



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

# Efectos de factores nutricionales sobre la expresión de genes inflamatorios

Javier Gibert Corzo

**Grau de Bioquímica**

Any acadèmic 2017-18

Treball tutelat per Antoni Pons Biescas  
Departament de Biologia Fonamental i Ciències de la Salut

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Genes inflamatorios, inflamación, actividad física, intervención nutricional, moléculas de adhesión celular



## Índice

<b>1. Abstract</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	1
2.1. Inflamación.....	1
2.1.1. <i>Migración y adhesión celular</i> .....	2
2.2. Expresión de moléculas de adhesión endotelial en el síndrome metabólico .....	4
2.3. Especies reactivas de oxígeno (ROS).....	5
2.3.1. <i>ROS e inflamación</i> .....	6
2.3.2. <i>El ejercicio físico como fuente de ROS</i> .....	7
2.3.3. <i>Ejercicio físico e inflamación</i> .....	7
2.4. Efectos de la dieta mediterránea sobre la respuesta inmunitaria y la producción de ROS .....	8
2.5. Objetivos .....	9
2.6. Diseño experimental .....	9
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	9
3.1. Origen de las muestras .....	9
3.2. Características de los sujetos .....	10
3.3. Aislamiento celular .....	10
3.4. Tratamientos celulares .....	11
3.5. Extracción de ARN y ensayo de PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	11
3.6. Análisis estadístico.....	12
<b>4. Resultados</b> .....	12
4.1. Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico .....	12
4.1.1. <i>Población leucocitaria de Neutrófilos</i> .....	12
4.1.2. <i>Población leucocitaria de PBMCs</i> .....	13
4.2. Incubación celular en presencia de glucosa/GOX .....	14
4.2.1. <i>Población leucocitaria de Neutrófilos</i> .....	14
4.2.2. <i>Población leucocitaria de PBMCs</i> .....	15
<b>5. Discusión</b> .....	15
5.1. Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico .....	15
5.1.1. <i>Población leucocitaria de Neutrófilos</i> .....	19
5.1.2. <i>Población leucocitaria de PBMCs</i> .....	19
5.2. Incubación celular en presencia de glucosa/GOX .....	20
5.2.1. <i>Población leucocitaria de Neutrófilos</i> .....	22
5.2.2. <i>Población leucocitaria de PBMCs</i> .....	22
<b>6. Conclusiones</b> .....	23
<b>7. Referencias bibliográficas</b> .....	24

## 1. Abstract

El Síndrome metabólico es una entidad clínica compleja que comprende varias alteraciones endocrino-metabólicas en un individuo. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes<sup>1</sup>, el diagnóstico de síndrome metabólico requiere cumplir al menos tres de los cinco criterios siguientes :

---

Adiposidad central (perímetro de la cintura para europeos : varones,  $\geq 102$ ; mujeres,  $\geq 88$  cm); glucemia en ayunas  $\geq 100$  mg/dl o recibir fármacos antidiabéticos; trigliceridemia  $\geq 150$  mg/dl, y colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad en suero (c-HDL)  $< 40$  mg/dl los varones y  $< 50$  mg/dl las mujeres; Presión arterial  $> 140/90$  mmHg o recibir fármacos antihipertensivos.

---

Aunque no se incluyen en la definición anterior, en ocasiones pueden ser útiles otros marcadores biológicos : disfunción endotelial; elevación de los niveles circulantes de marcadores inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-6, resistina) y de trombosis (PAI-1)<sup>2</sup>. Todos los criterios expuestos hacen que los individuos con síndrome metabólico tengan un mayor riesgo de sufrir diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares<sup>3</sup>. La prevalencia del síndrome metabólico se está viendo incrementada de forma drástica en todo el mundo durante los últimos años, tanto es así que un estudio publicado en la Revista Española de Cardiología<sup>4</sup> afirma que aproximadamente un 25% de los adultos españoles presenta síndrome metabólico (siendo Andalucía, Extremadura, Murcia, **Islas Baleares** y Canarias las comunidades con mayor prevalencia). Esto hace del síndrome metabólico un importante problema de salud pública a nivel mundial que requiere de una urgente intervención dietética/terapéutica.

El objetivo principal de nuestro estudio fue determinar los efectos de un patrón de dieta mediterránea tradicional combinado con actividad física regular sobre la expresión de genes inflamatorios en células inmunitarias (\*PBMCs y neutrófilos) de pacientes con síndrome metabólico. Como objetivo secundario se examinaron los efectos de una incubación con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sobre la expresión de genes inflamatorios en PBMCs y neutrófilos de pacientes con síndrome metabólico.

\* Células mononucleares de sangre periférica

## 2. Introducción

En este trabajo se ha decidido seccionar la introducción en diversos apartados ya que pensamos que una revisión específica sobre cada uno de los diferentes temas que se han estudiado pueden ayudar al lector a comprender e idealizar mejor una visión global del tema.

### 2.1. Inflamación

La palabra inflamación proviene del latín *inflammare*, cuyo significado es “encender fuego”. Es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares que se originan como respuesta defensiva del organismo frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Se trata de una respuesta natural que actúa de manera inespecífica, inmediata y continua contra una zona concreta del organismo. La inflamación provoca una coloración rojiza, edema, dolor e incremento de la temperatura en la zona afectada. Dos de los mecanismos moleculares más importantes que explican los síntomas observados son: un aumento del aporte sanguíneo local en la zona lesionada que se produce gracias a una dilatación de los vasos sanguíneos cercanos y un incremento de la permeabilidad vascular que facilita la salida de los leucocitos (glóbulos blancos) de la circulación sanguínea y su extravasación hacia al foco inflamatorio (diapédesis). La finalidad es localizar y eliminar el agente causante de la infección para que el

organismo pueda regresar a las condiciones normales, recuperándose la funcionalidad del tejido u órgano dañado.

## 2.1.1. Migración y adhesión celular

La inflamación se caracteriza por una migración de las células inmunitarias hacia el foco inflamatorio. Proceso en el cual leucocitos circulantes por la sangre, a través de un movimiento ameboide son capaces de escurrirse entre las células del endotelio vascular con el objetivo de llegar al foco de infección.

Las moléculas de adhesión celular, también llamadas adresinas, son proteínas transmembranales que permiten que los leucocitos circulantes por el torrente sanguíneo puedan adherirse al endotelio vascular para llegar al foco de infección tisular. Son moléculas que expresan en su superficie tanto los leucocitos como las células endoteliales. Éstas moléculas tienen como característica en común que normalmente se encuentran ancladas en el citoesqueleto de la célula.

Se encuentran distribuidas en gran cantidad de células, permitiendo al organismo realizar funciones tanto fisiológicas; como la adhesión entre las células epiteliales; como fisiopatológicas; por ejemplo la inflamación.

Existen varias familias de moléculas de adhesión que permiten estas interacciones e imparten especificidad para el reconocimiento celular altamente especializado. Así tenemos cuatro grandes familias de moléculas de adhesión: las integrinas, la familia de las inmunoglobulinas, las selectinas y las caderinas.

Distinguimos las adresinas del endotelio, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y las adresinas de los leucocitos que pertenecen a la familia de las integrinas.

Las integrinas consisten en glucoproteínas formadas por dos

subunidades (alfa y beta). Actualmente, en mamíferos, se han caracterizado 18 subunidades alfa y 8 subunidades beta, cuya combinación da lugar a 24 integrinas diferentes. Estas moléculas juegan un papel esencial en determinados procesos del sistema inmunitario: adhesión leucocitaria al endotelio y su posterior extravasación hacia tejidos u órganos linfoides secundarios, procesos inflamatorios, control del ciclo celular, etc.<sup>5</sup>

La subunidad alfa es la que confiere a las integrinas la especificidad de sustrato, distinguiéndose cuatro grupos:

1. Integrinas que reconocen los residuos Arg-Gli-Asp (RGD) de la fibronectina. Formadas por las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  y  $\alpha V$ .
2. Integrinas que se adhieren a lamininas de la membrana basal de la matriz extracelular. Formadas por las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  y  $\alpha 7$ .
3. Integrinas reconocedoras de moléculas de colágeno de la matriz extracelular. Formadas por las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  y  $\alpha 11$ .
4. Integrinas que constituyen receptores específicos de leucocitos. Formadas por las subunidades  $\alpha L$  y  $\alpha M$ .

Por otra parte, la subunidad beta de las integrinas es la que normalmente marca la naturaleza del ligando. En función de la subunidad beta, se pueden clasificar en cuatro subfamilias:

1. Subfamilia  $\beta 1$ : Son receptores cuyos ligandos no son componentes del endotelio vascular, sino que son componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno) por lo que actuarán cuando el leucocito ya ha salido del vaso sanguíneo y tiene que interactuar con los tejidos. La subunidad  $\beta 1$  comprende 12 heterodímeros que comparten la subunidad  $\beta 1$  ( $\alpha 1$   $\alpha 11$ - $\beta 1$  y  $\alpha V$ - $\beta 1$ ),

formando un grupo que se conoce como VLA (“very late activation” o activación tardía), y permiten a los leucocitos, entre otras funciones, localizar las células en el lugar de la inflamación al unirse a los componentes de la matriz extracelular.<sup>6</sup> En un estudio se pudo comprobar la expresión tardía de las moléculas VLA-1 y VLA-2 tras su aparición en los linfocitos de 2 a 4 semanas después de ser estimuladas por un antígeno<sup>7</sup>.

Dentro de esta subfamilia destacamos:

- VLA-4 ( $\alpha 4/\beta 1$ ) : Es la integrina que más se expresa en **linfocitos**, aunque también se encuentra en monocitos, basófilos, eosinófilos, grupo conocido como células mononucleares de sangre periférica (“Peripheral blood mononuclear cell”, PBMC’s). Se ha postulado que participa en el tráfico de células mononucleares hacia focos inflamatorios a través de la interacción con un ligando vascular inducible, la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1).<sup>8</sup>

2. Subfamilia  $\beta 2$  : Integrinas constituidas por una cadena beta 2 común y una cadena alfa variable ( $\alpha L$  o  $\alpha M$ ) asociadas no covalentemente. La cadena  $\alpha L$  es expresada por todos los leucocitos pero predomina en linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos (PBMCs). Mientras que la cadena  $\alpha M$  predomina en células mieloides, siendo la integrina más abundante de los neutrófilos.

Estas integrinas se han denominado “integrinas leucocitarias” pues su expresión se restringe, casi exclusivamente, a la población leucocitaria. Entre sus integrantes destacamos las moléculas de adhesión: LFA-1 y Mac-1.

- LFA-1 (Antígeno 1 asociado a la función leucocitaria;  $\alpha L/\beta 2$ ) : Se expresan en la superficie celular de linfocitos, células NK, monocitos, macrófagos y **granulocitos**. Sus ligandos son ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-

3, se tratan de moléculas de adhesión endotelial intercelulares presentes en la superficie de las células endoteliales. Las funciones de éstas moléculas comprenden la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales, tráfico leucocitario a la epidermis y al epitelio de las mucosas y la presentación de antígenos.

- Mac-1 (Antígeno-1 de Macrófagos;  $\alpha M/\beta 2$ ) : Se ha demostrado su presencia en linfocitos, células NK, monocitos, macrófagos, **granulocitos** y células de Langerhans. Sus ligandos corresponden a ICAM-1, fibronectina, factor X y factor c3bi. Sus funciones comprenden la adhesión de leucocitos al endotelio, la agregación y quimiotaxis de neutrófilos y monocitos (como la fagocitosis de eritrocitos).

3. Subfamilia  $\beta 3$  : Se trata de integrinas, también conocidas como citoadhesinas, implicadas en la adhesión de plaquetas y otras células al tejido conectivo, así como en la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular.<sup>9</sup>

4. Subfamilia  $\beta 7$  : Integrinas expresadas fundamentalmente por los linfocitos. Están implicadas en interacciones linfocitos-endotelio, sobretudo en las placas de Peyer y los tejidos linfoides del tracto gastrointestinal. Dentro de este grupo destacamos :

- LPAM-1 (Molécula de adhesión 1 leucocitaria a las placas de Peyer ;  $\alpha 4/\beta 7$ ) : Integrinas expresadas en linfocitos de tejidos linfoides asociados a mucosas. Ha sido implicado<sup>10</sup> como un receptor de alojamiento (“homing”) de linfocitos para la molécula de adhesión celular 1 de la mucosa (MAdCAM-1), un ligando vascular expresado selectivamente en tejidos linfoides asociados al intestino y en la lámina propia intestinal .

## *Alfa 4 y Beta 2 integrinas*

Los linfocitos expresan principalmente  $\alpha 4$ -integrinas, de las cuales no todas son expresadas por neutrófilos humanos (Ejemplo : VLA-4)<sup>(8,11)</sup>. En cambio,  $\beta 2$ -integrinas son las que tienen una mayor expresión en neutrófilos, pero también se expresan en linfocitos.

