1390	,04481	NS
	DIABETES	16	,1375	,03941	

NS: no significativo

Figura 15. Comparación de GSSG/GSH entre ambos grupos durante la SOG

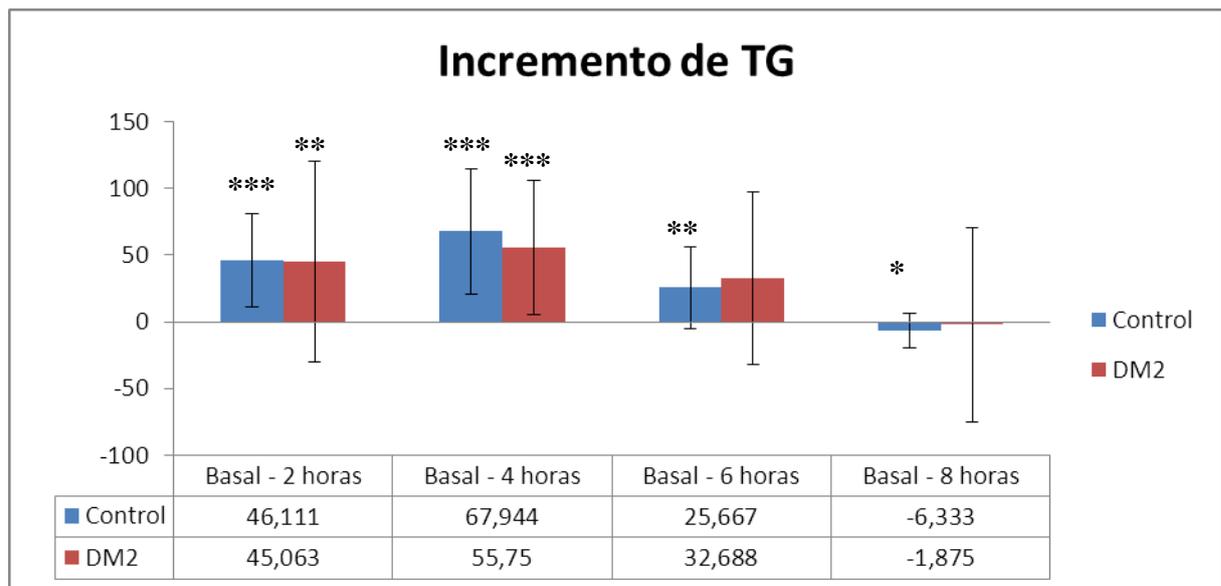


6.3.- Incrementos de los parámetros analizados en el grupo completo a nivel postprandial: controles frente a DM2.

6.3.1.- Incremento de los niveles de triglicéridos en el grupo completo

Durante la SOG los triglicéridos aumentan en ambos grupos siendo mayor el incremento en el grupo control a las dos horas. A partir de las 6 horas se objetiva en ambos grupos descenso de cifras de triglicéridos. Este descenso es más acusado en los sujetos no diabéticos. Al finalizar se objetiva en ambos grupos un descenso respecto a los niveles iniciales.

Figura 16. Incremento de triglicéridos



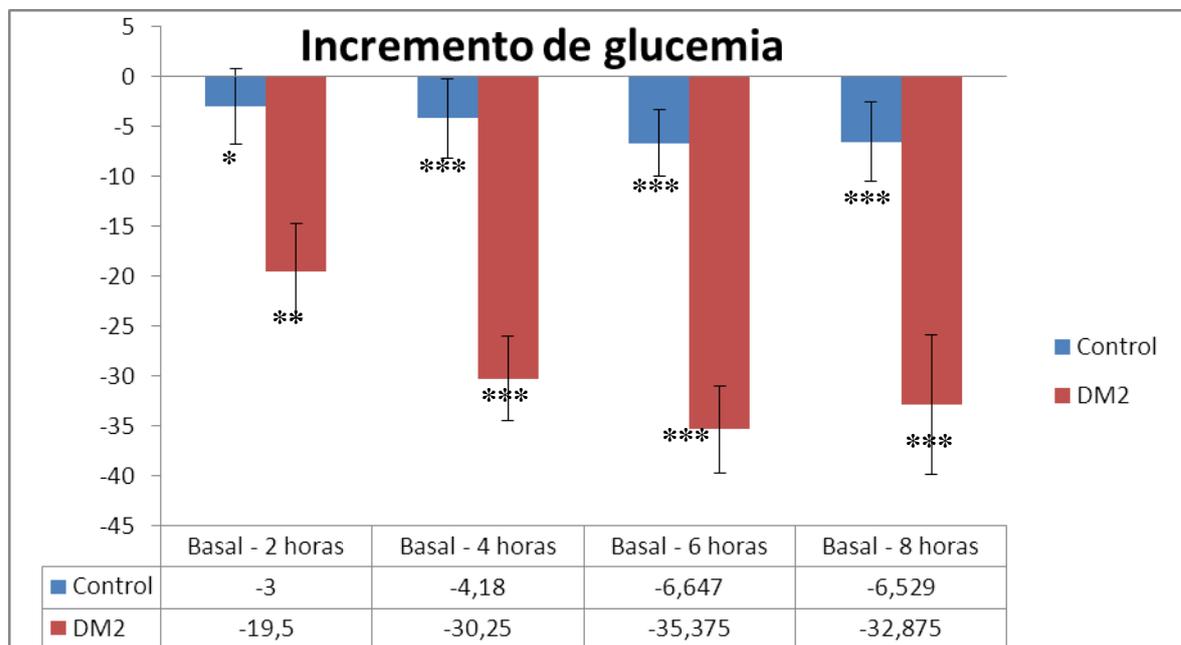
*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tg: (mg/dl)

6.3.2.- Incremento de los niveles de Glucosa, Insulina y HOMA.

La glucemia va descendiendo durante la SOG principalmente en grupo de DM2. El descenso es progresivo objetivándose el máximo descenso a las 6 horas. Los controles mantienen cifras similares de glucemia durante la realización de la prueba, aunque con descensos estadísticamente significativos con respecto al ayuno.

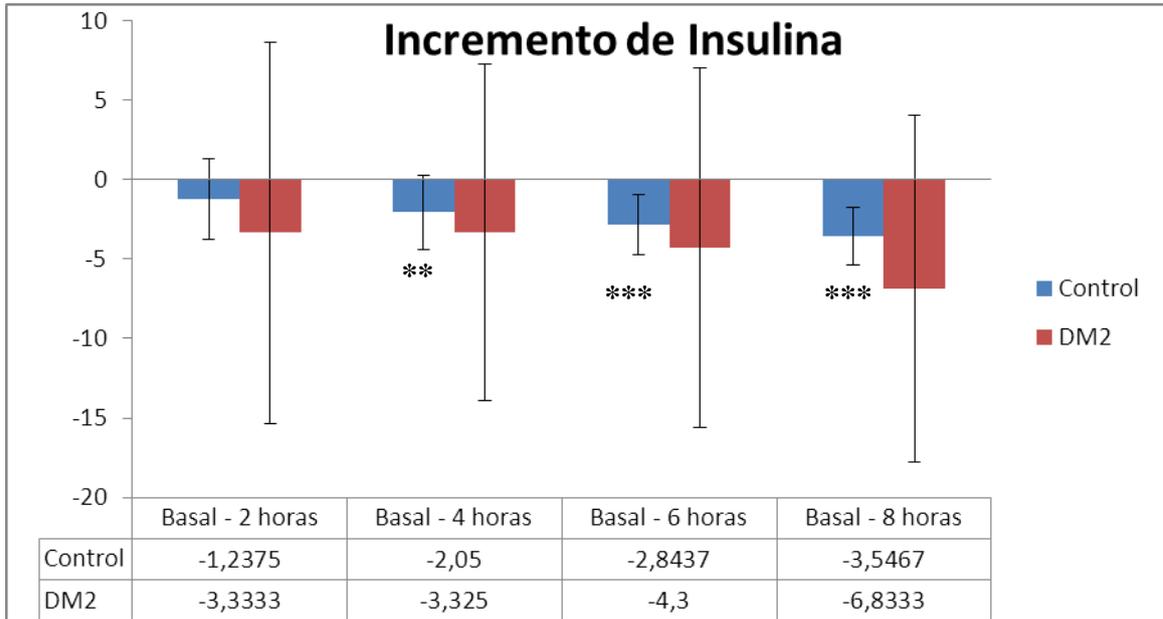
Figura 17. Incremento de glucemia



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Gluc: mg/dl

Figura 18. Incremento de Insulina

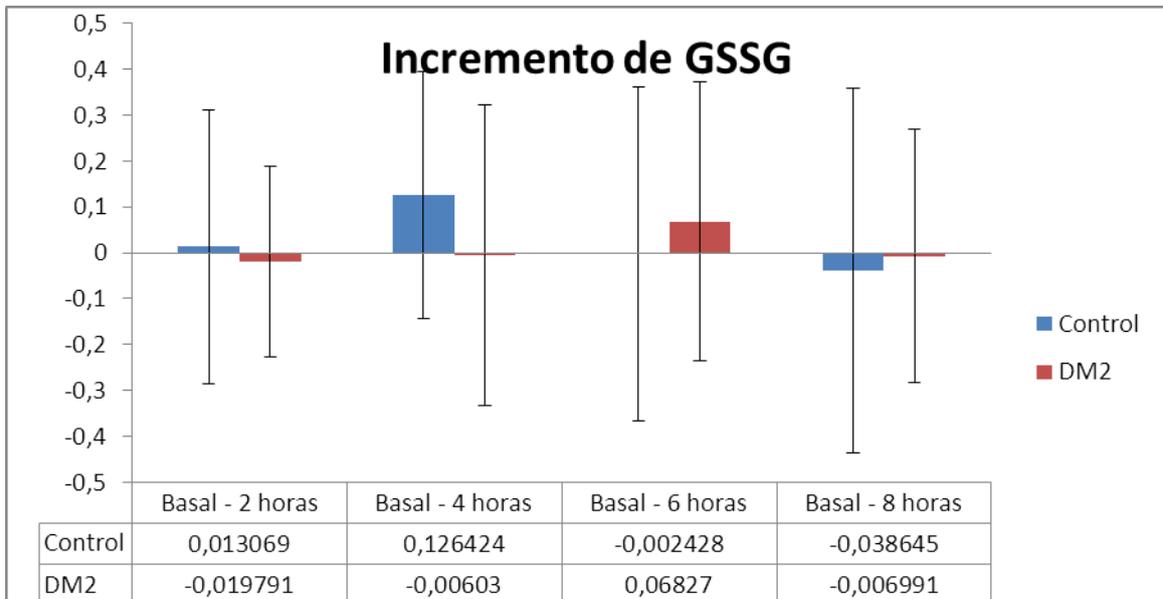


*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Insulina: mcU/ml

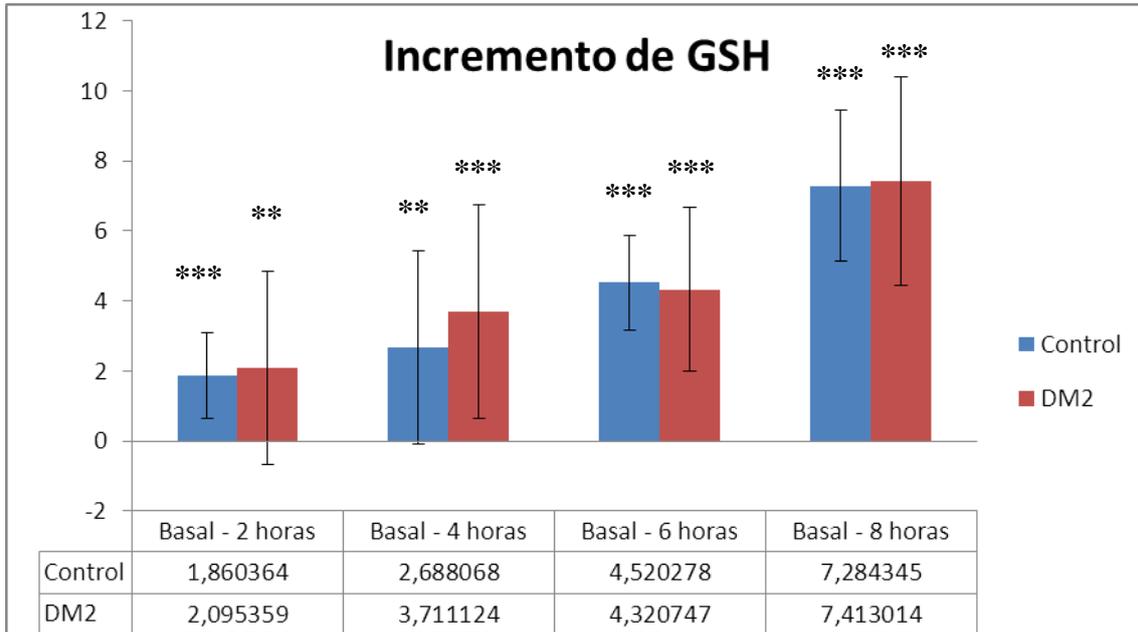
6.3.3.- Incremento en los parámetros estudiados de estrés oxidativo.