Las  $\beta 2$ -integrinas, responsables de la retención de los neutrófilos sobre el endotelio vascular, son incapaces de iniciar interacciones bajo la fuerza de arrastre de la sangre o “ fuerzas de cizallamiento”. Es decir, no pueden establecer los primeros contactos de adhesión sin un rodamiento previo mediado por selectina. En su lugar parece ser que están implicadas en reforzar la adhesión posterior a la captura inicial. En contraste, las  $\alpha 4$  integrinas son responsables de establecer el anclaje inicial de los leucocitos, *in vitro*, bajo las fuerzas de cizallamiento e independientemente de la selectina. Por lo tanto, las  $\alpha 4$  pero no las  $\beta 2$ -integrinas pueden iniciar la adhesión de leucocitos en flujo sanguíneo.<sup>8</sup>

## **2.2. Expresión de moléculas de adhesión celular en el Síndrome Metabólico**

La mayoría de funciones de los leucocitos son dependientes de miembros de la familia de integrinas. Las integrinas leucocitarias juegan un papel clave en la respuesta inmunitaria adaptativa, la cual incluye la interacción de células fagocíticas con el endotelio y la matriz extracelular.

Las integrinas normalmente se expresan en un estado inactivo en la superficie celular. Esto es crítico, ya que permite que los leucocitos y las plaquetas, por ejemplo, circulen libremente por el plasma con una agregación o interacción mínima con las paredes de los vasos sanguíneos. La unión de un agonista<sup>12</sup> tal como una citocina quimiotáctica (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, siglas en inglés GM-CSF) a receptores presentes

en la superficie del leucocito inicia señales desde el interior hacia el exterior celular que rápidamente provocan que la integrina pase al estado activo, lo que se conoce como **estimulación**. Las integrinas almacenadas en grupos intracelulares (por ejemplo, Mac-1) también se reclutan en la superficie celular en respuesta a agonistas, pero este proceso parece seguir el cambio de la integrina al estado activo.

En un estudio<sup>13</sup> se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión endotelial en plasma y en leucocitos circulantes de personas con síndrome metabólico. Los pacientes con síndrome metabólico presentaron un incremento significativo de los niveles plasmáticos de VCAM-1, VLA-4 en linfocitos y ICAM-1 en monocitos. Las células endoteliales pueden interactuar con los leucocitos a través de la interacción entre VCAM-1 con la integrina VLA-4, ambos de los cuales incrementaron en el síndrome metabólico. El aumento en las moléculas de adhesión celular procedentes del endotelio y las localizadas en la superficie de los leucocitos reflejaría el estado activado de ambos tipos celulares.

La asociación del incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular con el síndrome metabólico es lógica ya que estas moléculas tienen una interacción cercana con las citoquinas proinflamatorias que se sabe aumentan en la síndrome metabólico (Por ejemplo : interleucina- $1\beta$ , el factor de necrosis tumoral (TNF) y la proteína activada producida en el hígado en respuesta a la interleucina-6), las cuales estimularían la expresión de integrinas por parte de los leucocitos.

En otro estudio de pacientes con síndrome metabólico se observó<sup>14</sup> un incremento significativo de Mac-1 (monocitos) respecto a pacientes control. Además, el aumento de la expresión de Mac-1 fue correlacionado significativamente con un incremento de marcadores de síndrome metabólico como



glucosa plasmática, triacilglicéridos, TLR4 (Toll-Like Receptor 4) y la actividad de la p38 MAP quinasa.

Se ha sugerido que el aumento de la expresión de Mac-1 monocitario en pacientes con síndrome metabólico podría estar mediado por TLR2 y TLR4<sup>(15,16)</sup>, a través del incremento de la secreción de ICAM-1 y VCAM-1 y la consecuente adhesión monocitaria. Este hecho constituiría la base de la inflamación en la aterosclerosis<sup>17</sup>, contribuyendo de esta forma a incrementar el riesgo aterogénico y al empeoramiento de las enfermedades cardiovasculares. La activación de TLR4 facilita la activación de dos vías : vías dependientes de MyD88 (proteína 88 de respuesta primaria de la diferenciación mieloide) y vías independientes de MyD88. La vía dependiente de MyD88 vía implica la activación de la fase temprana del factor nuclear-κB (NF-κB), lo que conduce a la producción de citoquinas inflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión endotelial<sup>18</sup>. La vía independiente de MyD88 activa el factor regulador del interferón (IRF3) e implica la activación de la fase tardía de NF-κB, conduciendo ambos a la producción de IFN-β y la expresión de genes inducibles por IFN. Sin embargo, no se ha podido demostrar el papel de TLR-2 en la activación de Mac-1.

### 2.3. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Durante el metabolismo normal de la célula, el oxígeno es utilizado en las mitocondrias para la producción de energía. Un pequeño porcentaje de oxígeno no es completamente reducido, lo que lleva a la producción de productos intermediarios de oxígeno potenciamente reactivos \*(ROS).<sup>17</sup> Cuando la sobrecarga de radicales libres supera las defensas antioxidantes, la acumulación de radicales libres en el cuerpo genera un fenómeno llamado "estres oxidativo". El estrés oxidativo generalmente se considera como el punto de partida para

la aparición de varias enfermedades<sup>(19,20)</sup> y sin duda desempeña un papel importante en el desarrollo del envejecimiento y los trastornos crónicos y degenerativos. En un estudio se demostró el papel de los ROS [tales como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )] como mediadores de la disfunción cardíaca post-isquémica (hipótesis oxiradical miocárdica)<sup>21</sup>. La hipótesis fue probada en perros a los que se les ocluyó la arteria coronaria (15 minutos) y posteriormente se restableció el flujo sanguíneo. Tras la administración de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa, mejoró significativamente la recuperación de la función cardíaca después de la reperfusión.

\*Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RONS) pueden clasificarse en dos categorías (**Tabla 1**) : radicales libres y derivados no radicales.

Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y de Nitrógeno (RONS)	
Radicales Libres Ejemplos :	Derivados no Radicales Ejemplos :
Anión superóxido ( $O_2^-$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Óxido nítrico ( $\cdot NO$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Radical hidroxilo ( $\cdot OH$ )	Ozono ( $O_3$ )

**Tabla 1.** Clasificación especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RONS).

Sin embargo, los ROS presentan una doble función que depende principalmente de su concentración. A bajas concentraciones actúan como moléculas de señalización celular claves en procesos fisiológicos y modulan la activación de enzimas y genes<sup>22</sup> : activación de defensas antioxidantes, respuesta inmunitaria de las células, detoxificación de fármacos, vasodilatación, contracción muscular. Por otra parte, niveles elevados de ROS juegan un papel importante en procesos patológicos y están asociados con eventos biológicos dañinos : inhibición de



enzimas, fatiga y debilidad muscular, necrosis o apoptosis<sup>17</sup>. Se ha observado que la exposición de células a 40-50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induce daño oxidativo en el ADN, así como también activa la expresión de genes involucrados en la activación de NF- $\kappa\text{B}$  (Figura 1) y receptores de citoquinas<sup>(22,23)</sup>.

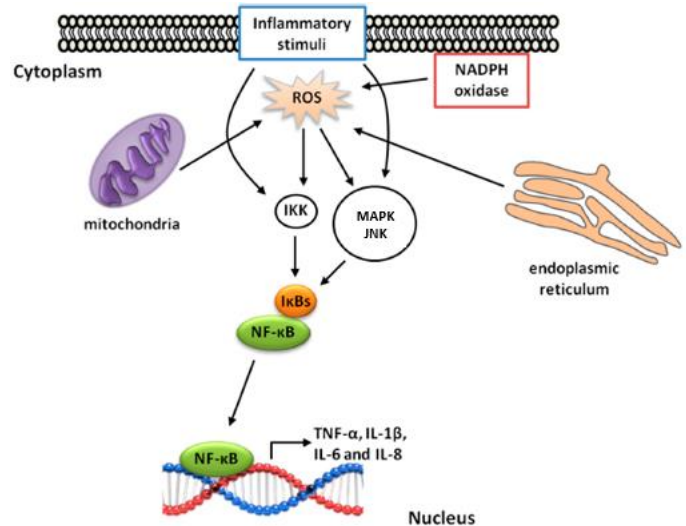
### 2.3.1. Ros e inflamación

Uno de los principales productores de radicales libres es el sistema inmunitario. Cuando se dañan las células de un órgano, se activan células del sistema inmune (como linfocitos, neutrófilos, macrófagos, etc) y desencadenan la producción de radicales libres para destruir las estructuras dañadas. Sin embargo, los radicales libres producidos contra el órgano dañado también reaccionan con las células sanas vecinas oxidándolas y dañándolas, lo que genera inflamación. Por lo tanto, los ROS pueden desarrollar una respuesta inflamatoria a la vez que estos son productos del proceso inflamatorio<sup>19</sup>.

Los ROS son moléculas que están directamente relacionadas con la progresión de las respuestas inflamatorias<sup>24</sup>, ya que inducen daño celular y/o conducen a la activación de factores de transcripción sensibles al redox. Entre los factores de transcripción, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa\text{B}$ ) está directamente involucrado en la regulación de genes proinflamatorios.

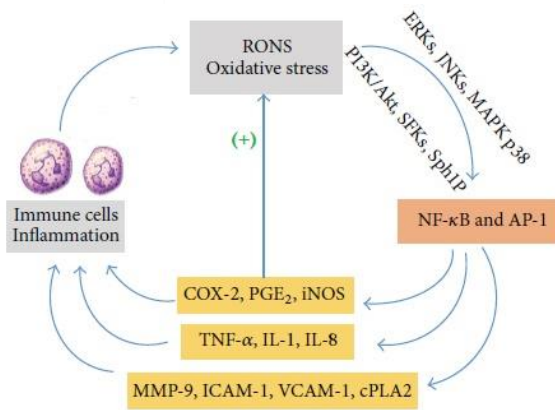
En condiciones normales, NF- $\kappa\text{B}$  se encuentra secuestrado en el citoplasma por proteínas inhibitorias como I $\kappa\text{B}$ , pero la llegada de estímulos inflamatorios (citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo, etc.) y ROS producidos por las mitocondrias (NADPH oxidasa) y el retículo endoplásmico inducen la ruta de la I $\kappa\text{B}$  quinasa (IKK). Entonces se desencadenan cascadas de quinasas, tales como MAP quinasa (MAPK) o quinasas amino terminales c-Jun (JNK), que dan como resultado la activación y la translocación de NF- $\kappa\text{B}$  al núcleo, donde

induce la transcripción de genes diana que codifican para citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Figura 1).



**Figura 1.** Mecanismos de señalización de activación del factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa\text{B}$ ) mediado por ROS. (Editado de Minatel et al. 2016)

Otros estudios reafirman que la exposición de las células a determinadas concentraciones de radicales libres<sup>(19,23)</sup> induce la expresión de genes codificantes para quinasas sensoras de estrés oxidativo, tales como, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), quinasas N-terminales c-jun (JNK), proteína quinasa activada por mitógenos p38 (MAPK p38), proteína quinasa C (PKC), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3- cinasa de la quinasa (PI3K) / Akt, y Src (SFKs), las cuales están involucradas en la activación de factores de transcripción sensibles al redox, incluyendo NF- $\kappa\text{B}$  y de la proteína activadora 1 (AP-1). Esto conduce a una mayor expresión de proteínas inflamatorias diana mediadoras de ROS, lo que crea un ciclo de autoactivación positivo que alimenta el círculo vicioso entre la inflamación y el estrés oxidativo (Figura 2).



**Figura 2.** El estrés oxidativo y la inflamación comparten vías de señalización comunes. (Editado de Sallam and Laher 2016)

### 2.3.2. El ejercicio físico como fuente de ROS

Existe una creciente evidencia basada en estudios epidemiológicos y experimentales de que la actividad física y el entrenamiento físico reducen los riesgos de mortalidad por todas las causas<sup>25</sup>. La actividad física se define como cualquier movimiento corporal coordinado por músculos esqueléticos que conlleva gasto de energía para conseguir un efecto, mientras que el ejercicio físico es una forma de actividad física planificada, estructurada, repetitiva y realizada con el objetivo de mejora o mantenimiento de uno o más componentes de la aptitud física (equilibrio, fuerza, flexibilidad, etc).

Se ha demostrado que el ejercicio físico regular es una medida de protección contra las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo: patologías cardiovasculares, ictus o accidentes cerebrovasculares, y algunos cáncers.<sup>20</sup> Las personas que realizan un entrenamiento progresivo desarrollan adaptaciones que permiten a sus células detoxificar más fácilmente elevadas cantidades de ROS en comparación con personas no entrenadas. En un estudio con ciclistas profesionales<sup>26</sup> se demostró que enzimas antioxidantes tales como catalasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa aumentan su

actividad *in vivo* después del ejercicio intenso en eritrocitos.

Sin embargo, la realización de ejercicios físicos extenuantes incrementa la producción de ROS, provocando daño muscular y desencadenamiento de procesos inflamatorios. El aumento en la producción de ROS durante el ejercicio físico agudo es debido al mayor funcionamiento de la cadena respiratoria, hecho que conlleva que los sistemas antioxidantes de la célula antioxidantes (como los enzimas superóxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasa, etc) se vean superados por las especies reactivas, resultando en estrés y daño oxidativo en los componentes celulares.<sup>27</sup> Las ROS producidos durante el ejercicio y que no han podido ser eliminados por las defensas antioxidantes pueden tener efectos sobre el equilibrio redox del organismo y desarrollar una respuesta inflamatoria.