Figura 19. Incremento de GSSG



p: NS
GSSG: mcg/M

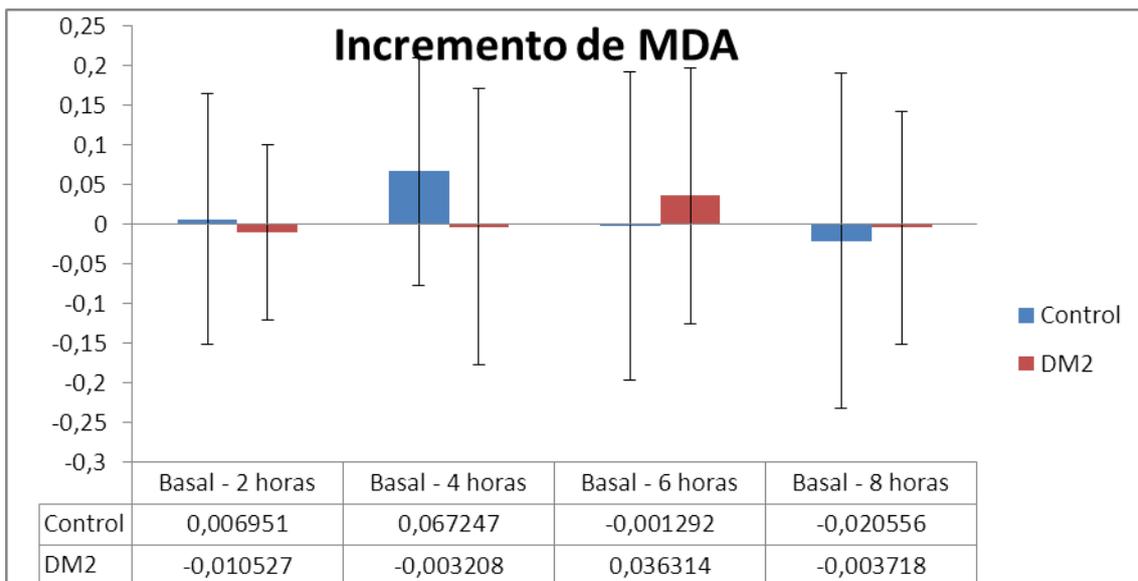
Figura 20. Incremento de GSH



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

GSH: mcg/M

Figura. 21 Incremento de MDA



p: NS

MDA: mcg/M

6.4.- Estudio de expresión de genes en linfomonocitos en situación postprandial.

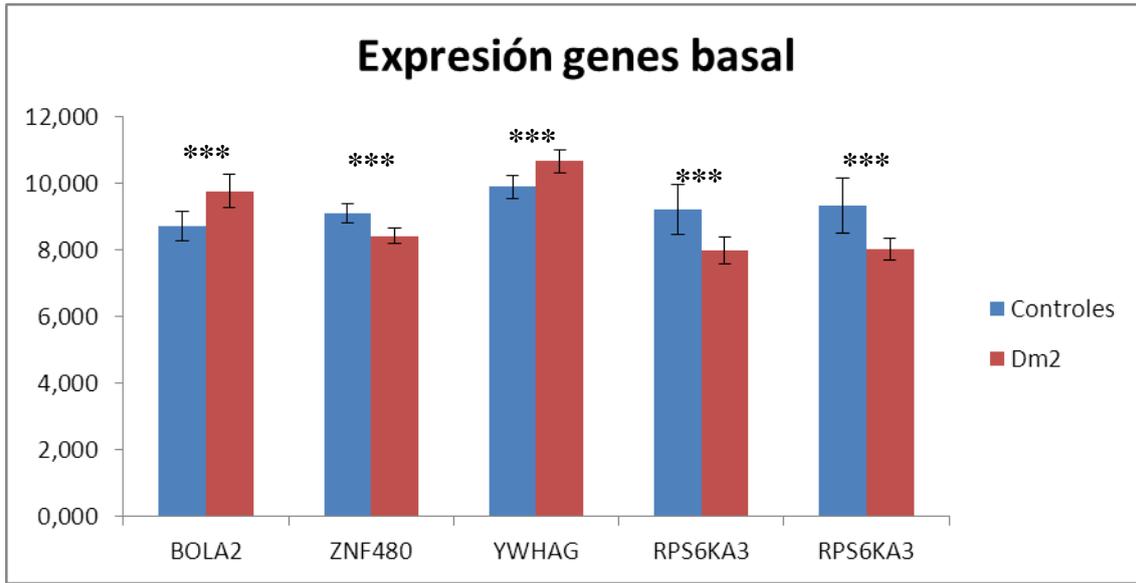
6.4.1.- Comparación de la expresión de genes en situación basal

El análisis de la expresión génica en situación basal (ayuno) y durante la sobrecarga nos aportó muchos datos. Los exámenes realizados analizan multitud de genes y arrojan gran cantidad de datos estadísticos que hemos debido sintetizar para mostrar resultados más concretos. En la Tabla 13 se muestran los 5 genes en los que se han visto mayores diferencias de expresión en situación basal entre los casos (DMT2) y los controles. Se obtuvieron diferencias significativas en otros 20 genes estudiados, pero hemos mostrado sólo aquellos con mayor significación estadística.

Tabla 13. Expresión genes en situación basal (ayuno)

Gen	Controles (media+SD)	DMT2 (media+SD)	Log FC	p
BOLA2	8.715 ± 0.454	9.774 ± 0.492	1.07	0.00000004
ZNF480	9.101 ± 0.291	8.43 ± 0.228	-0.67	0.00000016
YWHAG	9.903 ± 0.345	10.67 ± 0.339	0.77	0.00000023
RPS6KA3	9.226 ± 0.741	7.979 ± 0.412	-1.25	0.00000034
RPS6KA3	9.341 ± 0.824	8.027 ± 0.34	-1.31	0.00000004

Figura. 22 Expresión genes basal



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

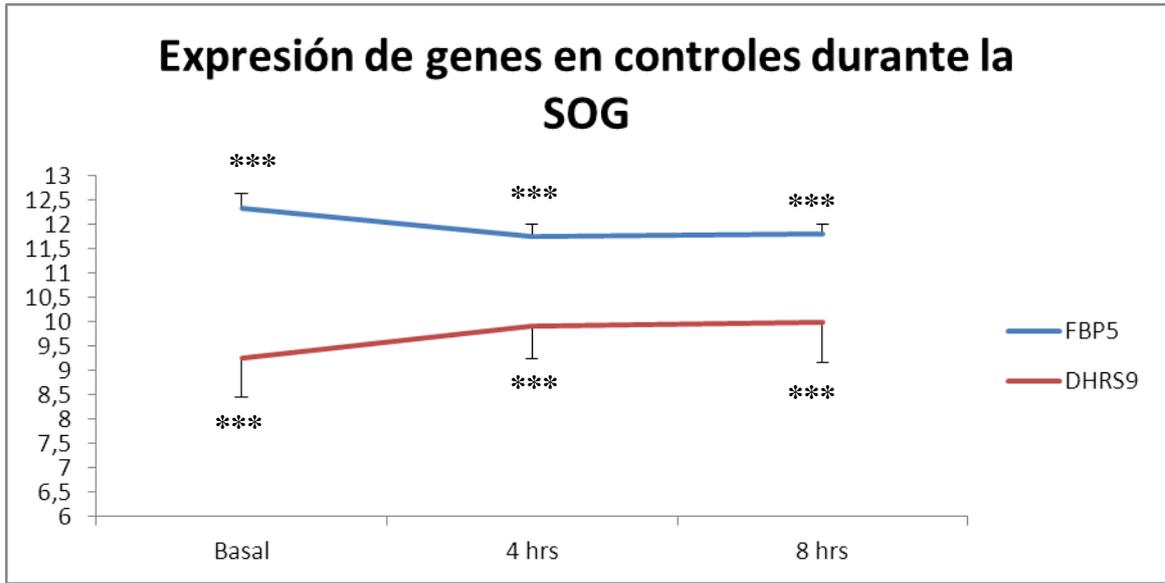
6.4.2.- Expresión de genes en linfomonocitos en el grupo control durante la SOG

En la siguiente tabla 14 se muestran los genes cuya expresión se ve modificada con mayor significación estadística durante la sobrecarga en sujetos sanos. El gen FKBP5 ve disminuida su expresión durante la SOG. El gen DHRS9 aumenta su expresión durante la SOG.

Tabla14. Expresión de genes en el grupo control durante la SOG

Controles					
	0H	4H	8H	0H vs 4H	0H vs 8H
	(media±SD)	(media±SD)	(media±SD)	p value	p value
FKBP5	12.34±0.28	11.74±0.27	11.79±0.21	0.00000002	0.0000001
DHRS9	9.25±0.79	9.92±0.67	9.99±0.84	0.00000001	0.0000001

Figura. 23 Expresión de genes en controles durante la SOG



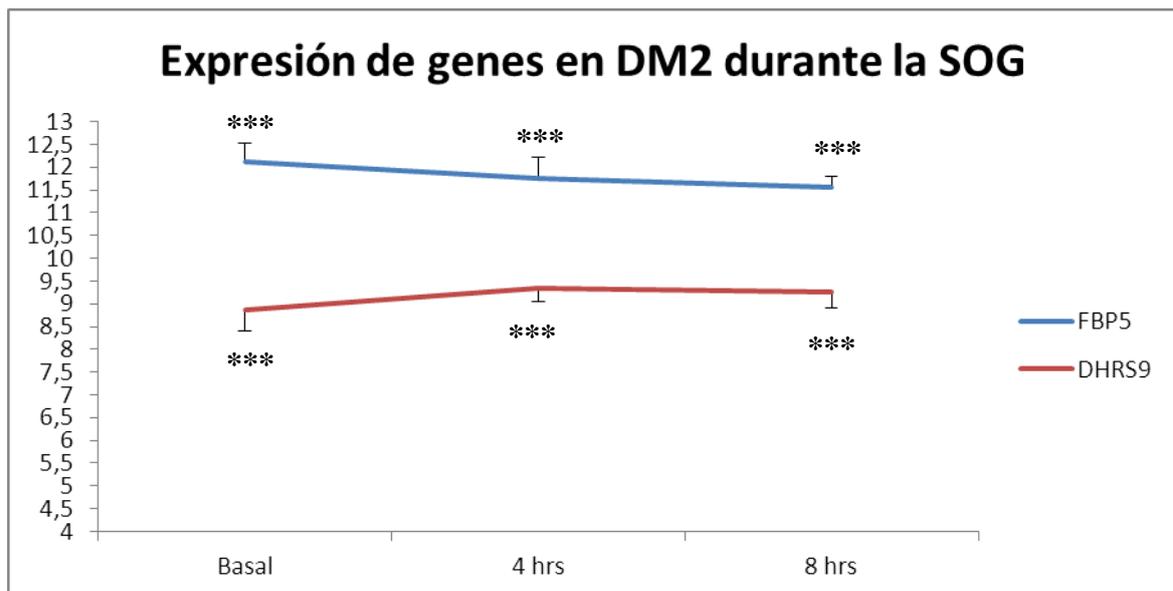
6.4.3.- Expresión de genes en linfomonocitos durante la SOG en pacientes diabéticos.

En la siguiente tabla se muestran los genes cuya expresión se ve modificada con mayor significación durante la sobrecarga en sujetos con DMT2. El gen FKBP5 ve disminuida su expresión durante la SOG. El gen DHRS9 aumenta su expresión durante la SOG. Cabe destacar que las diferencias de expresión en ambos genes son similares en ambos grupos, encontrándose a las 4 horas las diferencias de expresión mayores.

Tabla 15 Expresión de genes en DMT2 durante la SOG en pacientes diabéticos

DMT2					
	0H	4H	8H	0H vs 4H	0H vs 8H
	(media±SD)	(media±SD)	(media±SD)	p value	p value
FKBP5	12.11±0.41	11.77±0.44	11.55±0.25	-----	0,0001519
DHRS9	8.86±0.45	9.34±0.30	9.26±0.36	0,0026697	----

Figura. 24 Expresión de genes en DM2 durante la SOG



*p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

6.4.4.- Comparación de la expresión de genes durante SOG en pacientes sanos y DM2.

En la siguiente tabla se muestran la expresión de los genes en los que existe mayores diferencias entre grupos en situación basal (ayuno) y como se ve modificada su expresión durante la SOG.

Tabla 16. Expresión de genes con mayores diferencias entre grupos

CONTROL vs DM						
	Basal		4H		8H	
	Log FC	p value	Log FC	p value	Log FC	p value
RPS6KA3	-1,31	0,00000041	-1,25	0,00000034	-1,27	0,00000182
BOLA2	0,92	0,00000565	1,07	0,00000004	0,84	0,00003068
ZNF480			-0,67	0,00000016	-0,58	0,00008569

7.- Discusión

7.1.- Evaluación de la muestra

En los pacientes incluidos no se encontraron diferencias significativas en la edad entre los grupos. Esto permite comparar mejor ambos grupos ya que la edad es “per se” un factor que puede actuar como factor de confusión (119). La edad es un determinante de EO, dislipemia, diabetes e hipertensión arterial (120). Esto fue uno de las causas por las que se retrasó la selección de pacientes ya que, por lo general, el grupo control está formado por individuos de menor edad y los pacientes con DM2 son de edad más avanzada.

Entre los grupos estudiados si se obtuvieron diferencias tanto en el IMC, como en el PC y en las cifras de TA. Estas diferencias entre los grupos eran esperables, ya que existe relación directa entre obesidad y la resistencia a la insulina (121). También existen numerosos estudios que indican que el perímetro cintura abdominal es un parámetro productor de resistencia insulínica y, por tanto, de intolerancia hidrogenada (122). En cuanto a los datos obtenidos en las cifras tensionales, estos corroboran lo expuesto por otros autores. La HTA es un factor de riesgo que aparece con mayor frecuencia en los pacientes con diabetes Mellitus. La presencia de presión arterial incrementada en nuestra muestra coincide con las series publicadas en cuanto a prevalencia de HTA en población diabética (123)(124).

7.2.- Selección de pacientes

La selección de los pacientes estudiados fue determinante para la realización del proyecto. Nuestro objetivo era realizar la SOG en sujetos DM2 en los que no existieran otros factores de confusión que pudieran alterar la prueba y, por tanto, restaran validez a los resultados obtenidos.

Se excluyeron individuos que realizaran actividad física regularmente. El ejercicio físico presenta efectos sobre el metabolismo en situación de ayuno y el postprandial. Por ejemplo, el ejercicio físico disminuye la trigliceridemia y mejora el HDL colesterol. Asimismo, disminuye la insulinemia basal y el índice HOMA (125). En cuanto a la dislipemia postprandial esta se ve reducida en sujetos que realizan ejercicio en un 24-35% (115). Estos efectos parecen estar mediados por un aumento de la actividad de la LPL en sujetos que realizan actividad física regular. Por tanto, no solo se excluyeron individuos que realizaran ejercicio, si no que durante la realización de la SOG se mantuvo un reposo relativo.

Ninguno de los sujetos de ambos grupos era fumador. El tabaquismo es un potente factor de riesgo de enfermedad cardiovascular. Este actúa a diferentes niveles pudiendo alterar la interpretación de los resultados de nuestro estudio. El tabaco produce aumento de EO disminuyendo la biodisponibilidad de NO y produciendo aumento de especies reactivas. El paciente fumador también presenta cambios en la respuesta postprandial de los triglicéridos, mostrando incrementos superiores al 50 % respecto a población sana (126)(127). Otro grupo de pacientes excluidos fueron aquellos que consumían > 30 gr de alcohol diarios. Este aumenta los niveles de TG circulantes, ya que activa la secreción de VLDL, aumenta la síntesis de ácidos grasos y reduce su aclaramiento (128–130).

Se seleccionaron pacientes diabéticos de reciente diagnóstico. El tiempo de evolución de la diabetes es un factor que agrava la disfunción endotelial que conduce a la aparición de complicaciones. Buscábamos la presencia de alteraciones en expresión en pacientes con poco tiempo de evolución, sin presencia de complicaciones y sin otros fármacos que alterarían los resultados. En cuanto a los fármacos, se retiraron aquellos que afectaban a la lipemia, estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Se retiraron por tanto los hipolipemiantes, antiagregantes y antihipertensivos. En cuanto a la metformina, se mantuvo ya que actualmente, dadas las guías actuales, en cuanto el paciente es diagnosticado se le comienza a tratar con dicho fármaco. Podemos decir que el paciente diabético por el simple hecho de serlo ya debe llevar este fármaco. Actualmente es una condición casi indispensable en un paciente diabético, por tanto, creímos oportuno no retirarlo para conocer los resultados en una población real. Si se

hubiera retirado el fármaco los datos no hubieran sido extrapolables a los sujetos que existen en la consulta clínica diaria.

7.3.- Evaluación del test de sobrecarga grasa.

El preparado lipídico utilizado presenta contenidos similares de grasa a los que presenta una comida habitual (30-60 g). Si utilizamos dosis menores a 30 g no se produce efecto sobre los triglicéridos. Si empleamos dosis mayores de 80 gramos se produce un efecto exagerado sin relación dosis dependiente, saturándose la respuesta (115). Otra cuestión a tener en cuenta es la composición bioquímica del preparado. En nuestro caso, el 100% de los lípidos son LCT (TG de cadena larga). Estos entran directamente en circulación general produciendo mayor efecto sobre la trigliceridemia postprandial (131). Existen otros estudios en los que se ha utilizado comida de prueba, éstas contienen cantidades diferentes de ácidos grasos de cadena media y corta. Estos pasan a circulación portal presentando un efecto limitado sobre la trigliceridemia plasmática. Por un lado, nuestra aproximación evita los efectos de otros nutrientes en la respuesta postprandial, pero no es un aporte fisiológico.

Nuestro preparado presenta una composición basada en las recomendaciones de la NCEP-1. Es rico en ácidos grasos monoinsaturados, siendo obtenido de aceites vegetales. Nuestro preparado tampoco presenta hidratos de carbono, ni fibra. La fibra puede alterar la respuesta postprandial, ya que disminuye la absorción de los lípidos (132). La fibra también puede alterar el metabolismo glucídico, disminuyendo la excursión glucémica y los niveles de insulina (133). Los carbohidratos producen incrementos en la respuesta obtenida ya que modifican el metabolismo de las lipoproteínas. Un exceso de carbohidratos aumenta los niveles de triglicéridos circulantes.(134). Tampoco contiene antioxidantes, lo que si ocurre usando comidas de prueba ricas en alimentos con mono o poli insaturados, que llevan asociados antioxidantes naturales como flavonoides o vitamina E.

Tabla 17. 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 poli insaturados; n-3: ácidos grasos de la serie omega 3; n-6: ácidos grasos de la serie omega 6.

7.4.- Evaluación de lipemia basal y postprandial

Los datos bioquímicos obtenidos en ayunas coinciden con lo descrito como dislipemia diabética en diferentes publicaciones. Esta se caracteriza por la presencia de colesterol discretamente aumentado, hipertrigliceridemia y HDL colesterol bajo (27). Por lo tanto, nuestra muestra de pacientes diabéticos presenta las características basales esperadas en el patrón lipídico (30).

Como se objetiva en la figura 7, los valores de triglicéridos no sólo son mayores en los pacientes diabéticos en situación basal, si no que estos presentan mayor incremento en situación postprandial tras SOG. Los niveles más altos se objetivan a las 4 horas en ambos grupos (47,48). A partir de este punto se produce un descenso en la trigliceridemia. Al final de la prueba ambos grupos presentan valores de triglicéridos más bajos que los basales

El resto de parámetros lipídicos estudiados (CT, cLDL, cHDL) no presentaron cambios significativos en sus concentraciones plasmáticas tras SOG. Estos resultados también coinciden con lo encontrado en otros estudios (43)(135). La respuesta lipídica tras sobrecarga oral grasa suele producir escasas alteraciones en los niveles de colesterol (136). En contra, en situación postprandial se produce un incremento de los triglicéridos

circulantes. Esta hipertrigliceridemia en periodo postprandial es mayor en pacientes con DM2.(137)

7.5.- Metabolismo glucídico

Al realizar la prueba también estudiamos los parámetros del metabolismo glucídico. Como es de esperar, los pacientes con DM2 presentan niveles de glucemias mayores que los pacientes sanos, siendo los valores medios en ambos grupos de 136,56 mg/ y 93,59 mg/dl respectivamente. Estas diferencias son significativas. A lo largo de la prueba se produce un descenso progresivo en ambos grupos. Este descenso se produce en ambos siendo la caída total de la glucemia de 35,375 mg/dl en pacientes DM2 y de 6,647 mg/dl en controles. El mayor descenso se objetiva a las 6 horas de la prueba, presentando un mínimo repunte a las 8 horas. Es importante destacar que la caída es mayor en los pacientes diabéticos, presentando diferencias significativas en todos los puntos de la prueba (Ver figura.10)

Los resultados obtenidos en los niveles de glucosa deben ser estudiados conjuntamente con la evolución de la insulinemia durante el test. Como es conocido, los niveles de insulinemia basal son mayores en los DM2 frente a controles (14,913 vs 7,361). Estas diferencias son significativas y mantienen la potencia estadística durante las 8 h del estudio. Al igual que ocurre con la glucemia, los niveles de insulina descienden paulatinamente a medida que transcurre el ensayo en ambos grupos (6,833 vs 3,5467). Esta disminución es mucho mayor en pacientes con DM2 y esta se da a las 8 h del examen.