Otro proceso que explica la elevada producción de radicales libres durante el ejercicio físico es la producción de ROS por parte de los neutrófilos y otras células fagocíticas, las cuales desarrollan una respuesta inmunitaria frente a un ejercicio de elevada intensidad y duración.

### 2.3.3. Ejercicio físico e inflamación

La realización de ejercicio físico intenso y/o prolongado promueve la movilización de neutrófilos segmentados (maduros), lo que se traduce en un incremento en el número de neutrófilos circulantes. Hay evidencias de que estos nuevos neutrófilos poseen una capacidad mejorada para metabolizar ROS, de tal forma que algunos tipos de ROS derivados de neutrófilos aumenta<sup>28</sup>.

El ejercicio físico agudo causa daño transitorio a la contracción de los músculos esqueléticos, desencadenando una respuesta inflamatoria que aumenta los niveles de citoquinas proinflamatorias en la sangre, y parece ser que los neutrófilos juegan un papel muy

importante ya que su infiltración en el músculo y la posterior liberación de citoquinas inflamatorias, ROS y proteasas incrementan el daño muscular.

Sin embargo, el ejercicio físico regular reduce los niveles de marcadores de inflamación sistémicos tales como IL-6, TNF- $\alpha$ , el receptor 1 TNF- $\alpha$  soluble (sTNFR1), CRP (proteína C-reactiva)<sup>29</sup>. Además, incrementa los niveles de adiponectina (al reducir la grasa visceral) y de citoquinas antiinflamatorias IL-10. Además, el ejercicio físico regular controla negativamente la respuesta inmune innata y activa el sistema inmune adaptativo con la consiguiente supresión de la inflamación.

Resultados de experimentos con ratones obesos inducidos por dietas altas en grasas<sup>29</sup> sugieren que la regulación negativa de la expresión de TLR-4 inducida por el ejercicio físico, que ocurre tanto por la inhibición de la infiltración de macrófagos M1 (proinflamatorios) en el tejido adiposo como por la aceleración del cambio de polarización de los macrófagos M1 a M2 (antiinflamatorios) en el tejido adiposo, atenúa la expresión de citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo de dichos ratones.

#### 2.4. Efectos de la dieta mediterránea sobre la respuesta inmunitaria y la producción de ROS

La dieta mediterránea es un modelo de alimentación basado en un consumo elevado de cereales, frutas, verduras, hortalizas y legumbres, incluyendo los pescados y el aceite de oliva como fuente principal de grasas y con bajo consumo de carnes y grasas saturadas, todo ello en un entorno de hábitos saludables: actividad física y ocio al aire libre. Es un buen ejemplo de dieta variada, nutritiva, apetecible y saludable, que además ayuda a prevenir enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación.

El ácido docosahexanoico (DHA) es un ácido graso poliinsaturado omega-3 muy

abundante en la dieta mediterránea, que se ha reconocido como una molécula protectora contra la inflamación y el estrés oxidativo. Se ha demostrado<sup>30</sup> que el consumo de suplementos con omega-3 (2 meses), atenúa la producción de citoquinas pro-inflamatorias, potencia las defensas antioxidantes en eritrocitos y disminuye el daño peroxidativo de proteínas en atletas profesionales durante la temporada de entrenamiento y después del ejercicio agudo. El DHA tiene efectos beneficiosos sobre la dinámica mitocondrial. Potencia la función mitocondrial, promueve la fusión mitocondrial y reduce la producción de ROS en mitocondrias hepáticas de ratas.<sup>31</sup>

En tal sentido, también destaca el ácido fólico (*hexafosfato de mio-inositol*, *IP6*), un fitocomponente de origen natural presente en varios alimentos<sup>32</sup> comunes en la dieta mediterránea: cereales (arroz, avena, trigo), legumbres (guisantes, algarrobas, lentejas), frutos secos (almendras, nueces). Dicho compuesto ha sido planteado como un posible agente antidiabético<sup>33</sup>, ya que a través de sus acciones biológicas es capaz de revertir la diabetes y con ello el síndrome metabólico: disminuye los niveles de glucosa plasmática activando la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4); mejora la sensibilidad a la insulina por sus efectos sobre elementos clave de la vía de señalización insulínica como el incremento de la fosforilación de la proteína quinasa B (PKB)/Akt<sup>34</sup>; previene de excesos de niveles de ácidos grasos libres (NEFA's) por su inhibición de la lipólisis lo que estimula la utilización de glucosa por el músculo esquelético y a su vez inhibe la gluconeogénesis hepática.

Numerosos estudios han demostrado que el consumo habitual moderado de vino, especialmente de vino tinto, tiene efectos beneficiosos para la salud<sup>(35,36,37)</sup>. El vino es rico en polifenoles<sup>38</sup>, los cuales son unos buenos candidatos para explicar el papel protector del vino contra el desarrollo de cánceres, obesidad, diabetes, patologías

cardiovasculares. Los polifenoles son una clase natural de compuestos aromáticos antioxidantes que comparten la característica de poseer en su estructura diversos grupos benzénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Presentan un potente efecto antioxidante, son capaces de neutralizar los radicales libres y secuestrar a iones metálicos (Por ejemplo :  $Fe^{2+}$ ) que actúan como biocatalizadores de reacciones de formación de radicales libres <sup>39</sup>, evitando así la propagación de las reacciones de lipoperoxidación y de generación de más radicales libres. También se ha demostrado su capacidad antiinflamatoria. En un estudio<sup>40</sup>, en el cual pacientes con síndrome metabólico consumían arándanos (ricos en polifenoles), se observó una reducción significativa de los niveles circulantes de marcadores proinflamatorios (IL-6, IL-12, LPS) y por lo tanto del grado de inflamación.

Los polifenoles del vino rojo pueden proporcionar beneficios sobre la salud debido a sus efectos antiinflamatorios. En un ensayo clínico<sup>41</sup> se quiso determinar como variaban los niveles de expresión génica de moléculas de adhesión leucocitarias, tras 1 mes de ingesta de vino rojo (30 g alcohol/día). Los resultados fueron sorprendentes, pues la intervención con polifenoles inhibió la expresión de LFA-1 en linfocitos, y de Mac-1 y CCR2 sobre los monocitos.

## 2.5. Objetivos

Los objetivos de nuestro estudio fueron :

- 1) Determinar si una intervención nutricional basada en un patrón de dieta mediterránea combinado con la práctica de ejercicio físico regular, tiene efectos sobre la expresión de genes inflamatorios en pacientes con síndrome metabólico.
- 2) Determinar los efectos del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) sobre la expresión de genes inflamatorios de células inmunitarias en pacientes con síndrome metabólico.

## 2.6. Diseño Experimental

Para conseguir los objetivos del estudio se realizaron dos experimentos, en el primero se determinó la expresión génica de las integrinas inflamatorias  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  en PBMCs y neutrófilos aislados de sangre periférica obtenida en condiciones basales de individuos con síndrome metabólico antes y después de 6 ó 12 meses de intervención nutricional siguiendo las pautas del estudio Predimed-plus. Los individuos sometidos a dicha intervención se clasificaron en dos grupos :

- Grupo Intervención : intervención intensiva basada en una dieta mediterránea hipocalórica y metas específicas de pérdida de peso, actividad física, y tratamiento conductual.
- Grupo Control : intervención de baja intensidad (cuidados habituales) con una dieta mediterránea sin restricción calórica, escasez de consejos para aumentar la actividad física o reducir la ingesta de energía y ausencia de terapia conductual.

En el segundo experimento se determinó la expresión génica de las integrinas inflamatorias  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  en PBMCs y neutrófilos, sometidos a la exposición de diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Una baja tasa de producción/concentración que es rápidamente compensada con las defensas antioxidantes celulares y una tasa de producción más elevada que sobrepasa las defensas antioxidantes provocando la acumulación del peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo. Los resultados se comparan con una situación control en la cual las células inmunitarias no son expuestas a peróxido de hidrógeno.

## 3. Materiales y Métodos

### 3.1. Origen de las muestras

Procedentes del proyecto de investigación nacional Predimed-plus <sup>42</sup> ("PREvención



con DIETA MEDiterránea”) : Efecto de una dieta mediterránea tradicional con restricción de energía, actividad física y tratamiento conductual sobre la prevención de enfermedad cardiovascular. El proyecto Predimed-plus quiso determinar el efecto sobre la morbi-mortalidad cardiovascular de una intervención intensiva de pérdida de peso basada en un \*patrón de dieta mediterránea tradicional hipocalórica, actividad física y terapia conductual frente a consejos sobre dieta también tipo mediterráneo siguiendo los cuidados sanitarios habituales para la prevención cardiovascular.

\*El patrón de dieta mediterránea tradicional consistía en una alimentación rica en grasas de fuentes vegetales naturales (aceite de oliva virgen y frutos secos), con un consumo abundante de alimentos de origen vegetal mínimamente elaborados (verduras, frutas, cereales integrales y legumbres), bajo consumo de carne (especialmente de carnes rojas o procesadas), consumo moderado de pescado y vino (normalmente consumido en las comidas).

A lo largo del estudio los participantes fueron citados en sesiones grupales con el objetivo de monitorizar los logros alcanzados y el nivel de cumplimiento de la intervención. Para este nuevo ensayo multicéntrico, participaron un total de 20 centros reclutadores que apuntaron a reclutar un total de 6000 participantes, 3000 asignados al grupo de intervención intensiva y 3000 al grupo control.

### 3.2. Características de los sujetos

Un total de 77 participantes procedentes del proyecto Predimed-plus se inscribieron en este estudio. Se realizó un seguimiento del síndrome metabólico de los sujetos a lo largo de un año (0,6 y 12 meses). Los criterios de inclusión para el síndrome metabólico son : hombres entre 55 y 75 años y mujeres entre 60 y 75 años, con un IMC  $\geq 27$  y  $< 40$  kg / m<sup>2</sup>, que cumplen  $\geq 3$  criterios (Hipertensión arterial, diabetes *mellitus* tipo II relacionada con resistencia a la insulina,

obesidad abdominal, niveles elevados de triglicéridos y disminución de colesterol-HDL). Los criterios de exclusión son a) incapacidad o falta de voluntad para dar consentimiento informado, b) antecedentes documentados de enfermedad cardiovascular previa, c) cáncer activo o antecedentes de tumores malignos en los últimos 5 años, d) Imposibilidad de seguir una dieta recomendada o realizar una evaluación física actividad.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de las Islas Baleares (nº de referencia 2251/14 PI).

### 3.3. Aislamiento Celular

A lo largo del primer año del estudio : inicial (0 meses) e intervención (6 y 12 meses), se recogieron muestras de sangre en ayunas de los pacientes. Las muestras de sangre venosa de los participantes en el estudio se obtuvieron de la vena antecubital y se depositaron en vacutainers adecuados con EDTA como anticoagulante en condiciones de ayuno. Las fracciones de PBMC's y de neutrófilos se purificaron a partir de sangre entera fresca y se aislaron siguiendo el protocolo descrito por Boyum, 1964 usando el reactivo Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Chalfont St Giles, RU) <sup>31,43</sup>. Brevemente, se introdujeron cuidadosamente 6 ml de sangre en 4 ml de Ficoll (proporción de 1,5:1) y luego se centrifugó a 900 g, a 4°C durante 30 minutos. Las fases de plasma y Ficoll se descartaron y la capa de PBMC's se lavó dos veces con tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4, y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 g, 4°C. El precipitado que contenía los eritrocitos y los neutrófilos se incubó a 4°C con 0,15 mol/L de cloruro de amonio para hemolizar los eritrocitos. La suspensión se centrifugó a 750 g, a 4°C durante 10 minutos y luego se desechó el sobrenadante. La fase de neutrófilos en el fondo primero se lavó con cloruro de amonio y luego con PBS. Este proceso de purificación de PBMC's y neutrófilos se

realizó por triplicado; los lisados celulares para la purificación del ARN se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis bioquímico, mientras que la otra muestra fue para la determinación de ROS y la otra se utilizó para determinar la producción y eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La viabilidad celular se evaluó usando un ensayo de tinción nuclear con cristal violeta<sup>44</sup>.

### 3.4. Tratamientos celulares con $\text{H}_2\text{O}_2$

Todos los tratamientos se realizaron en tubos esterilizados de 2 ml que contenían  $3 \times 10^6$  PBMCs/ml y  $3,5 \times 10^6$  Neutrófilos/ml. Las células se incubaron en medio RPMI-1640 con L-glutamina y  $\text{NaHCO}_3$  en una atmósfera humidificada. Las células se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 2 h en ausencia y en presencia de glucosa y glucosa oxidasa (GOX).

La glucosa oxidasa tipo X-S de *Aspergillus niger* ( $\sim 75\%$  de proteína, 151,000 U/ g de sólido, Sigma-Aldrich) se añadió a las concentraciones 1 y 0,1  $\mu\text{g}$  sólido/ml en PBMC's (Tabla 2). Se añadió GOX a concentraciones de 15 y 5  $\mu\text{g}$  sólido/ml en neutrófilos<sup>(22,45)</sup> (Tabla 3).

PBMCs	Incubación Celular
Control	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOX
Tratamiento 1 (T1)	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOX
Tratamiento 2 (T2)	0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOX

Tabla 2. Incubaciones PBMCs. Se considerarán :

T1 = Alta producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$

T2 = Baja producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Neutrófilos	Incubación Celular
Control	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOX
Tratamiento 1 (T1)	15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOX
Tratamiento 2 (T2)	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GOX

Tabla 3. Incubaciones neutrófilos. Se considerarán :

T1 = Alta producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$

T2 = Baja producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

### 3.5. Extracción de ARN y ensayo de PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se determinó la expresión de ARNm de los genes  $\alpha$ -4 y  $\beta$ -2 integrinas por RT-PCR a tiempo real usando como referencia el gen humano ARNr 18S. Con el objetivo de determinar la validez del estudio, paralelamente a las integrinas se determinó la expresión del gen humano RP19L ("Ribosomal Protein 19L"), [HGNC:10312]. Se trata de un gen constituido localizado en la posición 12 en el brazo largo del cromosoma 17 (17q12), que codifica para una proteína ribosomal componente de la subunidad 60S<sup>46</sup>.

Para dicho propósito, el ARN total de células mononucleares de sangre periférica (PBMC's) y de neutrófilos, se aisló mediante la utilización del reactivo de extracción TriPure (Roche Diagnostics®, Alemania). El ARN (1  $\mu\text{g}$ ) de cada muestra se retrotranscribió usando 50 de retrotranscriptasa expandida (Roche Diagnostics, Alemania) y 20 pmol de oligo [dT] durante 60 min a  $37^{\circ}\text{C}$  en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ , de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el cDNA resultante (3  $\mu\text{L}$ ) se amplificó usando el kit LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche Diagnostics, Alemania). Los cDNA diana se amplificaron de la siguiente manera: un ciclo a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos de amplificación ( $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 s, temperatura de apareamiento específica durante 10 s,  $72^{\circ}\text{C}$  durante 15 s). La cuantificación relativa se realizó mediante cálculos estándar considerando  $2^{(\Delta\Delta\text{Ct})}$ . Los primers específicos y las condiciones de amplificación utilizadas para cada gen están representados en la Tabla 4.



Gen	Primer	Temperatura(°C)	Tiempo (s)	
18S	Fw	5'- GACTCAACACGGGAAACCCTCAC -3'	60	10,10,15
	Rv	5'- GACTCAACACGGGAAACCCTCAC -3'		
L19	Fw	5'- CTA <sub>g</sub> T <sub>g</sub> TCCTCC <sub>g</sub> CT <sub>g</sub> T <sub>gg</sub> -3'	61	10,10,15
	Rv	5'- AA <sub>gg</sub> T <sub>g</sub> TTTTTCC <sub>gg</sub> CATC -3'		
β2-Integrin	Fw	5'- T <sub>g</sub> C <sub>g</sub> TCCTCTCTCA <sub>gg</sub> AgT <sub>g</sub> -3'	61	10,10,15
	Rv	5'- ggTCCAT <sub>g</sub> AT <sub>g</sub> TC <sub>g</sub> TCA <sub>g</sub> CC -3'		
α4-Integrin	Fw	5'- gTC <sub>g</sub> CATCCC <sub>g</sub> T <sub>g</sub> CAACTTT <sub>g</sub> -3'	67	10,10,15
	Rv	5'- gCT <sub>g</sub> T <sub>g</sub> CA <sub>g</sub> CAC <sub>g</sub> ACC <sub>g</sub> AgT -3'		

Tabla 4. Secuencia de primers y condiciones utilizadas en la PCR a tiempo real.

### 3.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (SPSS v.21.0 para Windows). Los resultados se expresan como Media ± SEM y P-valor <0,05 (en algunos casos < 0,1) se consideró estadísticamente significativo. Se realizó ANOVA de dos vías para determinar las diferencias estadísticas significativas. Cuando se encontraron efectos significativos, se utilizó ANOVA de una vía para determinar las diferencias entre los grupos implicados.

## 4. Resultados

### 4.1. Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico

Para identificar los efectos que tienen una intervención nutricional basada en dieta mediterránea y ejercicio físico regular (Predimed-plus) y su duración sobre los niveles de inflamación en pacientes con síndrome metabólico, examinamos la expresión de los genes inflamatorios α4 y β2 integrinas en células inflamatorias de pacientes con síndrome metabólico.

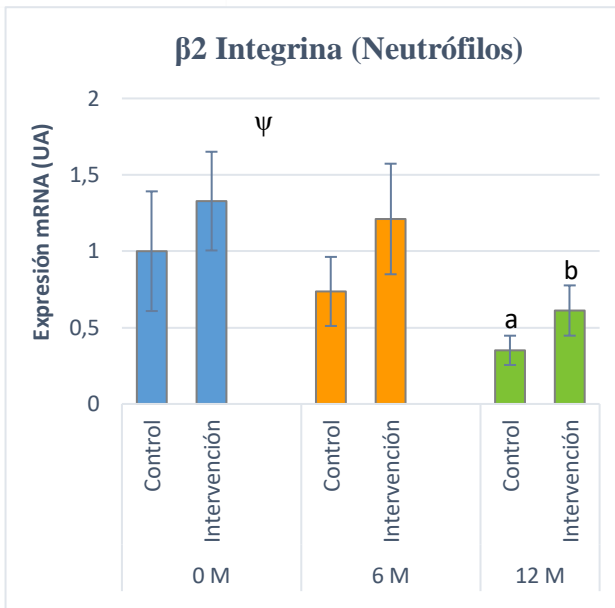
#### 4.1.1. Población leucocitaria de neutrófilos :

En la **Gráfica 1** se representan los resultados de la expresión del gen β2-integrina en neutrófilos. Se observa que

la duración de la intervención nutricional Predimed-plus afecta significativamente a los valores de expresión del gen β2-integrina en células mononucleares de sangre periférica [interacción intervención x tiempo]. La expresión del gen de la β2-integrina disminuye significativamente tanto en el grupo control como en el grupo intervención a los 12 meses de intervención predimed-plus.

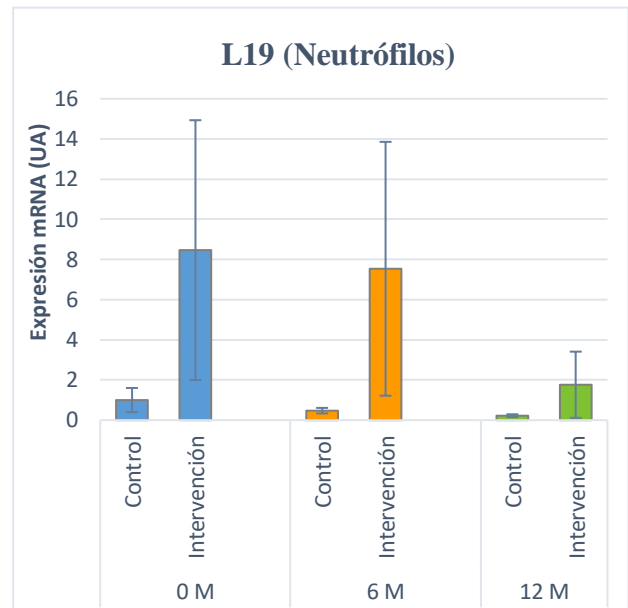
En la **Gráfica 2** se representan los resultados de la expresión del gen α4-integrina en neutrófilos. Se manifiesta que la duración de la intervención nutricional Predimed-plus afecta significativamente a los valores de expresión del gen β2-integrina en células mononucleares de sangre periférica [interacción intervención x tiempo]. Tras seis meses de duración de la intervención con dieta mediterránea y ejercicio físico el grupo intervención presenta niveles de expresión significativamente menores que el grupo control. La expresión del gen de la α4-integrina disminuye significativamente en el grupo control tras seis meses de intervención Predimed-plus, mientras que en el grupo intervención disminuye significativamente a los 12 meses de intervención Predimed-plus.

En la **Gráfica 3** se representan los resultados de la expresión del gen de referencia L19 en neutrófilos. No se encontraron efectos significativos.



**Gráfica 1.** Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico (n=136) sobre la expresión de β2-integrina en neutrófilos.

- Two-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : ( $\psi$ ) Interacción Intervención x Tiempo (0,6,12M).
- One-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : (a) Diferencias significativas Control 0M vs Control 12M ; (b) Diferencias significativas Intervención 6M vs Intervención 12M.



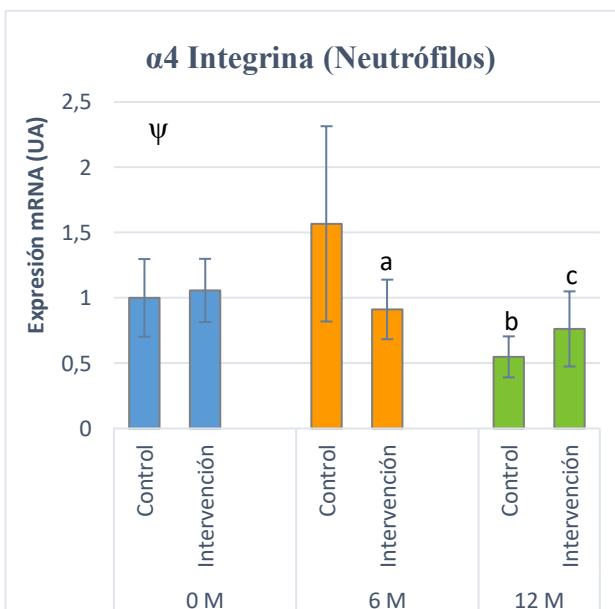
**Gráfica 3.** Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico (n=55) sobre la expresión de L19 en neutrófilos.

- Two-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : No se encontraron diferencias significativas.

#### 4.1.2. Población leucocitaria de PBMCs :

En la **Gráfica 4** se representan los resultados de la expresión del gen β2-integrina en PBMCs. Se observa que la duración de la intervención nutricional Predimed-plus afecta significativamente a los valores de expresión del gen β2-integrina en células mononucleares de sangre periférica [interacción intervención x tiempo]. La expresión del gen de la β2-integrina disminuye significativamente en el grupo control tras seis meses de intervención Predimed-plus, mientras que en el grupo intervención disminuye significativamente a los 12 meses de intervención Predimed-plus.

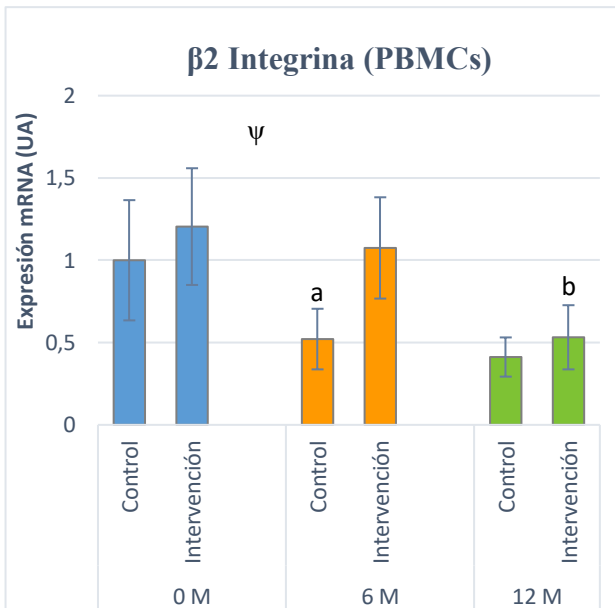
En la **Gráfica 5** se representan los resultados de la expresión del gen α4-integrina en PBMCs. Se observa un efecto significativo del tiempo sobre los niveles de expresión de α4-integrina. La expresión del gen de la β2-integrina disminuye significativamente tanto en el grupo control como en el grupo intervención a los 12 meses de intervención Predimed-plus.



**Gráfica 2.** Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico (n=156) sobre la expresión de α4-integrina en neutrófilos.

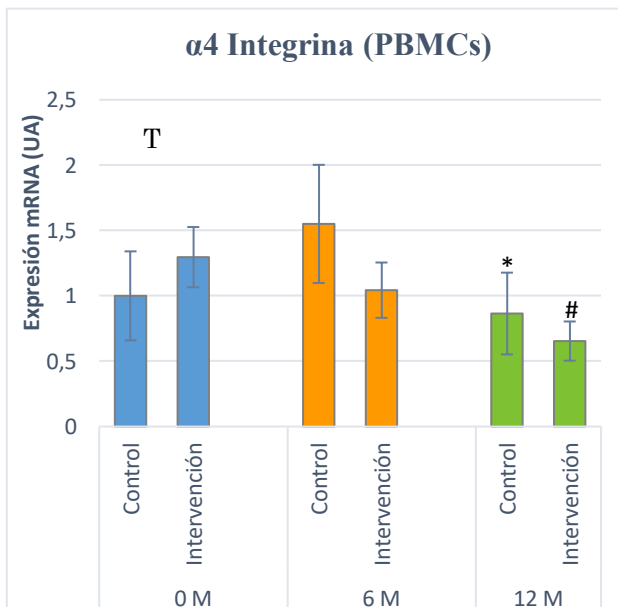
- Two-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : ( $\psi$ ) Interacción Intervención x Tiempo (0,6,12M).
- One-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : (a) Diferencias significativas Control 6 M vs Intervención 6M; (b) Diferencias significativas Control 6 M vs Control 12M; (c) Diferencias significativas Intervención 0 M vs Intervención 12M.