Para analizar los datos conjuntamente, debemos calcular el HOMA a lo largo del test. Como se objetiva en la tabla 7, y como era de esperar con los datos mostrados de glucemia e insulina, los valores de HOMA son también mayores en los pacientes con DM2. Asimismo, durante la realización del examen, se objetiva un descenso en ambos grupos siendo este decremento superior en los pacientes con alteración del metabolismo glucosado.

Por tanto, teniendo en cuenta los datos observados en nuestro proyecto, objetivamos que la SOG produce una mejora de los niveles de glucemia e insulinemia. De esto se deduce la mejora de la insulinresistencia en situación postprandial. Nuestros resultados coinciden con otros estudios ya realizados. Estos también prueban que los niveles de resistencia a la insulina mejoran en situación postprandial(138)(139). Existen estudios poblacionales que muestran niveles de HOMA más bajos en relación con la presencia de ácidos grasos monoinsaturados en el plasma de los pacientes estudiados. Existen trabajos que apoyan la mejora de la RI con ácidos grasos monoinsaturados tanto en población obesa (140)(141) como en adultos diabéticos (142). Por otra parte, existen estudios, que muestran aumento de la resistencia a la insulina tras sobrecarga grasa tanto oral como intravenosa (143). Por tanto, debe existir un efecto mediado por la composición de la grasa que mejore la RI. Según postula Wuesten et al (138,139), la administración de una sobrecarga oral grasa mejora también la función de la célula beta. Otros apuntan a que esta mejora de la RI se debe a un efecto mediado por la NAPH oxidasa 4 (144). También se ha estudiado la vía de las proteínas acopladas a proteína G como responsable de este mecanismo, esto se ha comprobado en estudios experimentales en ratas (145), concediendo especial importancia a las vías GPR120 y GPR40, las cuales se veían activadas en ratas alimentadas con dietas ricas en omega 3 y omega 9. Estas vías producían no solo descensos en la RI, sino mejoría en la inflamación, niveles de IL 10 y de infiltración por macrófagos.

Otro mecanismo propuesto, es el efecto de los ácidos grasos monoinsaturados sobre el transportador GLUT 4. Este ve incrementados sus niveles en presencia de omega 3, pero no en presencia de aceite de oliva (146) (147). Asimismo, a nivel muscular, los omega 3 producen mejoría de la señalización de la insulina(148).

7.6.- Estrés oxidativo

En el test realizado se han analizado también diferentes parámetros de EO en ambos grupos. Los niveles en ayunas muestran como en población diabética los niveles de GSH son inferiores que en población sana. Las diferencias obtenidas en nuestro trabajo son estadísticamente significativas. Estos resultados muestran que el paciente diabético presenta, en condiciones basales, consumo de glutatión y, por tanto, un nivel aumentado de EO. Esto coincide con otros estudios publicados en los que se objetiva un descenso de GSH en población diabética (149–151). En estos estudios no solo se objetiva descenso de GSH, sino la presencia de otros factores de EO en pacientes con diabetes. Estas alteraciones se concretan en un aumento en los niveles de MDA, descenso de actividad en las enzimas antioxidantes como la glutatión sintetasa y la glutatión reductasa. Los pacientes con diabetes presentan mayor actividad en la SOD. El descenso del GSH y el aumento del GSSG en población diabética y por tanto un aumento del ratio GSSG/GSH (152,153). Existen factores por la propia enfermedad que modulan el EO, en este sentido se objetiva, que el descenso de GSH es mayor en relación a los valores de Hemoglobina glicosilada.(149). En esta publicación no se encontró correlación entre EO y duración de la DM. Hakki et al no solo evidencia que los valores de GSH son menores en población diabética, si no que estos son todavía más bajos en los pacientes con retinopatía. Los niveles son similares en pacientes con microalbuminuria y con normoalbuminuria.(151). En nuestro grupo, las diferencias de GSH posiblemente sean menores, ya que se trata de pacientes sin complicaciones.

Durante la SOG, existe un incremento de GSH en ambos grupos, aunque el mayor ascenso se objetiva en población diabética. (7,2 vs 7,4). Este incremento en los valores de GSH es debido al efecto positivo de los ácidos grasos insaturados sobre el EO. Este efecto también ha sido descrito en otros estudios. Nosotros observamos este efecto beneficioso en sujetos con hipercolesterolemia familiar(99). Este efecto también se ha encontrado en estudios de intervención dietética (154–156). En estos estudios se objetiva mejoría no solo de la GSH, si no del resto de parámetros de EO estudiados en

nuestra prueba. Sin embargo, en trabajos donde se ha utilizado grasa saturada se han objetivado aumentos en los parámetros de EO (157–159).

Otro parámetro estudiado es el GSSG. Este parámetro es mayor en los controles lo que indica mayor consumo de glutatión. Lo observado habitualmente en población diabética es un aumento de los niveles de GSSG que conduce a un ratio GSSG/GSH mayor (152,153). En nuestro estudio los niveles de GSSG no son mayores en los casos, aunque si valoramos la ratio GSSG/GSH, ésta es mayor en población con DM (0,21vs 0,29). Este resultado pensamos que se debe a que los pacientes incluidos en nuestro estudio mantuvieron el tratamiento con metformina. Existen multitud de estudios, que muestran un papel beneficioso de este fármaco sobre el EO. Se ha visto como en ratas tratadas con metformina aumenta la actividad de la glutatión peroxidasa, de la SOD y de la catalasa (160). En este mismo trabajo, se objetivaron descensos de la MDA en ratas tratadas con metformina. Existen otros autores que demuestran incrementos de GSSG y mejoras de la ratio con metformina a nivel de hipocampo previniendo empeoramiento de la memoria (161). Otros trabajos también apuntan hacia el efecto sobre las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARs), disminuyendo sus valores. La metformina reduce sus niveles en el sistema nervioso central (162), a nivel hepático mejorando los valores de catalasa (163) y en tejido renal (164,165). Existen también trabajos en pacientes con síndrome de ovarios poliquísticos (SOP) en los que la metformina tuvo un papel beneficioso sobre el EO. En este estudio, se demuestra que la metformina disminuye el MDA y aumenta el óxido nítrico en pacientes con SOP (166). También existen estudios en pacientes diabéticos, que observan descenso de MDA con metformina (167,168). Por tanto, existe multitud de estudios que demuestran el efecto beneficioso de la metformina sobre el EO, ya que esta mejora la ratio GSSG/GSH, activa la catalasa, la glutatión reductasa, disminuye los niveles de MDA y aumenta el óxido nítrico.

Otro parámetro estudiado en nuestro trabajo fue el MDA. En condiciones basales y según lo descrito en la bibliografía, los niveles de MDA en el paciente diabético están aumentados (149,150,169,170). Los pacientes con nefropatía diabética presentan niveles mayores de MDA (150). En contra, los valores no aumentan en pacientes con

retinopatía diabética frente a pacientes diabéticos sin alteraciones oculares (171). Parece, por tanto, que los niveles de MDA se relacionan más con daño renal, y el decremento de GSH con la retinopatía.

En nuestro test, los niveles de MDA encontrados son mayores en el grupo control (1,4vs 1,1). Esta diferencia no esperable pensamos, que se debe al efecto beneficioso que tiene la metformina sobre los niveles de MDA descrita en párrafos anteriores.

La evolución de los niveles de GSSG y de MDA durante la prueba, pueden haber estado influenciados por la metformina. Cabe destacar que en el grupo control existe un aumento a las 4 horas de los niveles de GSSG que se normaliza a las 8 horas del examen. Esta misma evolución la presentan los niveles de MDA durante la prueba. Presenta un incremento hasta las 4 horas, volviendo a niveles similares a los basales al finalizar el test.

En cuanto a la ratio GSSG/GSH presenta claramente una mejoría en ambos grupos durante la SOG. Este descenso se produce en ambos grupos y está relacionado con la mejora de los niveles de GSH descrita anteriormente y por el probable efecto de la metformina sobre los valores de GSSG.

En conclusión, nuestros datos coinciden con lo publicado respecto a GSH y GSSG/GSH, ya que nuestros datos muestran niveles inferiores de GSH en población con DM. Tras la SOG con monoinsaturados se produce una mejora en ambos grupos lo que conduce al descenso de la ratio GSSG/GSH.

Los datos obtenidos de GSSG y MDA probablemente están influidos por la toma de metformina en los pacientes incluidos en el estudio. De este modo, nuestros resultados apoyarían el papel antioxidante que parece presenta la metformina independiente de su papel hipoglucemiante. Papel que como hemos demostrado ha sido mostrado en otros estudios previos.

Cabe destacar, que otro factor de confusión que pudiera haber afectado nuestros resultados, es el tratamiento con estatinas. Como se ha remarcado en el apartado de métodos, los pacientes que tomaban dicho fármaco fueron sometidos a un periodo de lavado previo al estudio. Este periodo de lavado lo consideramos suficiente y no creemos que las estatinas pudieran haber influido. No obstante, destacar que las estatinas presentan un efecto beneficioso sobre el EO como se muestra en multitud de trabajos (172–179).

7.7.- Expresión genes implicados

En el estudio de expresión génica se han analizado numerosos genes, ya que fue un despistaje utilizando chips que permiten el estudio de hasta 30.000 genes. En la tabla 13 se muestran sólo aquellos genes cuya expresión presenta las mayores diferencias estadísticas entre ambos grupos estudiados. Esta diferencia de expresión puede tener un valor tanto positivo como negativo. Los genes BOLA2 y YWHAG presentan mayor expresión en pacientes diabéticos. Por otra parte, en los genes ZNF480 y RPS6KA3 se objetiva mayor expresión en sujetos sanos.

El gen BOLA2 se encuentra dentro de una región de una duplicación segmental en el cromosoma 16p (16p11.2). Este gen codifica la proteína Bola-like 2. Las proteínas bola-like parecen estar involucradas en la proliferación celular o la regulación del ciclo celular. La secuenciación de este gen se realizó en julio de 2008 (180) y existe poca información en cuanto a su papel.

Diferentes estudios sugieren un papel del gen en el estrés oxidativo (181,182), actuando a través de la glutaredoxina. También se ha visto que ejerce una función en el metabolismo intracelular del hierro en humanos (183,184) siendo responsable de unir centros de hierro-azufre. Las glutaredoxinas son pequeñas enzimas redox que se caracterizan por utilizar glutatión como cofactor, actúan como mecanismos de defensa antioxidantes. Esta reducen deshidroascorbato, peroxiredoxinas, y a la metionina

sulfóxido reductasa (185–187). Por tanto, el aumento de expresión el gen BOLA2 en pacientes diabéticos puede interpretarse como una necesidad de antioxidantes para equilibrar el EO producido y el consumo de glutatión propio de la patología.

El gen YWHAG se encuentra en el cromosoma 7 (7q11.23) y su expresión supone la síntesis de la familia de las proteínas 14-3-3 (188). Esta es una proteína que media señales de traducción uniéndose a proteínas con fosfatidilserina (189). Se expresa en cerebro, músculo esquelético y corazón. Se ha demostrado que interactúan con RAF1 y proteína quinasa C, proteínas implicadas en diversas vías de transducción de señal (190).

Su detección tiene importancia clínica en cuadros neurológicos como trastornos del comportamiento, epilepsia (191) y síndrome de Williams-Beuren (192). También se ha visto relacionado con procesos cardiacos como la cardiomegalia (193). También se postula su implicación con procesos de mantenimiento de los telómeros y de longevidad (194).