En la **Gráfica 6** se representan los resultados de la expresión del gen constituido L19 en PBMCs. No se encontraron efectos significativos.



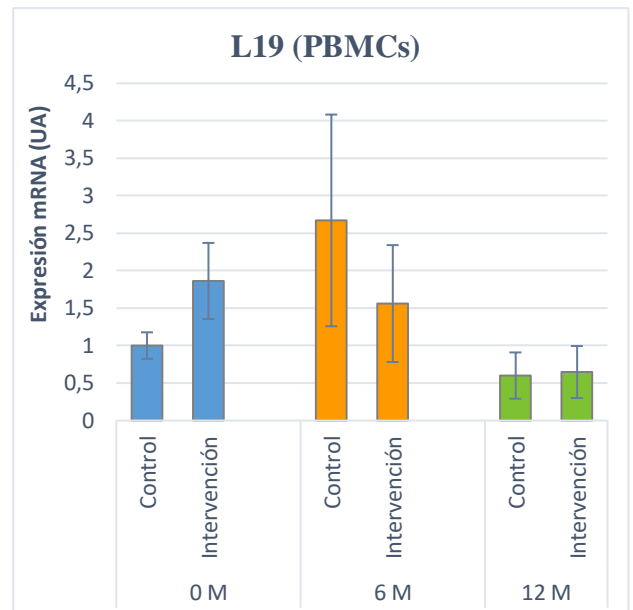
**Gráfica 4.** Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico (n=63) sobre la expresión de β2-integrina en PBMCs.

1. Two-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : ( $\psi$ ) Interacción Intervención x Tiempo (0,6,12M).
2. One-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : (a) Diferencias significativas Control 0M vs Control 6M; (b) Diferencias significativas Intervención 6M vs Intervención 12M.



**Gráfica 5.** Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico (n=158) sobre la expresión de β2-integrina en PBMCs.

1. Two-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : (T) Efecto del Tiempo (0,6,12M).
2. One-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : (\*) Diferencias significativas Control 6M vs Control 12M; (#) Diferencias significativas Intervención 0M vs Intervención 12M.



**Gráfica 6.** Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico (n=48) sobre la expresión de L19 en PBMCs.

1. Two-way ANOVA ( $p < 0,5$ ) : No se encontraron diferencias significativas.

#### 4.2. Incubación de PBMCs y Neutrófilos en presencia de glucosa/GOX

Se incubaron durante 2 horas a 37°C células sanguíneas (PBMCs y Neutrófilos) de pacientes con síndrome metabólico en un sistema productor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estudiamos la expresión de genes inflamatorios (α4 y β2) por parte de las células inmunitarias en respuesta a la exposición a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

##### 4.2.1. Población leucocitaria de neutrófilos :

En la **Gráfica 7** se presentan los resultados de la expresión de la β2-integrina en neutrófilos expuestos a alta (T1) y baja (T2) producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a una situación control. Se puede apreciar un aumento no significativo en la expresión de la β2-integrina en el T2. No se han reportado significancias estadísticas en los niveles de expresión de β2-integrina entre pacientes del grupo inicial y pacientes intervenidos nutricionalmente.

En la **Gráfica 8** se presentan los resultados de la expresión del gen de referencia L19 en neutrófilos expuestos a alta (T1) y baja (T2) producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a una situación control. Se puede observar que su expresión no se ha visto significativamente afectada por ninguno de los dos tratamientos. El hecho de que los pacientes hayan sido intervenidos nutricionalmente tampoco ha alterado su expresión génica.

#### 4.2.2. Población leucocitaria de PBMCs :

En la **Gráfica 9** se presentan los resultados de la expresión de la  $\alpha$ 4-integrina en PBMCs expuestas a alta (T1) y baja (T2) producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a una situación control. Se observa un efecto significativo del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que incrementa la expresión de la  $\alpha$ 4-integrina como consecuencia del tratamiento de las células con una alta producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En cambio, una baja tasa de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no afecta significativamente la expresión de este gen. No se aprecian diferencias significativas en esta respuesta en función de la situación inicial o de intervención nutricional de los pacientes.

En la **Gráfica 10** se presentan los resultados de la expresión de la  $\beta$ 2-integrina en PBMCs expuestas a alta (T1) y baja (T2) producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> respecto a una situación control. No se observa ningún efecto significativo como consecuencia del tratamiento de las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otra parte, no se evidencian diferencias significativas en la expresión del gen  $\beta$ 2 entre la situación inicial y la intervención nutricional.

## 5. Discusión

### 5.1. Efectos de la intervención Predimed-plus en pacientes con síndrome metabólico

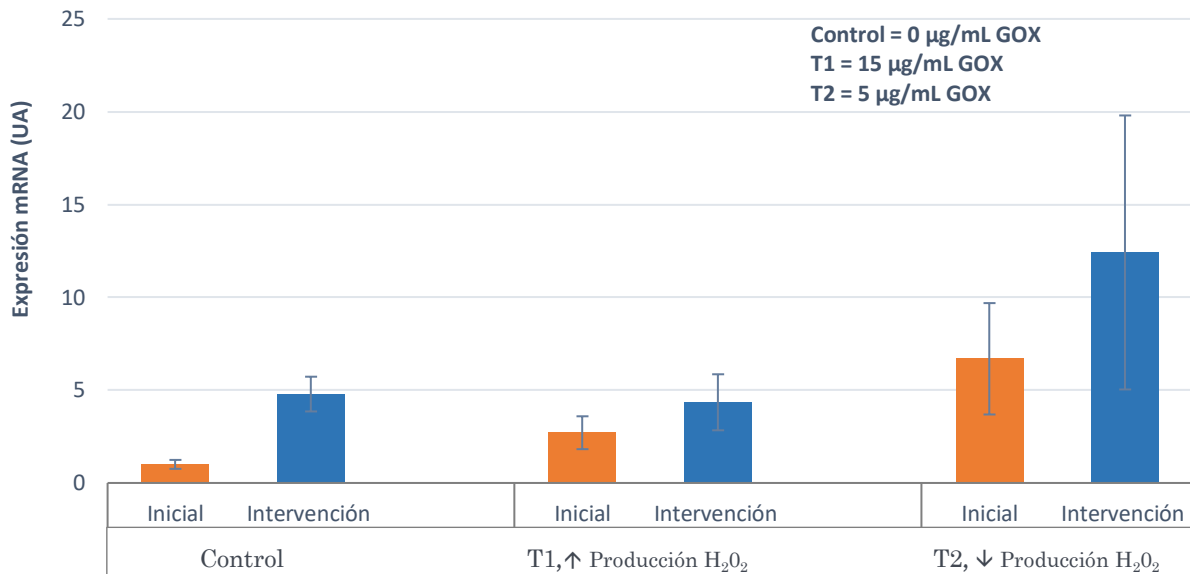
El consumo de carnes rojas o procesadas, frituras y bebidas azucaradas o dietéticas está directamente relacionado con el

riesgo de síndrome metabólico, hay estudios que han asociado el consumo de dicho alimentos con una mayor incidencia de síndrome metabólico<sup>47</sup>. El sedentarismo, a menudo asociado con malos hábitos alimentarios, también juega un papel clave en el desarrollo del síndrome metabólico, de hecho se ha propuesto como la base fisiopatológica principal para el grupo de alteraciones que componen el síndrome metabólico<sup>48</sup>. Por lo tanto, factores exógenos como la obesidad, el sedentarismo y un alimentación poco saludable contribuyen importantemente al desarrollo del síndrome metabólico.

Es por esto que cambios en el estilo de vida, incluyendo una alimentación más saludable, como por ejemplo la dieta mediterránea, y mayor actividad física orientados a la mantención de un peso corporal adecuado, son elementos claves en la prevención y tratamiento del síndrome metabólico. Uno de los mecanismos responsables del efecto cardioprotector de dicha dieta puede ser mediante la reducción del estado inflamatorio crónico de bajo grado asociado con el síndrome metabólico<sup>49</sup>. Actualmente, la evidencia científica apoya que una dieta hipocalórica, como el modelo de dieta mediterránea, en combinación con un programa de ejercicio físico produce una mayor reducción del peso corporal y de la grasa visceral, pueden ser efectivos para reducir la prevalencia del síndrome metabólico y los riesgos cardiovasculares asociados<sup>(49,50)</sup>.

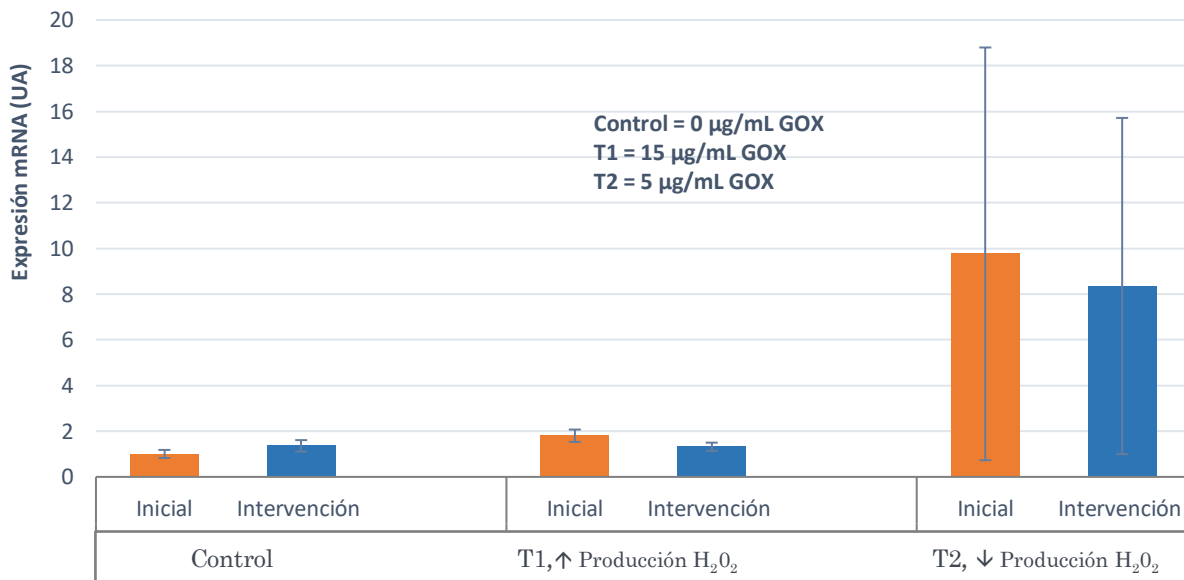
La dieta mediterránea se caracteriza por un elevado consumo de legumbres, frutas, vegetales, granos, aceite de oliva y consumo moderado de vino. Numerosos estudios han demostrado que existe una relación inversa entre el consumo de tales alimentos y el riesgo a padecer síndrome metabólico, estos es explicado por muchos de sus constituyentes.

**β2 Integrina (Neutrófilos)**

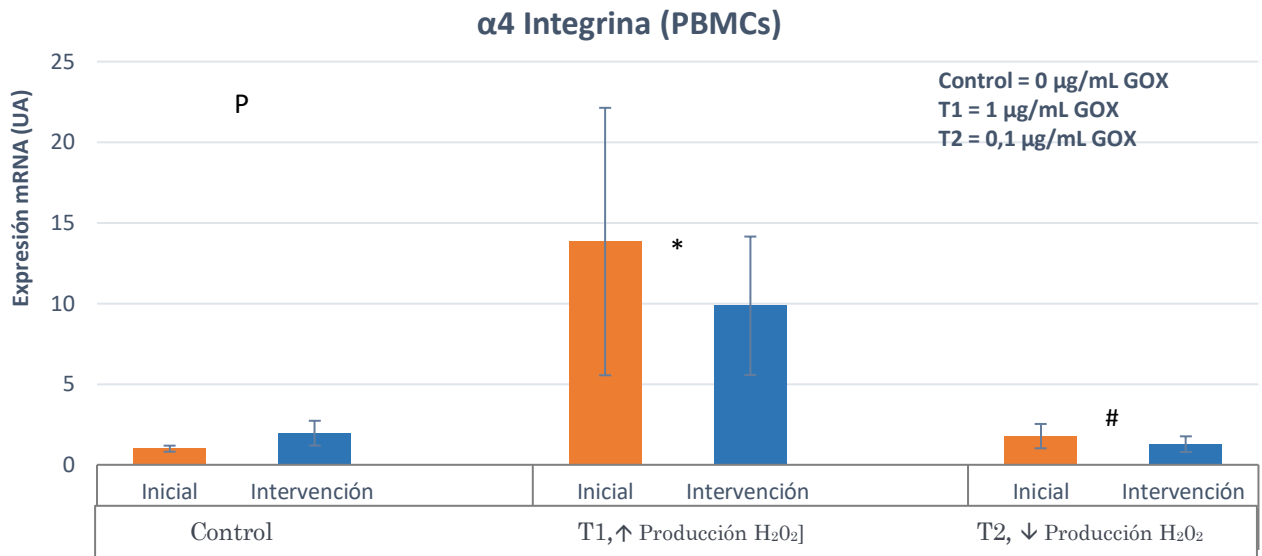


**Gráfica 7.** Representación de los niveles de expresión génica de β2 integrina en neutrófilos expuestos a diferentes niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por un sistema de glucosa/GOX. En el eje de ordenadas se indican los niveles de expresión génica en unidades arbitrarias (UA); en el de abscisas se indican los tratamientos celulares. Los niveles de ARNm del grupo inicial control (no tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron referidos arbitrariamente como 1. Los resultados han sido expresados como Media ± SEM (n=122). Análisis estadístico : ANOVA de dos vías (p <0.05). No se encontraron diferencias significativas.