La relación con este gen con la fosfatidilserina podría tener relación en DM2, ya que se han visto alteraciones en la organización lipídica de los eritrocitos como resultado de la disfunción endotelial propia de DM2. Esta alteración de la estructura lipídica de los eritrocitos los hace más propensos a la adhesión endotelial (195–197).

En contrapartida se encuentran los genes ZNF480 y RPS6KA3. Ambos presentan mayor expresión en población no diabética.

El gen ZNF480 sintetiza la zinc-finger-protein 480. Este gen se sitúa en el cromosoma 19 (19q13.41) (198). Esta proteína se encuentra en muchos factores de transcripción. Se postula que tiene un papel en el desarrollo del corazón, así como en la aparición de patologías cardiacas. En los tejidos adultos, la expresión de ZNF480 se encuentra en el corazón, músculo esquelético, páncreas y placenta. La sobreexpresión de ZNF480, activa la actividad transcripcional de AP-1 y la SRE. Por tanto, ZNF480 puede actuar

como un regulador positivo en las vías de señalización de MAPK a través de la activación de AP-1 y SRE (199).

También ha sido un gen que se ha implicado con el desarrollo de la esquizofrenia (200), aunque actualmente no existen datos que apoyen esta relación.

El gen RPS6KA3 se localiza en el cromosoma X (Xp22.12) (201) y codifica un miembro de las RSK (quinasas R6 ribosómicas). Estas pertenecen a la familia de serina / treonina quinasas. Esta quinasa contiene 2 dominios catalíticos no idénticos y fosforila varios sustratos, incluyendo la MAPK. La actividad de esta proteína ha sido implicada en el control del crecimiento y la diferenciación celular. Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de Coffin-Lowry (CLS) (202–205). Su secuenciación se realiza en julio de 2008.(206)

Como se ha descrito, ambos genes presentan un papel en la activación de la vía MAPK. En el caso del gen ZNF480 su activación se realiza a través de AP-1 y SER mientras que en RPS6KA se activa a mediante la quinasa R6 ribosómica. Esta vía de señalización implica también a la insulina y ha sido relacionada con insulinresistencia.

Tras la sobrecarga se objetivaron cambios en la expresión de diferentes genes estudiados. Los genes cuya expresión se vio modificada en mayor medida fueron los genes FKBP5 y DHRS9

El gen FKBP5 se sitúa en el cromosoma 6 (6p21.31) (207,208). Este gen codifica la proteína FKBP5. Esta pertenece a la familia de las inmunofilinas. Tienen un papel en la inmunorregulación y en el plegamiento de proteínas. Esta proteína es diana en el tratamiento con inmunosupresores como la FK506, la rapamicina o los corticoides. Esta función se ejerce a través de la inhibición de la calcineurina (209).

Los estudios genéticos han identificado que FKBP5 tiene importancia clínica en procesos psiquiátricos tales como el trastorno por estrés postraumático, la ansiedad, la depresión y el trastorno bipolar. (209–213). También se le ha relacionado con el cáncer

,ya que se encuentra en vías oncogénicas y de quimioresistencia (214). También es hipotética su relación como vínculo común en patologías como la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico y la depresión. Se postula que estas patologías, que en muchos casos coexisten, tienen un nexo común. Esta vía común se relaciona con este gen y su relación con la vía neuroendocrina del cortisol (215). Se postula su relación en la génesis de obesidad en pacientes con estrés psicológico. En esta línea se ha visto que su sobreexpresión aumenta en tejido adiposo tras la exposición a dexametasona. Esto podría explicar su relación con la insulina-resistencia mediada por corticoides (216). Se postula su relación con obesidad, ya que su sobreexpresión a nivel hipotalámico se vincula con ganancia de peso en situaciones de estrés. Por tanto, parece tener una función en la regulación metabólica. La expresión del gen también es modificable con la dieta (213,217,218). De este modo su expresión aumenta en ayunas y se suprime con la alimentación.

En ambos grupos estudiados, el gen disminuyó su actividad. Esta regulación negativa con la dieta rica en grasa coincide con lo descrito en la bibliografía aportada. Este descenso en la expresividad de un gen relacionado con la obesidad puede ser un efecto beneficioso de la grasa dietética. Este efecto podría tener aplicación clínica como posible diana terapéutica y así personalizar el tratamiento dietético de la obesidad y la diabetes.

El gen DHRS9 se encuentra en el cromosoma 2 (2q31.1). Este gen codifica una deshidrogenasa de cadena corta que presenta actividad oxidorreductasa hacia hidroxiesteroides (219).

Se le relacionado clínicamente en el cáncer de colon, teniendo su regulación un valor pronóstico (220,221). También se ha le relación en la infección por virus de Epstein-Barr (222).

Otra relación importante es que su expresión es regulada según la cantidad de grasa de la dieta. Estudios en ratas muestran que una dieta rica en grasas influye en la actividad de las deshidrogenasas aumentando su expresión en riñón y tejido adiposos y

disminuyendo su actividad a nivel hepático. Esta modificación dio como resultado que aumentaran los niveles de retinol a nivel renal y tejido adiposo (223). Vemos por tanto que el gen DHRS9 se ve implicado principalmente en procesos de EO. Al igual que con FKBP5 su expresión se ve modificada según la dieta. En nuestro estudio se aprecia un aumento de la expresión durante la SOG. Esto puede ser uno de los mecanismos que modula el EO durante la SOG.

8- Conclusiones

- 1. Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan un mayor descenso postprandial de los valores de estrés oxidativo que los sujetos control. Lo que indica el efecto beneficioso de la grasa insaturada en los marcadores de estrés oxidativo postprandiales.**
- 2. La expresión de genes en situación basal es diferente en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 que en los controles. Los genes BOLA2 y YWHAG presentan mayor expresión en pacientes diabéticos. Por otra parte, los genes ZNF480 y RPS6KA3 presentan mayor expresión en sujetos sanos. La implicación fisiopatológica de estos resultados no es bien conocida.**
- 3. Tras la sobrecarga, se objetivaron cambios en la expresión de los genes FKBP5 y DHRS9 tanto en sujetos sanos como en los pacientes diabéticos. La expresión de ambos genes está relacionada con la ingesta y por tanto es plausible la interacción postprandial de estos con la grasa insaturada.**

Nuestra hipótesis de trabajo es que la grasa insaturada debe disminuir el EO postprandial y que la expresión de ARN de linfomonocitos debe ser diferente en sujetos con DM2 frente a la de sujetos control.

Por tanto, confirmamos la respuesta postprandial del EO y la diferente expresión de genes en ayuno. No encontramos diferencias en la expresión de genes en fase postprandial en ambos grupos estudiados.

Referencias bibliográficas

1. Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121(7):e46-215.
2. Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens*. 1994;7(7 Pt 2):7S - 12S.
3. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
4. DAWBER TR, KANNEL WB. An epidemiologic study of heart disease: the Framingham study. *Nutr Rev*. 1958;16(1):1-4.
5. Stamler J, Neaton JD, Cohen JD, Cutler J, Eberly L, Grandits G, et al. Multiple risk factor intervention trial revisited: a new perspective based on nonfatal and fatal composite endpoints, coronary and cardiovascular, during the trial. *J Am Heart Assoc*. 2012;1(5):e003640.
6. Lloyd-Jones DM, Dyer AR, Wang R, Daviglius ML, Greenland P. Risk factor burden in middle age and lifetime risks for cardiovascular and non-cardiovascular death (Chicago Heart Association Detection Project in Industry). *Am J Cardiol*. 2007;99(4):535-40.
7. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1997;20(7):1183-97.
8. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33 Suppl 1:S62-9.
9. Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nat Med*. 2006;12(1):62-6.
10. Genuth S, Alberti KGMM, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26(11):3160-7.
11. Soriguer F, Goday A, Bosch-Comas A, Bordiú E, Calle-Pascual A, Carmena R, et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose regulation in Spain: the Di@bet.es Study. *Diabetologia*. 2012;55(1):88-93.
12. Catala M; Girbes J et al. Estudio Valencia: Investigación de la prevalencia de Diabetes Mellitus y Síndrome Metabólico. 2010
13. Sicree R, ShawJE, Zimmet PZ. The global burden of Diabetes. *Diabetes Atlas*. 2003;2n ED:15-71.
14. Goday A. [Epidemiology of diabetes and its non-coronary complications]. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55(6):657-70.
15. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*. 1999;48(5):937-42.

16. Ametov AS, Kulidzhanian NK. [Diabetes mellitus is an independent risk factor for cardiovascular disease]. *Ter Arkhiv.* 2012;84(8):91-4.
17. Yamagishi S. Cardiovascular disease in recent onset diabetes mellitus. *J Cardiol.* 2011;57(3):257-62.
18. Mykkänen L, Kuusisto J, Pyörälä K, Laakso M. Cardiovascular disease risk factors as predictors of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in elderly subjects. *Diabetologia.* 1993;36(6):553-9.
19. Kuusisto J, Mykkänen L, Pyörälä K, Laakso M. Non-insulin-dependent diabetes and its metabolic control are important predictors of stroke in elderly subjects. *Stroke J Cereb Circ.* 1994;25(6):1157-64.
20. Gu K, Cowie CC, Harris MI. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care.* 1998;21(7):1138-45.
21. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mähönen M, Niemelä M, Haffner SM, et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The FINMONICA Myocardial Infarction Register Study Group. *Diabetes Care.* 1998;21(1):69-75.
22. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339(4):229-34.
23. U.K. Prospective Diabetes Study 27. Plasma lipids and lipoproteins at diagnosis of NIDDM by age and sex. *Diabetes Care.* 1997;20(11):1683-7.
24. You RX, McNeil JJ, O'Malley HM, Davis SM, Thrift AG, Donnan GA. Risk factors for stroke due to cerebral infarction in young adults. *Stroke J Cereb Circ.* 1997;28(10):1913-8.
25. Fagot-Campagna A, Rolka DB, Beckles GL, Gregg EW, Narayan KM: Prevalence of lipid abnormalities, awareness, and treatment in U.S. adults with diabetes. 49(supp.1)A78-A79. *Diabetes.* 2000;
26. Yoshino G, Hirano T, Kazumi T. Dyslipidemia in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996;33(1):1-14.
27. Siegel RD, Cupples A, Schaefer EJ, Wilson PW. Lipoproteins, apolipoproteins, and low-density lipoprotein size among diabetics in the Framingham offspring study. *Metabolism.* 1996;45(10):1267-72.
28. Sniderman AD, Lamarche B, Tilley J, Seccombe D, Frohlich J. Hypertriglyceridemic hyperapoB in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(3):579-82.
29. Wägner AM, Pérez A, Calvo F, Bonet R, Castellví A, Ordóñez J. Apolipoprotein(B) identifies dyslipidemic phenotypes associated with cardiovascular risk in normocholesterolemic type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 1999;22(5):812-7.
30. Carmena R, Ascaso JF. [Global therapy of diabetic dyslipidemia: benefits and new therapeutic approaches]. *Med Clínica.* 2010;134(9):406-11.