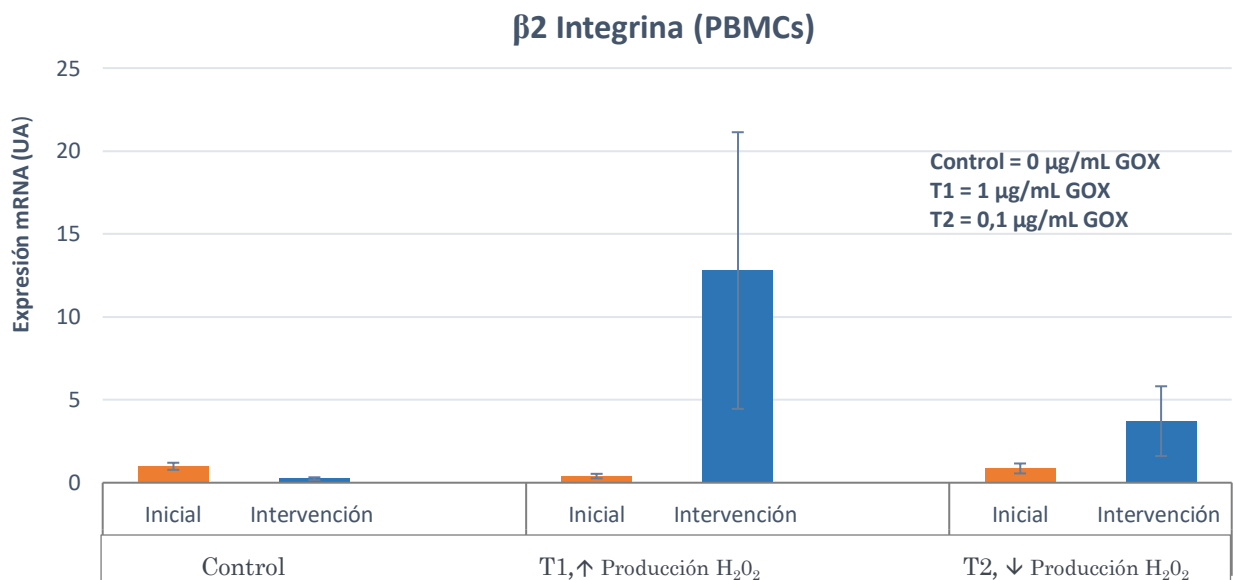
**L19 (Neutrófilos)**



**Gráfica 8.** Representación de los niveles de expresión génica de L19 en neutrófilos expuestos a diferentes niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por un sistema de glucosa/GOX. En el eje de ordenadas se indican los niveles de expresión génica en unidades arbitrarias (UA); en el de abscisas se indican los tratamientos celulares. Los niveles de ARNm del grupo inicial control (no tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron referidos arbitrariamente como 1. Los resultados han sido expresados como Media ± SEM (n=61). Análisis estadístico : ANOVA de dos vías (p <0.05). No se encontraron diferencias significativas.



**Gráfica 9.** Representación de los niveles de expresión génica de  $\alpha 4$  integrina en PBMCs expuestas a diferentes niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por un sistema de glucosa/GOX. En el eje de ordenadas se indican los niveles de expresión génica en unidades arbitrarias (UA); en el de abscisas se indican los tratamientos celulares. Los niveles de ARNm del grupo inicial control (no tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron referidos arbitrariamente como 1. Los resultados han sido expresados como Media  $\pm$  SEM (n=68). Análisis estadístico : ANOVA de dos vías. Los factores estadísticos analizados fueron tratamiento (T1 y T2) e intervención nutricional Predimed-plus (Inicial e Intervención). P indica diferencias significativas (p <0.05) entre el grupo control y el grupo tratado. Cuando se encontraron efectos significativos, se utilizó ANOVA de una vía para determinar las diferencias entre los grupos implicados. \*Indica diferencias significativas, p <0.1, entre el grupo control vs T1 Alta [Peróxido]. # Indica diferencias significativas, p <0.1, entre T1 Alta [Peróxido] vs T2 Baja [Peróxido].



**Gráfica 10.** Representación de los niveles de expresión génica de  $\beta 2$  integrina en PBMCs expuestas a diferentes niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por un sistema de glucosa/GOX. En el eje de ordenadas se indican los niveles de expresión génica en unidades arbitrarias (UA); en el de abscisas se indican los tratamientos celulares. Los niveles de ARNm del grupo inicial control (no tratado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) fueron referidos arbitrariamente como 1. Los resultados han sido expresados como Media  $\pm$  SEM (n=62). Análisis estadístico : ANOVA de dos vías (p <0.05). No se encontraron diferencias significativas.



Se trata de alimentos que proporcionan un complejo conjunto de componentes bioactivos con propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y anti-cancerígenas.

El aceite de oliva, especialmente la variedad virgen extra (retención todos los componentes lipofílicos de la fruta), es rico en ácidos grasos monoinsaturados y polifenoles, compuestos con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias<sup>51</sup>. Se ha asociado el consumo de aceite de oliva con una reducción de la inflamación y con una disminución del riesgo de desarrollar hipertensión<sup>52</sup>. Las legumbres y los frutos secos son ricos en fibra, magnesio, ácido fólico y otros componentes que están asociados con un mejor perfil lipídico, y con una mejor respuesta inflamatoria. Tanto el ácido fólico<sup>33</sup> como la fibra<sup>53</sup> de las legumbres tienden a ralentizar la digestión de carbohidratos, disminuyendo el índice glucémico de la dieta, lo que contribuye a un aumento de la sensibilidad a la insulina y un mejor mantenimiento de la homeostasis glucídica. Además, aceite de oliva, pescados y frutos secos contienen ácidos grasos omega-3, como el ácido docosahexanoico (DHA). Se trata de un componente básico de la dieta mediterránea, reconocido como una molécula con propiedades antiinflamatorias y con la capacidad para activar la defensas antioxidantes<sup>30</sup>. Ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA) disminuyen los niveles nucleares de NF- $\kappa$ B, lo que provoca una disminución en la síntesis de citoquinas proinflamatorias asociadas a esta vía, por ejemplo : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ciclooxigenasa-2 (COX-2)<sup>54</sup>. Estudios demuestran que los suplementos a base de n-3 PUFA reducen la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, ICAM-1 e VCAM-1, considerándose como moléculas inmunosupresoras<sup>55</sup>. Algunos polifenoles presentes en el vino, como el resveratrol y la quercetina, tienen propiedades beneficiosas sobre la presión arterial y efectos antiinflamatorios. El consumo moderado de vino es capaz de aumentar

los niveles de colesterol HDL y disminuir concentraciones de algunas moléculas inflamatorias<sup>56</sup>.

Personas con obesidad presentan elevaciones en los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias, las cuales son un punto de unión entre exceso de adiposidad corporal (sobretudo grasa visceral) con resistencia a la insulina, diabetes y síndrome metabólico<sup>3</sup>. La pérdida de peso asociada al ejercicio físico podría ser un factor importante en la reducción de la expresión de citoquinas proinflamatorias por el tejido adiposo<sup>29</sup>.

El propósito de nuestro estudio fue evaluar si una intervención basada en dieta mediterránea y ejercicio físico regular tienen algún efecto sobre la expresión de genes inflamatorios en pacientes con síndrome metabólico. Estudios previos evidencian que el consumo de una dieta de estilo mediterráneo por parte de pacientes con síndrome metabólico conlleva una mejoría de la función endotelial y una reducción significativa de los marcadores de inflamación vascular sistémica<sup>49</sup>. En un ensayo piloto de Predimed-plus se analizaron los efectos a corto plazo de dos intervenciones basadas en dieta mediterránea, una suplementada con aceite de oliva virgen y otra con nueces, sobre biomarcadores inflamatorios celulares y séricos en pacientes con síndrome metabólico. Concretamente, se quisieron determinar los efectos de ambas dietas sobre mediadores inflamatorios expresados en la superficie celular de PBMC's. Tras 3 meses de intervención, se observó una disminución significativa en la expresión de las integrinas VLA-4 ( $\alpha$ 4/ $\beta$ 1) en linfocitos y Mac-1 ( $\alpha$ M/ $\beta$ 2) en monocitos, resultados que evidencian los efectos antiinflamatorios de la dieta mediterránea<sup>57</sup>. En nuestro estudio hemos obtenidos resultados similares (**Gráficas 1-4**), en los cuales tanto para PBMCs como neutrófilos se evidencian

disminuciones significativas en la expresión de los genes inflamatorios  $\alpha 4$  y  $\beta 2$  integrinas.

### 5.1.1. Población leucocitaria de Neutrófilos :

En la **Gráfica 1** se puede observar que 12 meses después de iniciar la intervención nutricional Predimed-plus, los pacientes de ambos grupos (control e intervención), han reducido significativamente la expresión génica de  $\beta 2$  integrina. Los resultados indican que a pesar de haber diferencias entre los dos grupos en la intensidad de la intervención, el hecho de seguir un patrón de dieta mediterránea con elevado consumo de legumbres, frutas, vegetales, granos, aceite de oliva y consumo moderado de vino, ha sido efectivo al reducirse la expresión de genes implicados en las respuestas inflamatorias. Las  $\beta 2$  integrinas están implicadas en reforzar la adhesión de los leucocitos al endotelio posterior a la captura inicial mediada por selectinas<sup>12</sup>. En pacientes con síndrome metabólico hay un aumento de la expresión de Mac-1 ( $\alpha M / \beta 2$ ) que podría estar mediado por TLR2 y TLR4<sup>(15,16)</sup>, a través del incremento de la secreción de ICAM-1 y VCAM-1 y la consecuente adhesión leucocitaria. Situación que constituiría la base de la inflamación en la aterosclerosis<sup>17</sup>, contribuyendo de esta forma a incrementar el riesgo aterogénico asociado al síndrome metabólico. Una reducción en los niveles de  $\beta 2$  integrina podría ralentizar la progresión de la aterosclerosis al perturbar la adhesión leucocitaria sobre el endotelio disfuncional.

En la **Gráfica 2** se puede apreciar que tras 6 meses de intervención nutricional Predimed-plus los niveles de expresión de  $\alpha 4$  integrina del grupo intervención se han reducido significativamente hasta casi la mitad que los niveles del grupo control. Lo que pone de manifiesto el hecho de que pacientes del **grupo intervención** recibieran una

intervención intensiva basada en dieta mediterránea hipocalórica y tratamiento conductual, mientras que pacientes del **grupo control** siguieran una intervención de baja intensidad dieta mediterránea sin restricción calórica y sin terapia conductual, ha tenido efectos significativos en la expresión de genes inflamatorios. Por otra parte, 12 meses después de iniciar la intervención nutricional Predimed-plus los pacientes con síndrome metabólico de ambos grupos han experimentado una disminución significativa en la expresión de  $\alpha 4$  integrina. La reducción significativa del grupo control ha tenido lugar respecto a los 6 primeros meses, mientras que la de los pacientes del grupo intervención ha sido significativa respecto al inicio del estudio. La explicación para este hecho se basaría en que tras los primeros 6 meses de intervención de baja intensidad los pacientes del grupo control han experimentado un aumento no significativo en la expresión del gen  $\alpha 4$  integrina que puede haber provocado que 6 meses después (12M), la reducción en la expresión de  $\alpha 4$  que ha tenido lugar sea significativa. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la efectividad de la intervención nutricional en la mejora del perfil inflamatorio del síndrome metabólico, y realzan la idea de tratamiento de pacientes con síndrome metabólico a base de dieta mediterránea.

### 5.1.2. Población leucocitaria de PBMCs :

En la **Gráfica 4** se puede observar que 6 meses después de iniciar la intervención no intensiva la expresión génica de  $\beta 2$  de los pacientes del grupo control se ha reducido significativamente. Esto sugiere que los pacientes del grupo control, a pesar de haber recibido tan solo consejos dietéticos pero no terapia conductual han conseguido disminuir la expresión de la  $\beta 2$  integrina en las PBMCs. No está determinado si dichos pacientes realizaron actividad física, ni el grado de adherencia que han alcanzado a la dieta

mediterránea, aunque podría estar de acuerdo con la idea de que los alimentos mediterráneos inducen propiedades antiinflamatorias. Por otra parte, en pacientes del grupo intervención a pesar de que se observa una ligera disminución de la expresión de  $\beta 2$  integrina a los 6 primeros meses esta no ha resultado ser significativa, sin embargo sí que se evidencia una disminución de la expresión en los 6 meses posteriores de iniciar la intervención, es decir, a los 12 meses, lo que no ocurre en el grupo control. Esto sugiere que los 6 meses de consumo de dieta mediterránea hipocalórica, ejercicio físico regular y tratamiento conductual a partir de los primeros 6 meses de iniciar el estudio han sido suficientes para disminuir significativamente los niveles de  $\beta 2$  integrina. La  $\beta 2$  integrina es una proteína de adhesión que contribuye a la internalización de las células inmunitarias en los tejidos para iniciar una respuesta inflamatoria. La reducción de su expresión en PBMCs probablemente reduce la capacidad inflamatoria de estas células, por lo que el condicionamiento conductual de los pacientes hacia seguir las pautas de una dieta mediterránea y aumentar la actividad física de forma regular proporciona un perfil menos inflamatorio a las PBMCs.

Tras 12 meses de iniciar la intervención nutricional Predimed-plus la expresión génica de  $\alpha 4$  integrina se ha reducido significativamente en ambos grupos, tanto **control** como **intervención** (Gráfica 5). Esto sugiere que los pacientes del grupo control, a pesar de no haber recibido los consejos dietéticos y tratamientos conductuales que se proporcionaron a los pacientes del grupo intervención, han conseguido disminuir significativamente la expresión de la  $\alpha 4$  integrina en el mismo periodo de tiempo, lo que pone de manifiesto la motivación y el compromiso de los participantes en el estudio. Estudios previos<sup>13</sup> han demostrado que pacientes con síndrome

metabólico presentan un incremento significativo de los niveles plasmáticos de VLA-4 ( $\alpha 4/\beta 1$ ) en linfocitos, molécula que puede interactuar con la superficie endotelial a través VCAM-1 para permitir la extravasación de las células mononucleares hacia focos inflamatorios. Una disminución significativa en los niveles de  $\alpha 4$  integrina, indica una menor expresión de moléculas de adhesión por parte de las PBMCs, hecho que dificultaría la progresión de la respuesta inflamatoria, al disminuir los contactos iniciales entre integrinas leucocitarias y endotelio. Por lo tanto, los resultados obtenidos en pacientes con síndrome metabólico suponen que la dieta mediterránea tiene potencial para frenar procesos inflamatorios.

La expresión del gen de referencia L19 (Gráficas 3 y 6), no se vió afectada significativamente por la intervención nutricional Predimed-plus, ni tampoco por su duración, en ninguno de los dos tipos celulares : PBMC's y Neutrófilos. Al tratarse de un gen constitutivo, se esperaba que su expresión no resultará afectada por la intervención, resultados que concuerdan con lo obtenido. Por lo tanto, esto demuestra que el gen L19 podría ser utilizado como "housekeeping" para próximas investigaciones.

### 5.2. Incubación de PBMCs y Neutrófilos en presencia de glucosa/GOX

Cuando las células son incubadas a bajas concentraciones de  $H_2O_2$  (ROS), estos actúan como moléculas de señalización que activan la expresión de sistemas antioxidantes (Ejemplo : Mn-SOD, catalasa, glutatión peroxidasa) capaces de eliminar los radicales libres y por tanto de prevenir su acumulación en el medio de cultivo. Sin embargo, se ha demostrado que a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$  (40-50  $\mu M$ )<sup>22</sup> la activación de las defensas antioxidantes no es suficiente para contrarrestar los ROS, lo que desencadena estrés y daño oxidativo. La interacción directa entre

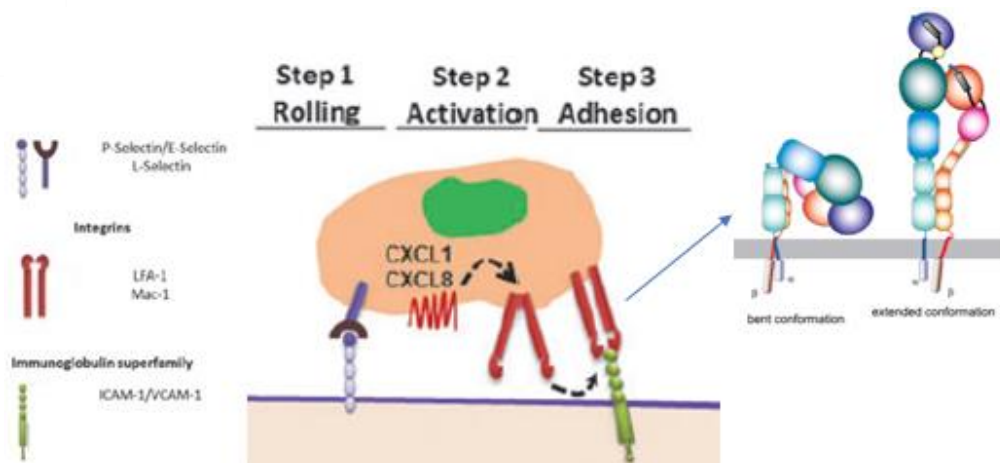
ROS e inflamación puede dirigir hacia diferentes patologías<sup>17</sup>. La acumulación de estrés oxidativo, a menudo acompañado por desequilibrios nutricionales y estilos de vida incorrectos (Ejemplo : Síndrome metabólico), puede inducir la secreción de hormonas proinflamatorias. Es más, el factor NF- $\kappa$ B parece ser activado en respuesta al estrés oxidativo<sup>24</sup>, el cual juega un papel fundamental en una serie de procesos celulares, como la inflamación, la inmunidad, la proliferación celular y la apoptosis.

Un bajo estrés oxidativo (concentraciones exactas aún por definir)<sup>11</sup>, induce la activación de Nrf2, un factor de transcripción implicado en la transactivación de genes que codifican enzimas antioxidantes. Mientras que una cantidad intermedia de ROS desencadena una respuesta inflamatoria a través de la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1<sup>58</sup>. Se ha demostrado<sup>59</sup> que ambos factores, NF- $\kappa$ B y AP-1, regulan la expresión génica tanto a nivel transcripcional como traduccional, de ciertas citoquinas quimiotácticas o mediadores quimiotrayentes conocidas como quimioquinas. La activación de la vía NF- $\kappa$ B provoca la liberación por parte de células endoteliales inflamadas de las quimioquinas<sup>60</sup> : CXCL1 (almacenado en pequeños gránulos citoplásmicos) y CXCL8 (almacenado en cuerpos de Weibel-Palade). La unión de tales quimioquinas a los receptores de quimiotácticos presentes en los leucocitos (CXCR1 y CXCR2), inicia una cascada activadora de señalización intracelular que finalmente incide sobre las colas citoplásmicas de las integrinas.<sup>61</sup> Tiene lugar un cambio conformacional en el dominio citoplásmico de las colas de las integrinas<sup>11</sup>, pasando de la configuración doblada a la completamente extendida de alta afinidad por las moléculas de adhesión endotelial expresadas por el endotelio (ICAM-1 y VCMA-1), (**Figura 3**).

La unión inicial de los leucocitos a la superficie endotelial está mediada por la unión de baja afinidad de las selectinas<sup>11</sup> (P/E expresadas por el endotelio y L expresada por los leucocitos), lo que permite el enrollamiento (“rolling”) de neutrófilos al endotelio. En contraste con la adhesión mediada por selectina, la adhesión de leucocitos por  $\beta$ -2 integrinas es firme y se considera un paso esencial para la migración transendotelial de células inflamatorias. Durante el rodamiento inicial a través de selectinas, los leucocitos encuentran quimioquinas expresadas en las células endoteliales que les permiten adherirse firmemente a los ligandos de integrinas presentes en la superficie endotelial.

Las  $\beta$ -2 integrinas incluyen LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2) y Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2), entre las  $\alpha$ 4-integrinas destaca VLA4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1). LFA-1 es la principal molécula de adhesión en los neutrófilos que se une a ICAM-1 en células endoteliales y media la transición del “rolling” a la adhesión firme en la superficie de la célula endotelial<sup>62</sup>. Mac-1 también se une a ICAM-1 y media el rastreo de los neutrófilos a lo largo de las células endoteliales hasta la entrada de las uniones endoteliales para la migración paracelular. A diferencia de las  $\beta$ 2-integrinas LFA-1 y Mac-1, VLA4 media la adhesión de los neutrófilos a las proteínas de la matriz extracelular, tales como la fibronectina. La integrina VLA4 en neutrófilos murinos media la adhesión de leucocitos a células endoteliales al interactuar con VCAM-1. Sin embargo, VLA4 no se expresa en neutrófilos humanos<sup>11</sup>, pero su función en cambio es servida por la integrina  $\alpha$ 9 $\beta$ 1. Dicha integrina es expresada por los neutrófilos activados, y media la unión a VCAM-1. Sin embargo, la adhesión mediada por la integrina  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 tiene un papel limitado en la adhesión y la migración transendotelial de neutrófilos en comparación con las  $\beta$ 2-integrinas.





**Figura 3.** Activación de los dominios citoplasmáticos de las  $\beta 2$ -integrinas, LFA-1 y Mac-1, por citoquinas quimiotácticas. (Modificado de Mittal et al. 2014; Park et al. 2015)

En PBMCs se esperaban mayores niveles de expresión génica para el gen  $\alpha$ -4 que para  $\beta$ -2, debido a que como hemos comentado anteriormente moléculas como VLA-4 ( $\alpha 4/\beta 1$ ) constituyen la integrina más expresada en linfocitos<sup>63</sup>. En cambio, en los neutrófilos esperábamos elevados niveles del gen  $\beta 2$ , ya que integrinas como LFA-1 ( $\alpha L\beta 2$ ) o Mac-1 ( $\alpha M\beta 2$ ), son las principales moléculas de adhesión expresadas en los neutrófilos. Tanto en PBMCs como en neutrófilos expuestos a elevadas concentraciones de  $H_2O_2$  (T1), deberían haberse observado mayores niveles de expresión en comparación con el T2, ya que según lo citado hasta ahora los ROS pueden desencadenar una respuesta inmunitaria dependiente de integrinas.

### 5.2.1. Población leucocitaria de neutrófilos :

En la **Gráfica 7** se observa que el tratamiento de las células a un sistema productor de bajas concentraciones de  $H_2O_2$  (T2) ha aumentado no significativamente los niveles de expresión génica de  $\beta 2$ -integrina. Como hemos comentado anteriormente concentraciones elevadas de  $H_2O_2$  inducen estrés oxidativo en la células y en consecuencia se activan factores de transcripción sensibles al potencial redox, NF- $\kappa$ B, capaces de estimular la liberación de quimioquinas activadoras de integrinas por parte de las células

endoteliales. El hecho de no haber obtenido significancias estadísticas no nos permite razonar con seguridad lo que puede haber sucedido. Sin embargo, una “posible causa” a los resultados obtenidos la encontramos en un estudio realizado por el equipo de investigación “Nutrició Comunitaria i Estrés Oxidatiu<sup>22</sup> (Universitat de les Illes Balears)”, en el que analizaron los efectos de los ROS sobre la expresión génica de enzimas antioxidantes. Dicho estudio afirma que la activación de los sistemas antioxidantes aumenta paralelamente a la aparición de daño oxidativo : la exposición a [1  $\mu$ M  $H_2O_2$ ] tan sólo fue capaz de inducir la actividad catalasa; la exposición a [10  $\mu$ M  $H_2O_2$ ] incrementó la actividad de todas las enzimas antioxidantes estudiadas (catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y Mn-/superóxido dismutasa). Enlazando dichos resultados con los nuestros, podemos hipotetizar que las células incubadas a altas concentraciones de  $H_2O_2$  (T1) han sido capaces de activar un mayor número de enzimas antioxidantes que las incubadas a bajas concentraciones (T2), evitando la activación de vías proinflamatorias y la expresión de integrinas.

### 5.2.2. Población leucocitaria de PBMCs :

Las  $\beta 2$ -integrinas (LFA-1 y Mac-1) son expresadas mayoritariamente por los neutrófilos, motivo por el cual en la cuantificación de los niveles de expresión

del gen  $\beta 2$  en PBMCs esperabamos resultados mínimos. No hemos obtenido significancias estadísticas para poder afirmar dicha hipótesis, pero en la **Gráfica 8** puede observarse que PBMCs del grupo inicial del T1 presentan una reducción no significativa en la expresión de la  $\beta 2$ -integrina. Por otra parte, en pacientes intervenidos nutricionalmente, tanto en el T1 como en el T2 se observan incrementos no significativos en la expresión de  $\beta 2$ .