31. Chehade JM, Gladysz M, Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management. *Drugs*. 2013;73(4):327-39.
32. Arca M, Pigna G, Favoccia C. Mechanisms of diabetic dyslipidemia: relevance for atherogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(6):684-6.
33. Muačević-Katanec D, Reiner Z. Diabetic dyslipidemia or «diabetes lipidus»? *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2011;9(3):341-8.
34. Waldecker B, Waas W, Haberbosch W, Voss R, Steen-Müller MK, Hiddessen A, et al. Type 2 diabetes and acute myocardial infarction. Angiographic findings and results of an invasive therapeutic approach in type 2 diabetic versus nondiabetic patients. *Diabetes Care*. 1999;22(11):1832-8.
35. Malmberg K, Yusuf S, Gerstein HC, Brown J, Zhao F, Hunt D, et al. Impact of diabetes on long-term prognosis in patients with unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction: results of the OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes) Registry. *Circulation*. 2000;102(9):1014-9.
36. Newman JM, DeStefano F, Valway SE, German RR, Muneta B. Diabetes-associated mortality in Native Americans. *Diabetes Care*. 1993;16(1):297-9.
37. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA J Am Med Assoc*. 2007;298(3):309-16.
38. Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS, Nordestgaard BG. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA J Am Med Assoc*. 2008;300(18):2142-52.
39. 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 J Am Med Assoc*. 2007;298(3):299-308.
40. Ansar S, Koska J, Reaven PD. Postprandial hyperlipidemia, endothelial dysfunction and cardiovascular risk: focus on incretins. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10:61.
41. Kolovou G, Ooi TC. Postprandial lipaemia and vascular disease. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28(4):446-51.
42. González C, Real JT, Bartual A, Chaves FJ, García-García AB, Blesa S, et al. [Determinants of postprandial lipemia measured as diurnal triglyceride profile in non diabetic normolipidemic subjects]. *Med Clínica*. 2005;125(12):448-52.
43. Coutinho ER, Macedo GM, Campos FS, Bandeira FA. Changes in HDL cholesterol and in the inflammatory markers of atherogenesis after an oral fat load in type-2 diabetic patients and normal individuals. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008;6(2):153-7.
44. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*. 1979;60(3):473-85.

45. Adiels M, Olofsson S-O, Taskinen M-R, Borén J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(7):1225-36.
46. Klop B, Elte JWF, Cabezas MC. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets. *Nutrients.* 2013;5(4):1218-40.
47. Karpe F, Bell M, Björkegren J, Hamsten A. Quantification of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy men by retinyl ester labeling and simultaneous measurement of apolipoproteins B-48 and B-100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(2):199-207.
48. Umpaichitra V, Banerji MA, Castells S. Postprandial hyperlipidemia after a fat loading test in minority adolescents with type 2 diabetes mellitus and obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM.* 2004;17(6):853-64.
49. Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconi F, Calabresi L, et al. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(11):1819-28.
50. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Kostakou PM, Mikhailidis DP. Cholesterol ester transfer protein (CETP), postprandial lipemia and hypolipidemic drugs. *Curr Med Chem.* 2009;16(33):4345-60.
51. Salerno AG, Patrício PR, Berti JA, Oliveira HCF. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) increases postprandial triglyceridaemia and delays triacylglycerol plasma clearance in transgenic mice. *Biochem J.* 2009;419(3):629-34.
52. Ursini F, Sevanian A. Postprandial Oxidative Stress. *Biol Chem.* 2005;383(3-4):599-605.
53. Devaraj S, Wang-Polagruto J, Polagruto J, Keen CL, Jialal I. High-fat, energy-dense, fast-food-style breakfast results in an increase in oxidative stress in metabolic syndrome. *Metabolism.* 2008;57(6):867-70.
54. Wu C-J, Yu Z-R. Effects on blood glucose, insulin, lipid and proatherosclerotic parameters in stable type 2 diabetic subjects during an oral fat challenge. *Lipids Health Dis.* 2004;3:17.
55. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, et al. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 2001;154(2):475-83.
56. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1997;79(3):350-4.
57. Anber V, Millar JS, McConnell M, Shepherd J, Packard CJ. Interaction of Very-Low-Density, Intermediate-Density, and Low-Density Lipoproteins With Human Arterial Wall Proteoglycans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2507-14.
58. de Carvalho MHC, Colaço AL, Fortes ZB. [Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):304-12.

59. Van Oostrom AJ h h m, Sijmonsma TP, Rabelink TJ, Van Asbeck BS, Cabezas MC. Postprandial leukocyte increase in healthy subjects. *Metabolism*. 2003;52(2):199-202.
60. van Oostrom AJHMM, Rabelink TJ, Verseyden C, Sijmonsma TP, Plokker HWM, De Jaegere PPT, et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis*. 2004;177(1):175-82.
61. Engelhardt B, Wolburg H. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*. 2004;34(11):2955-63.
62. Alipour A, Elte JWF, van Zaanen HCT, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 3):466-9.
63. Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1996;60(1):106-17.
64. Schwartz EA, Zhang W-Y, Karnik SK, Borwege S, Anand VR, Laine PS, et al. Nutrient modification of the innate immune response: a novel mechanism by which saturated fatty acids greatly amplify monocyte inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):802-8.
65. Domoto K, Taniguchi T, Takaishi H, Takahashi T, Fujioka Y, Takahashi A, et al. Chylomicron remnants induce monocyte chemoattractant protein-1 expression via p38 MAPK activation in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003;171(2):193-200.
66. Gianturco SH, Bradley WA. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5(5):313-5.
67. Silveira A, Karpe F, Johnsson H, Bauer KA, Hamsten A. In vivo demonstration in humans that large postprandial triglyceride-rich lipoproteins activate coagulation factor VII through the intrinsic coagulation pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(11):1333-9.
68. Silveira A, Karpe F, Blombäck M, Steiner G, Walldius G, Hamsten A. Activation of coagulation factor VII during alimentary lipemia. *Arterioscler Thromb J Vasc Biol Am Heart Assoc*. 1994;14(1):60-9.
69. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blombäck M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1985;313(25):1557-63.
70. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1997;11(2):118-24.
71. Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(2):274-8.
72. 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(2):231-55.

73. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(1):29-38.
74. Lacroix S, Rosiers CD, Tardif J-C, Nigam A. The role of oxidative stress in postprandial endothelial dysfunction. *Nutr Res Rev.* 2012;25(02):288-301.
75. Patsch W, Esterbauer H, Föger B, Patsch JR. Postprandial lipemia and coronary risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2000;2(3):232-42.
76. Matsuoka H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;54 Suppl 2:S65-72.
77. Wallace JP, Johnson B, Padilla J, Mather K. Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review. *Int J Clin Pract.* 2010;64(3):389-403.
78. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1424-37.
79. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumrad NA. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl:S86-90.
80. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):21525-50.
81. Krauss S, Zhang C-Y, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST, et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1831-42.
82. Poitout V, Robertson RP. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev.* 2008;29(3):351-66.
83. Higaki Y, Mikami T, Fujii N, Hirshman MF, Koyama K, Seino T, et al. Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;294(5):E889-97.
84. Imoto K, Kukidome D, Nishikawa T, Matsuhisa T, Sonoda K, Fujisawa K, et al. Impact of mitochondrial reactive oxygen species and apoptosis signal-regulating kinase 1 on insulin signaling. *Diabetes.* 2006;55(5):1197-204.
85. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* 1994;94(4):1543-9.
86. Stadler K. Oxidative stress in diabetes. *Adv Exp Med Biol.* 2012;771:272-87.
87. Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature.* 2006;440(7086):944-8.

88. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-61.
89. Sytze Van Dam P, Cotter MA, Bravenboer B, Cameron NE. Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *Eur J Pharmacol.* 2013;719(1-3):180-6.
90. Rodríguez-Carrizalez AD, Castellanos-González JA, Martínez-Romero EC, Miller-Arevillaga G, Villa-Hernández D, Hernández-Godínez PP, et al. Oxidants, antioxidants and mitochondrial function in non-proliferative diabetic retinopathy. *J Diabetes.* 2014;6(2):167-75.
91. Al-Kafaji G, Golbahar J. High glucose-induced oxidative stress increases the copy number of mitochondrial DNA in human mesangial cells. *BioMed Res Int.* 2013;2013:754946.
92. Chung SSM, Ho ECM, Lam KSL, Chung SK. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol JASN.* 2003;14(8 Suppl 3):S233-6.
93. Wautier J-L, Schmidt AM. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res.* 2004;95(3):233-8.
94. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol.* 1997;150(2):523-31.
95. Ganz MB, Seftel A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;278(1):E146-52.
96. Siepi D, Marchesi S, Lupattelli G, Paltriccia R, Vaudo G, Pirro M, et al. Postprandial endothelial impairment and reduced glutathione levels in postmenopausal women. *Ann Nutr Metab.* 2002;46(1):32-7.
97. Helwig U, Rubin D, Kiosz J, Schreiber S, Fölsch UR, Nothnagel M, et al. The minor allele of the PPARgamma2 pro12Ala polymorphism is associated with lower postprandial TAG and insulin levels in non-obese healthy men. *Br J Nutr.* 2007;97(5):847-54.
98. Bogani P, Galli C, Villa M, Visioli F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis.* 2007;190(1):181-6.
99. Pedro T, Martinez-Hervas S, Tormo C, García-García AB, Saez-Tormo G, Ascaso JF, et al. Oxidative stress and antioxidant enzyme values in lymphomonocytes after an oral unsaturated fat load test in familial hypercholesterolemic subjects. *Transl Res J Lab Clin Med.* 2013;161(1):50-6.
100. Martinez-Gonzalez MA, Bes-Rastrollo M, Serra-Majem L, Lairon D, Estruch R, Trichopoulou A. Mediterranean food pattern and the primary prevention of chronic disease: recent developments. *Nutr Rev.* 2009;67 Suppl 1:S111-6.

101. Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. [Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease]. *Med Clínica*. 2005;124(10):388-95.
102. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E, et al. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* Baltim Md. 2005;42(5):1175-83.
103. Hui E, Xu A, Chow W-S, Lee PCH, Fong CHY, Cheung SCW, et al. Hypoadiponectinemia As An Independent Predictor for the Progression of Carotid Atherosclerosis: A 5-Year Prospective Study. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014;
104. Su H, Lau WB, Ma X-L. Hypoadiponectinaemia in diabetes mellitus type 2: molecular mechanisms and clinical significance. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2011;38(12):897-904.
105. Di Chiara T, Argano C, Scaglione A, Duro G, Corrao S, Scaglione R, et al. Hypoadiponectinemia, cardiometabolic comorbidities and left ventricular hypertrophy. *Intern Emerg Med*. 2015;10(1):33-40.
106. Maegdefessel L, Schlitt A, Pippig S, Schwaab B, Fingscheidt K, Raaz U, et al. Patients with insulin-dependent diabetes or coronary heart disease following rehabilitation express serum fractalkine levels similar to those in healthy control subjects. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:849-57.
107. Baldo A, Sniderman AD, St-Luce S, Avramoglu RK, Maslowska M, Hoang B, et al. The adipin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *J Clin Invest*. 1993;92(3):1543-7.
108. Cianflone KM, Sniderman AD, Walsh MJ, Vu HT, Gagnon J, Rodriguez MA. Purification and characterization of acylation stimulating protein. *J Biol Chem*. 1989;264(1):426-30.
109. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64(4):355-65.
110. Sniderman AD, Maslowska M, Cianflone K. Of mice and men (and women) and the acylation-stimulating protein pathway. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11(3):291-6.
111. Koistinen HA, Vidal H, Karonen S-L, Dusserre E, Vallier P, Koivisto VA, et al. Plasma Acylation Stimulating Protein Concentration and Subcutaneous Adipose Tissue C3 mRNA Expression in Nondiabetic and Type 2 Diabetic Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(6):1034-9.
112. Maslowska M, Vu H, Phelis S, Sniderman AD, Rhode BM, Blank D, et al. Plasma acylation stimulating protein, adipin and lipids in non-obese and obese populations. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(8):679-86.
113. Reaven GM, Olefsky JM. Relationship between insulin response during the intravenous glucose tolerance test, rate of fractional glucose removal and the degree of insulin resistance in normal adults. *Diabetes*. 1974;23(5):454-9.