En la **Gráfica 9** se puede observar un incremento significativo en la expresión génica la  $\alpha 4$ -integrina en PBMCs como consecuencia del tratamiento de las células con altas concentraciones de  $H_2O_2$  (T1). Los resultados sugieren que los elevados niveles de ROS a los que han sido expuestas las células no han podido ser eliminados por las defensas antioxidantes, generándose estrés oxidativo en la célula, situación que ha activado la vía NF- $\kappa$ B y como consecuencia las PBMCs han expresado significativamente mayores niveles de  $\alpha 4$ . Por otra parte, se observa que el T2 presenta una disminución significativa en los niveles de expresión de la  $\alpha 4$ -integrina con respecto al T1. Lo que parece indicar que los sistemas antioxidantes de las células han conseguido neutralizar los ROS presentes en el medio, evitando así el estrés y daño oxidativo y la consecuente activación de vías proinflamatorias.

### 6. Conclusiones

Un programa combinado de dieta mediterránea y ejercicio físico regular disminuyen la expresión  $\beta 2$  integrina y  $\alpha 4$  integrinas, generándose un perfil más antiinflamatorio en estos pacientes con síndrome metabólico. Las integrinas tienen un papel fundamental en la adhesión de células inmunitarias a la

superficie endotelial, una reducción en su expresión puede contribuir a disminuir el riesgo complicaciones cardiovasculares asociadas al síndrome metabólico, como son la aterosclerosis o el infarto agudo de miocardio. Por lo tanto, se abren las puertas a futuras investigaciones en las cuales se evalúe la dieta mediterránea como posible tratamiento dietético para paliar el síndrome metabólico.

Por otra parte, se ha observado que integrinas inflamatorias de células inmunitarias se ven afectadas tras su exposición a elevadas concentraciones de ROS, concretamente la  $\alpha 4$ -integrina ha aumentado sus niveles de expresión génica como consecuencia de la incubación de PBMCs con un sistema productor de elevadas concentraciones de peróxido de hidrógeno. De lo que se concluye que la  $\alpha 4$ -integrina de PBMCs es sensible al estrés oxidativo, a diferencia de la  $\beta 2$ -integrina.

**Agradecimientos :** En primer lugar quería agradecer a mi tutor, el catedrático Antoni Pons Biescas, por toda la ayuda que me ha dado durante todo el trabajo. Su generosidad y compasión han hecho que todo resultara más fácil. También agradecer a los miembros del “Grup de Nutrició Comunitària i Estres Oxidatiu (Laboratori de Ciències de la Activitat Física)”, especialmente a Xavier Capó, Carla Busquets y Eduardo Salaberry, gracias a ellos desde el primer momento me he sentido como uno más de la familia. Finalmente, reconocer la enorme labor de la “Facultat de Ciències de les Illes Balears”, gracias a la cual todo esto es posible.



## 7. Referencias bibliográficas

1. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International . *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
2. Melo, S. & Lucía, C. Estado protrombótico y síndrome metabólico Pro-thrombotic state and metabolic syndrome. (2005).
3. Félix Redondo, F. J. *et al.* Obesidad, síndrome metabólico y diabetes. *Clin Invest Arter.* **20**, 53–65 (2008).
4. Pe, F. *et al.* Síndrome metabólico en España en 2008-2010: Magnitud y manejo del sí. *Rev. Española Cardiol.* **67**, 367–373 (2014).
5. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
6. Fernández, A. M. REGULACIÓN Y FUNCIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LA INTEGRINA  $\alpha 4\beta 1$  CON LOS DOMINIOS HEP II Y HEP III DE FIBRONECTINA. PAPEL EN LA REORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO Y LA FORMACIÓN DE MATRICES DE FIBRONECTINA. (2007).
7. Springer, T. A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425–434 (1990).
8. Berlin, C. *et al.* A4 Integrins Mediate Lymphocyte Attachment and Rolling Under Physiologic Flow. *Cell* **80**, 413–422 (1995).
9. Vergara CI, Martínez BM, C. L. Las Moléculas de la Emoción. *Biomédica* **14**, 172–179 (1994).
10. Streeter, P. R., Berg, E. L., Rouse, B. T., Bargatze, R. F. & Butcher, E. C. A tissue-specific endothelial cell molecule involved in lymphocyte homing. *Nature* **331**, 41–46 (1988).
11. Mittal, M., Siddiqui, M. R., Tran, K., Reddy, S. P. & Malik, A. B. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1126–1167 (2014).
12. Arnaout, M. A. Biology and structure of leukocyte  $\beta 2$  integrins and their role in inflammation. *F1000Research* **5**, 2433 (2016).
13. Gómez Rosso, L. *et al.* Alterations in cell adhesion molecules and other biomarkers of cardiovascular disease in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* **199**, 415–423 (2008).
14. Jialal, I., Adams-Huet, B. & Devaraj, S. Monocyte cell adhesion molecule receptors in nascent metabolic syndrome. *Clin. Biochem.* **49**, 505–507 (2016).
15. Akira, S. & Takeda, K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511 (2004).
16. Rajamani, U. & Jialal, I. Hyperglycemia induces toll-like receptor-2 and -4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: Implications for diabetic retinopathy. *J. Diabetes Res.* **2014**, 7–10 (2014).
17. Simioni, C. *et al.* Oxidative stress: Role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget* **9**, 17181–17198 (2018).
18. Zaman, M. & Toth, I. Immunostimulation by synthetic lipopeptide-based vaccine candidates: Structure-activity relationships. *Front. Immunol.* **4**, 1–12 (2013).
19. Sallam, N. & Laher, I. Exercise modulates oxidative stress and inflammation in aging and cardiovascular diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 46–54 (2016).
20. Hamilton, K. L. *et al.* Exercise, antioxidants, and HSP72: Protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 800–809 (2003).
21. Bolli, R. & Marban, E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* **79**, 609–634 (1999).
22. Ferrer, M. D., Sureda, A., Mestre, A., Tur, J. a & Pons, A. Cellular Physiology and Biochemistry y Biochemistry The Double Edge of Reactive Oxygen Species as Damaging and Signaling Molecules in HL60 Cell Culture. (2010).
23. Fratelli, M. *et al.* Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13998–4003 (2005).
24. Minatel, I. O., Francisqueti, F. V., Corrêa, C. R. & Pereira Lima, G. P. Antioxidant activity of Y-oryzanol: A complex network of interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
25. Lee, D. *et al.* Long-Term Effects of Changes in Cardiorespiratory Fitness and Body Mass Index on All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Men: The Aerobics Center Longitudinal Study. *Circulation* **124**, 2483–2490 (2011).
26. Tauler, P. *et al.* Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J. Sports Sci.* **23**, 5–13 (2005).
27. Capó, X. *et al.* Diet supplementation with DHA-enriched food in football players during training season enhances the mitochondrial antioxidant capabilities in blood mononuclear cells. *Eur. J. Nutr.* **54**, 35–49 (2015).
28. Peake, J., Suzuki, K. & Science, A. exercise-induced oxidative stress Running Title: Neutrophils, oxidative stress and antioxidants. *Exerc. Immunol. Rev.* **10**, 129–41 (2004).
29. Kawanishi, N., Yano, H., Yokogawa, Y. &

- Suzuki, K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc. Immunol. Rev.* **16**, 105–118 (2010).
30. Martorell, M. *et al.* Docosahexaenoic acid supplementation promotes erythrocyte antioxidant defense and reduces protein nitrosative damage in male athletes. *Lipids* **50**, 131–148 (2015).
31. Busquets-Cortés, C. *et al.* Training Enhances Immune Cells Mitochondrial Biosynthesis, Fission, Fusion, and Their Antioxidant Capabilities Synergistically with Dietary Docosahexaenoic Supplementation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–10 (2016).
32. Kuppusamy, A. *et al.* In vitro ( $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibition) and in vivo antidiabetic property of phytic acid (IP6) in streptozotocin-nicotinamide- induced type 2 diabetes mellitus (NIDDM) in rats. *J. Complement. Integr. Med.* **8**, (2011).
33. Lee, S. H. *et al.* Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutr. Res.* **26**, 474–479 (2006).
34. Kim, J. N., Han, S. N. & Kim, H. K. Phytic acid and myo-inositol support adipocyte differentiation and improve insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. *Nutr. Res.* **34**, 723–731 (2014).
35. Aviram, M. & Fuhrman, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis* **137**, 45–50 (1998).
36. Natella, F., Ghiselli, A., Guidi, A., Ursini, F. & Scaccini, C. Red wine mitigates the postprandial increase of LDL susceptibility to oxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 1036–1044 (2001).
37. Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Chien, P.-Y. & Jameson, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 14138–14143 (1997).
38. Gutiérrez Maydata, A. Vino, Polifenoles Y Protección a La Salud. *Rev. Cuba. Aliment Nutr* **16**, 134–41 (2002).
39. Rodrigo, R., Miranda, A. & Vergara, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Acta* **412**, 410–424 (2011).
40. Kolehmainen, M. *et al.* Bilberries reduce low-grade inflammation in individuals with features of metabolic syndrome. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 1501–1510 (2012).
41. Chiva-Blanch, G. *et al.* Differential effects of polyphenols and alcohol of red wine on the expression of adhesion molecules and inflammatory cytokines related to atherosclerosis: a randomized clinical trial.[Erratum appears in Am J Clin Nutr. 2012 Jun;95(6):1506]. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 326–334 (2012).
42. Energía, R. D. E., Tratamiento, A. F. Y., Sobre, C. & Prevención, L. A. Cardiovascular Estudio Predimed-Plus. 1–73 (2015).
43. Mestre-Alfaro, A. *et al.* Phytoestrogens enhance antioxidant enzymes after swimming exercise and modulate sex hormone plasma levels in female swimmers. *Eur. J. Appl. Physiol.* **111**, 2281–2294 (2011).
44. Feoktistova, M., Geserick, P. & Leverkus, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 343–346 (2016).
45. Sureda, A., Hebling, U., Pons, A. & Mueller, S. Extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and not superoxide determines the compartment-specific activation of transferrin receptor by iron regulatory protein 1. *Free Radic. Res.* **39**, 817–24 (2005).
46. Davies, B. & Fried, M. The L19 ribosomal protein gene (RPL19): gene organization, chromosomal mapping, and novel promoter region. *Genomics* **25**, 372–80 (1995).
47. Dussaillant, C., Echeverría, G., Villarroel, L., Marin, P. P. & Rigotti, A. Una alimentación poco saludable se asocia a mayor prevalencia de síndrome metabólico en la población adulta chilena: Estudio de corte transversal en la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010. *Nutr. Hosp.* **32**, 2098–2104 (2015).
48. Duperly, J. Sedentarismo vs ejercicio en el síndrome metabólico Sedentary vs . Active lifestyle in metabolic syndrome. *Acta Médica Colomb.* **30**, 137–173 (2005).
49. Esposito, K. *et al.* Effect of a Mediterranean-style diet on endothelial dysfunction and markers of vascular inflammation in the metabolic syndrome - A randomized trial. *Jama-Journal Am. Med. Assoc.* **292**, 1440–1446 (2004).
50. Babio, N. *et al.* Adherence to the Mediterranean diet and risk of metabolic syndrome and its components. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **19**, 563–570 (2009).
51. Capó, X. *et al.* Effects of almond- and olive oil-based docosahexaenoic- and vitamin E-enriched beverage dietary supplementation on inflammation associated to exercise and age. *Nutrients* **8**, 1–18 (2016).
52. Alonso, A., Perona, J. S., Ruiz-Gutiérrez, V. & Martínez-González, M. A. Olive Oil Consumption and Reduced Incidence of Hypertension: The SUN Study. *Olives Olive Oil Heal. Dis. Prev.* 801–805 (2010). doi:10.1016/B978-0-12-374420-3.00084-X
53. Frost, G. *et al.* Glycaemic index as a determinant of serum HDL-cholesterol concentration. *Lancet* **353**, 1045–1048 (1999).
54. Calder, P. C. n-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: From molecular biology to

- the clinic. *Lipids* **38**, 343–352 (2003).
55. Martorell, M., Capó, X., Sureda, A., Tur, J. A. & Pons, A. Effects of docosahexaenoic acid diet supplementation, training, and acute exercise on oxidative balance in neutrophils. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **39**, 446–457 (2014).
  56. Ellison, R. C. *et al.* Lifestyle determinants of high-density lipoprotein cholesterol: The National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am. Heart J.* **147**, 529–535 (2004).
  57. Estruch, R. Anti-inflammatory effects of the Mediterranean diet: The experience of the PREDIMED study. *Proc. Nutr. Soc.* **69**, 333–340 (2010).
  58. Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF- $\kappa$ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1493–1505 (2006).
  59. Mangahas, C. R., Dela Cruz, G. V., Friedman-Jiménez, G. & Jamal, S. Endothelin-1 induces CXCL1 and CXCL8 secretion in human melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **125**, 307–311 (2005).
  60. Barnes, P. J. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin. Sci.* **131**, 1541–1558 (2017).
  61. Park, E. J., Yuki, Y., Kiyono, H. & Shimaoka, M. Structural basis of blocking integrin activation and deactivation for anti-inflammation. *J. Biomed. Sci.* **22**, 1–9 (2015).
  62. Smith, A. *et al.* The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunol. Rev.* **218**, 135–146 (2007).
  63. Hogg, N., Patzak, I. & Willenbrock, F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 416–426 (2011).