114. O'Grada CM, Morine MJ, Morris C, Ryan M, Dillon ET, Walsh M, et al. PBMCs reflect the immune component of the WAT transcriptome--implications as biomarkers of metabolic health in the postprandial state. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(4):808-20.
115. Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr*. 2007;98(3):458-73.
116. Norata GD, Grigore L, Raselli S, Redaelli L, Hamsten A, Maggi F, et al. Post-prandial endothelial dysfunction in hypertriglyceridemic subjects: molecular mechanisms and gene expression studies. *Atherosclerosis*. 2007;193(2):321-7.
117. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach CN, Sunderman FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem*. 1987;33(2 Pt 1):214-20.
118. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol*. 1994;234:367-71.
119. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*. 2015;6(2):109-20.
120. Paneni F, Costantino S, Cosentino F. Molecular pathways of arterial aging. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2015;128(2):69-79.
121. Simarro Rueda M, Carbayo Herencia JA, Massó Orozco J, Artigao Rodenas LM, Carrión Valero L, División Garrote JA, et al. [Association of insulin resistance to different anthropometric measures and cardiovascular risk factors in a non-diabetic population]. *Endocrinol Nutr Órgano Soc Esp Endocrinol Nutr*. 2011;58(9):464-71.
122. Alonso AL, Munguía-Miranda C, Ramos-Ponce D, Hernandez-Saavedra D, Kumate J, Cruz M. Waist perimeter cutoff points and prediction of metabolic syndrome risk. A study in a Mexican population. *Arch Med Res*. 2008;39(3):346-51.
123. Bloomfield GS, Wang TY, Boulware LE, Califf RM, Hernandez AF, Velazquez EJ, et al. Implementation of management strategies for diabetes and hypertension: from local to global health in cardiovascular diseases. *Glob Heart*. 2015;10(1):31-8.
124. Hermans MP, De Bacquer D, De Block C, Truyers C, Vankeirsbilck A, De Backer G. Cardiovascular risk factors: Belgian target achievement. *Acta Cardiol*. 2014;69(5):473-81.
125. Caro J, Navarro I, Romero P, Lorente RI, Priego MA, Martínez-Hervás S, et al. Efecto metabólico del ejercicio físico regular en la población sana. *Endocrinol Nutr*. 2013;60(4):167-72.
126. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(3):509-15.

127. Csordas A, Bernhard D. The biology behind the atherothrombotic effects of cigarette smoke. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(4):219-30.
128. Brinton EA. Effects of ethanol intake on lipoproteins. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(2):108-14.
129. Klop B, do Rego AT, Cabezas MC. Alcohol and plasma triglycerides. *Curr Opin Lipidol.* 2013;24(4):321-6.
130. Brinton EA. Effects of ethanol intake on lipoproteins and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21(4):346-51.
131. Demant T, Shepherd J, Packard CJ. Very low density lipoprotein apolipoprotein B metabolism in humans. *Klin Wochenschr.* 1988;66(16):703-12.
132. Bernstein AM, Titgemeier B, Kirkpatrick K, Golubic M, Roizen MF. Major cereal grain fibers and psyllium in relation to cardiovascular health. *Nutrients.* 2013;5(5):1471-87.
133. Yu K, Ke M-Y, Li W-H, Zhang S-Q, Fang X-C. The impact of soluble dietary fibre on gastric emptying, postprandial blood glucose and insulin in patients with type 2 diabetes. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2014;23(2):210-8.
134. Roche HM. Dietary carbohydrates and triacylglycerol metabolism. *Proc Nutr Soc.* 1999;58(1):201-7.
135. Braschi S. [Postprandial hyperlipidemia, small and dense LDL, HDL sub-fractions]. *Ann Médecine Interne.* 2001;152(3):162-8.
136. Kolovou GD, Anagnostopoulou KK, Daskalopoulou SS, Mikhailidis DP, Cokkinos DV. Clinical relevance of postprandial lipaemia. *Curr Med Chem.* 2005;12(17):1931-45.
137. Ginsberg HN, Illingworth DR. Postprandial dyslipidemia: an atherogenic disorder common in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2001;88(6A):9H - 15H.
138. Wuesten O, Balz CH, Bretzel RG, Kloer H-U, Hardt PD. Effects of oral fat load on insulin output and glucose tolerance in healthy control subjects and obese patients without diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28(2):360-5.
139. Wuesten O, Balz CH, Kloer HU, Bretzel RG, Linn T. Enhancement of beta-cell sensitivity to glucose by oral fat load. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme.* 2001;33(9):548-53.
140. Gunes O, Tascilar E, Sertoglu E, Tas A, Serdar MA, Kaya G, et al. Associations between erythrocyte membrane fatty acid compositions and insulin resistance in obese adolescents. *Chem Phys Lipids.* 2014;184:69-75.
141. Toledo K, Aranda M, Asenjo S, Sáez K, Bustos P. Unsaturated fatty acids and insulin resistance in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM.* 2014;27(5-6):503-10.
142. Kusunoki M, Tsutsumi K, Nakayama M, Kurokawa T, Nakamura T, Ogawa H, et al. Relationship between serum concentrations of saturated fatty acids and unsaturated

- fatty acids and the homeostasis model insulin resistance index in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Investig JMI*. 2007;54(3-4):243-7.
143. Gosmanov AR, Smiley DD, Robalino G, Siquiera J, Khan B, Le N-A, et al. Effects of oral and intravenous fat load on blood pressure, endothelial function, sympathetic activity, and oxidative stress in obese healthy subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010;299(6):E953-8.
 144. Oh JM, Choi JM, Lee JY, Oh SJ, Kim BH, Kim SK. Role of NADPH oxidase-4 in saturated fatty acid-induced insulin resistance in SK-Hep-1 cells. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2014;63:128-35.
 145. Oliveira V, Marinho R, Vitorino D, Santos GA, Moraes JC, Dragano N, et al. Diets containing alpha-linolenic (omega 3) or oleic (omega 9) fatty acids rescues obese mice from insulin resistance. *Endocrinology*. 2015;en20141880.
 146. Peyron-Caso E, Fluteau-Nadler S, Kabir M, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Slama G, et al. Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. 2002;34(7):360-6.
 147. D'Alessandro ME, Chicco A, Lombardo YB. Fish oil reverses the altered glucose transporter, phosphorylation, insulin receptor substrate-1 protein level and lipid contents in the skeletal muscle of sucrose-rich diet fed rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;88(2):171-7.
 148. Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J. N-3 polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. marzo de 2002;282(3):E664-71.
 149. Aouacheri O, Saka S, Krim M, Messaadia A, Maida I. The investigation of the oxidative stress-related parameters in type 2 diabetes mellitus. *Can J Diabetes*. 2015;39(1):44-9.
 150. Gupta S, Gambhir JK, Kalra O, Gautam A, Shukla K, Mehndiratta M, et al. Association of biomarkers of inflammation and oxidative stress with the risk of chronic kidney disease in Type 2 diabetes mellitus in North Indian population. *J Diabetes Complications*. 2013;27(6):548-52.
 151. Hakki Kalkan I, Suher M. The relationship between the level of glutathione, impairment of glucose metabolism and complications of diabetes mellitus. *Pak J Med Sci*. 2013;29(4):938-42.
 152. Furfaro AL, Nitti M, Marengo B, Domenicotti C, Cottalasso D, Marinari UM, et al. Impaired synthesis contributes to diabetes-induced decrease in liver glutathione. *Int J Mol Med*. 2012;29(5):899-905.
 153. Bravi MC, Armiento A, Laurenti O, Cassone-Faldetta M, De Luca O, Moretti A, et al. Insulin decreases intracellular oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2006;55(5):691-5.

154. Meza-Miranda ER, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Delgado-Lista J, Garcia-Rios A, Perez-Martinez P, et al. Postprandial oxidative stress is modulated by dietary fat in adipose tissue from elderly people. *Age Dordr Neth*. 2014;36(2):507-17.
155. Perez-Martinez P, Garcia-Quintana JM, Yubero-Serrano EM, Tasset-Cuevas I, Tunez I, Garcia-Rios A, et al. Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2010;119(6):251-61.
156. Peña-Orihuela P, Camargo A, Rangel-Zuñiga OA, Perez-Martinez P, Cruz-Teno C, Delgado-Lista J, et al. Antioxidant system response is modified by dietary fat in adipose tissue of metabolic syndrome patients. *J Nutr Biochem*. 2013;24(10):1717-23.
157. Tsai W-C, Li Y-H, Lin C-C, Chao T-H, Chen J-H. Effects of oxidative stress on endothelial function after a high-fat meal. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2004;106(3):315-9.
158. Cardona F, Tunez I, Tasset I, Murri M, Tinahones FJ. Similar increase in oxidative stress after fat overload in persons with baseline hypertriglyceridemia with or without the metabolic syndrome. *Clin Biochem*. 2008;41(9):701-5.
159. Cardona F, Túnez I, Tasset I, Montilla P, Collantes E, Tinahones FJ. Fat overload aggravates oxidative stress in patients with the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(7):510-5.
160. Abd-Elsameea AA, Moustaf AA, Mohamed AM. Modulation of the oxidative stress by metformin in the cerebrum of rats exposed to global cerebral ischemia and ischemia/reperfusion. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2014;18(16):2387-92.
161. Alzoubi KH, Khabour OF, Al-Azzam SI, Tashtoush MH, Mhaidat NM. Metformin Eased Cognitive Impairment Induced by Chronic L-methionine Administration: Potential Role of Oxidative Stress. *Curr Neuropharmacol*. 2014;12(2):186-92.
162. Correia S, Carvalho C, Santos MS, Proença T, Nunes E, Duarte AI, et al. Metformin protects the brain against the oxidative imbalance promoted by type 2 diabetes. *Med Chem Shāriqah United Arab Emir*. 2008;4(4):358-64.
163. Dai J, Liu M, Ai Q, Lin L, Wu K, Deng X, et al. Involvement of catalase in the protective benefits of metformin in mice with oxidative liver injury. *Chem Biol Interact*. de 2014;216:34-42.
164. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MSA, Salam SKN, Salleh MSM, Gurtu S. Comparison of antioxidant effects of honey, glibenclamide, metformin, and their combinations in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci*. 2011;12(1):829-43.
165. Maheshwari RA, Balaraman R, Sen AK, Seth AK. Effect of coenzyme Q10 alone and its combination with metformin on streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic nephropathy in rats. *Indian J Pharmacol*. 2014;46(6):627-32.
166. Kocer D, Bayram F, Diri H. The effects of metformin on endothelial dysfunction, lipid metabolism and oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2014;30(5):367-71.

167. Ohira M, Yamaguchi T, Saiki A, Ban N, Kawana H, Nagayama D, et al. Metformin reduces circulating malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in type 2 diabetes mellitus. *Clin Investig Med Médecine Clin Exp.* 2014;37(4):E243-51.
168. Singh RK, Gupta B, Tripathi K, Singh SK. Anti oxidant potential of Metformin and Pioglitazone in Type 2 Diabetes Mellitus: Beyond their anti glycemc effect. *Diabetes Metab Syndr.* 2015; S1871-4021(15)00083-1
169. Kotani K, Tashiro J, Yamazaki K, Nakamura Y, Miyazaki A, Bujo H, et al. Investigation of MDA-LDL (malondialdehyde-modified low-density lipoprotein) as a prognostic marker for coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2015;450:145-50.
170. Sozer V, Himmetoglu S, Korkmaz GG, Kaya S, Aydin S, Yumuk V, et al. Paraoxonase, oxidized low density lipoprotein, monocyte chemoattractant protein-1 and adhesion molecules are associated with macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Minerva Med.* 2014;105(3):237-44.
171. Dave A, Kalra P, Gowda BHR, Krishnaswamy M. Association of bilirubin and malondialdehyde levels with retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Indian J Endocrinol Metab.* 2015;19(3):373-7.
172. Gong X, Ma Y, Ruan Y, Fu G, Wu S. Long-term atorvastatin improves age-related endothelial dysfunction by ameliorating oxidative stress and normalizing eNOS/iNOS imbalance in rat aorta. *Exp Gerontol.* 2014;52:9-17.
173. Lazich I, Sarafidis P, de Guzman E, Patel A, Oliva R, Bakris G. Effects of combining simvastatin with rosiglitazone on inflammation, oxidant stress and ambulatory blood pressure in patients with the metabolic syndrome: the SIROCO study. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14(2):181-6.
174. Li Y, Fu J, Yuan X, Hu C. Simvastatin inhibits the proliferation of A549 lung cancer cells through oxidative stress and up-regulation of SOD2. *Pharm.* 2014;69(8):610-4.
175. Ogawa K, Tanaka T, Nagoshi T, Sekiyama H, Arase S, Minai K, et al. Increase in the oxidised low-density lipoprotein level by smoking and the possible inhibitory effect of statin therapy in patients with cardiovascular disease: a retrospective study. *BMJ Open.* 2015;5(1):e005455.
176. Sathyapalan T, Shepherd J, Atkin SL, Kilpatrick ES. The effect of atorvastatin and simvastatin on vitamin D, oxidative stress and inflammatory marker concentrations in patients with type 2 diabetes: a crossover study. *Diabetes Obes Metab.* 2013;15(8):767-9.
177. Sathyapalan T, Shepherd J, Coady A-M, Kilpatrick ES, Atkin SL. Atorvastatin reduces malondialdehyde concentrations in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):3951-5.
178. Taguchi A, Hayashi S. [Study of MDA-LDL by pioglitazone and pitavastatin in patients with type 2 diabetes]. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med.* 2011;69(1):100-4.

179. Yoshida H, Shoda T, Yanai H, Ikewaki K, Kurata H, Ito K, et al. Effects of pitavastatin and atorvastatin on lipoprotein oxidation biomarkers in patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2013;226(1):161-4.
180. BOLA2 Gene - GeneCards | BOLA2 Protein | BOLA2 Antibody [Internet]. [citado 21 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BOLA2>
181. Couturier J, Wu H-C, Dhalleine T, Pégeot H, Sudre D, Gualberto JM, et al. Monothiol glutaredoxin-BolA interactions: redox control of *Arabidopsis thaliana* BOLA2 and SufE1. *Mol Plant*. 2014;7(1):187-205.
182. Dhalleine T, Rouhier N, Couturier J. Putative roles of glutaredoxin-BolA heterodimers in plants. *Plant Signal Behav*. 2014;9(3):e28564.
183. Li H, Mapolelo DT, Randeniya S, Johnson MK, Outten CE. Human glutaredoxin 3 forms [2Fe-2S]-bridged complexes with human BOLA2. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;51(8):1687-96.
184. Li H, Outten CE. Monothiol CGFS glutaredoxins and BolA-like proteins: [2Fe-2S] binding partners in iron homeostasis. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;51(22):4377-89.
185. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin: small multi-functional redox proteins with active-site disulphide bonds. *Biochem Soc Trans*. 1988;16(2):95-6.
186. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*. 1989;264(24):13963-6.
187. Gleason FK, Holmgren A. Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 1988;4(4):271-97.
188. Horie M, Suzuki M, Takahashi E, Tanigami A. Cloning, expression, and chromosomal mapping of the human 14-3-3gamma gene (YWHAG) to 7q11.23. *Genomics*. 1999;60(2):241-3.
189. Autieri MV, Carbone CJ. 14-3-3Gamma interacts with and is phosphorylated by multiple protein kinase C isoforms in PDGF-stimulated human vascular smooth muscle cells. *DNA Cell Biol*. 1999;18(7):555-64.
190. Van Der Hoeven PC, Van Der Wal JC, Ruurs P, Van Dijk MC, Van Blitterswijk J. 14-3-3 isotypes facilitate coupling of protein kinase C-zeta to Raf-1: negative regulation by 14-3-3 phosphorylation. *Biochem J*. 2000;345 Pt 2:297-306.
191. Ramocki MB, Bartnik M, Szafranski P, Kołodziejska KE, Xia Z, Bravo J, et al. Recurrent distal 7q11.23 deletion including HIP1 and YWHAG identified in patients with intellectual disabilities, epilepsy, and neurobehavioral problems. *Am J Hum Genet*. 2010;87(6):857-65.
192. Fusco C, Micale L, Augello B, Teresa Pellico M, Menghini D, Alfieri P, et al. Smaller and larger deletions of the Williams Beuren syndrome region implicate genes involved in mild facial phenotype, epilepsy and autistic traits. *Eur J Hum Genet EJHG*. 2014;22(1):64-70.

193. Komoike Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Hayashidani M, Shimojima K, et al. Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. *Genes N Y N* 2000. 2010;48(4):233-43.
194. Deelen J, Uh H-W, Monajemi R, van Heemst D, Thijssen PE, Böhringer S, et al. Gene set analysis of GWAS data for human longevity highlights the relevance of the insulin/IGF-1 signaling and telomere maintenance pathways. *Age Dordr Neth*. 2013;35(1):235-49.
195. Wali RK, Jaffe S, Kumar D, Kalra VK. Alterations in organization of phospholipids in erythrocytes as factor in adherence to endothelial cells in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1988;37(1):104-11.
196. Gargiulo P, Goldberg J, Romani B, Schiaffini R, Ciampalini P, Faulk WP, et al. Qualitative and quantitative studies of autoantibodies to phospholipids in diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol*. 1999;118(1):30-4.
197. Calderón-Salinas JV, Muñoz-Reyes EG, Guerrero-Romero JF, Rodríguez-Morán M, Bracho-Riquelme RL, Carrera-Gracia MA, et al. Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Mol Cell Biochem*. 2011;357(1-2):171-9.
198. ZNF480 zinc finger protein 480 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/147657>
199. Yi Z, Li Y, Ma W, Li D, Zhu C, Luo J, et al. A novel KRAB zinc-finger protein, ZNF480, expresses in human heart and activates transcriptional activities of AP-1 and SRE. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(2):409-15.
200. Jouan L, Girard SL, Dobrzeniecka S, Ambalavanan A, Krebs M-O, Joober R, et al. Investigation of rare variants in LRP1, KPNA1, ALS2CL and ZNF480 genes in schizophrenia patients reflects genetic heterogeneity of the disease. *Behav Brain Funct* BBF. 2013;9:9.
201. Chen TJ, Wang Y, Martinez JE, Wilson GL, He X-Y, Tuck-Muller CM, et al. Gene symbol: RPS6KA3. *Hum Genet*. 2007;121(2):288.
202. Labonne JDJ, Chung MJ, Jones JR, Anand P, Wenzel W, Iacoboni D, et al. Concomitant partial exon skipping by a unique missense mutation of RPS6KA3 causes Coffin-Lowry syndrome. *Gene*. 2015;
203. Nishimoto HK, Ha K, Jones JR, Dwivedi A, Cho H-M, Layman LC, et al. The historical Coffin-Lowry syndrome family revisited: identification of two novel mutations of RPS6KA3 in three male patients. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(9):2172-9.
204. Quintela I, Barros-Angueira F, Pérez-Gay L, Castro-Gago M, Carracedo Á, Eirís-Puñal J. [Deletion of the RPS6KA3 gene in a female with a classical phenotype of Coffin-Lowry syndrome including stimulus-induced drop attacks]. *Rev Neurol*. 2015;61(2):94-6.

205. Tos T, Alp MY, Aksoy A, Ceylaner S, Hanauer A. A familial case of Coffin-Lowry syndrome caused by RPS6KA3 C.898C>T mutation associated with multiple abnormal brain imaging findings. *Genet Couns Geneva Switz.* 2015;26(1):47-52.
206. RPS6KA3 Gene - GeneCards | KS6A3 Protein | KS6A3 Antibody [Internet]. [citado 28 de septiembre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPS6KA3>
207. Zannas AS, Wiechmann T, Gassen NC, Binder EB. Gene-Stress-Epigenetic Regulation of FKBP5: Clinical and Translational Implications. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2015;
208. Zannas AS, Binder EB. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. *Genes Brain Behav.* 2014;13(1):25-37.
209. Binder EB. The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology.* 2009;34 Suppl 1:S186-95.
210. Cattaneo A, Riva MA. Stress-induced mechanisms in mental illness: A role for glucocorticoid signalling. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015;
211. Seifuddin F, Pirooznia M, Judy JT, Goes FS, Potash JB, Zandi PP. Systematic review of genome-wide gene expression studies of bipolar disorder. *BMC Psychiatry.* 2013;13:213.
212. Mandelli L, Serretti A. Gene environment interaction studies in depression and suicidal behavior: An update. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013;37(10 Pt 1):2375-97.
213. O'Leary JC, Zhang B, Koren J, Blair L, Dickey CA. The role of FKBP5 in mood disorders: action of FKBP5 on steroid hormone receptors leads to questions about its evolutionary importance. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2013;12(8):1157-62.
214. Li L, Lou Z, Wang L. The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance. *Br J Cancer.* 2011;104(1):19-23.
215. Gagnoli C. Hypothesis of the neuroendocrine cortisol pathway gene role in the comorbidity of depression, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Appl Clin Genet.* 2014;7:43-53.
216. Pereira MJ, Palming J, Svensson MK, Rizell M, Dalenbäck J, Hammar M, et al. FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. *Metabolism.* 2014;63(9):1198-208.
217. Yang L, Isoda F, Yen K, Kleopoulos SP, Janssen W, Fan X, et al. Hypothalamic Fkbp51 is induced by fasting, and elevated hypothalamic expression promotes obese phenotypes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2012;302(8):E987-91.
218. Balsevich G, Uribe A, Wagner KV, Hartmann J, Santarelli S, Labermaier C, et al. Interplay between diet-induced obesity and chronic stress in mice: potential role of FKBP51. *J Endocrinol.* 2014;222(1):15-26.

219. DHRS9 Gene - GeneCards | DHRS9 Protein | DHRS9 Antibody [Internet]. [citado 7 de octubre de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DHRS9>
220. Hu L, Chen H-Y, Han T, Yang G-Z, Feng D, Qi C-Y, et al. Downregulation of DHRS9 expression in colorectal cancer tissues and its prognostic significance. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2015;
221. Kropotova ES, Zinovieva OL, Zyryanova AF, Dybovaya VI, Prasolov VS, Beresten SF, et al. Altered expression of multiple genes involved in retinoic acid biosynthesis in human colorectal cancer. *Pathol Oncol Res POR*. 2014;20(3):707-17.
222. Jones RJ, Dickerson S, Bhende PM, Delecluse H-J, Kenney SC. Epstein-Barr virus lytic infection induces retinoic acid-responsive genes through induction of a retinol-metabolizing enzyme, DHRS9. *J Biol Chem*. 2007;282(11):8317-24.
223. Zhang M, Liu C, Hu M, Zhang J, Xu P, Li F, et al. High-fat diet enhanced retinal dehydrogenase activity, but suppressed retinol dehydrogenase activity in liver of rats. *J Pharmacol Sci*. 2015;127(4):430-8.