



EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Patricia Josefina López Uriarte

ISBN: 978-84-694-0325-9

Dipòsit Legal: T-197-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Patricia Josefina López Uriarte

**EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS
SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO**

TESIS DOCTORAL

dirigida por

Prof. Jordi Salas Salvadó y Dra. Mònica Bulló Bonet

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT DE REUS
UNITAT DE NUTRICIÓ HUMANA - DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

Jordi Salas-Salvadó, Catedrático de Nutrición y Bromatología del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICO:

Que este trabajo, titulado **“Efecto del consumo de frutos secos sobre el estrés oxidativo”**, que presenta la Sra. Patricia Josefina López Uriarte para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Universidad.

Reus, 20 de septiembre de 2010



Prof. Jordi Salas-Salvadó
Unitat de Nutrició Humana
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT DE REUS
UNITAT DE NUTRICIÓ HUMANA - DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOTECNOLOGIA

Mònica Bulló Bonet, Profesora Agregada del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICO:

Que este trabajo, titulado **“Efecto del consumo de frutos secos sobre el estrés oxidativo”**, que presenta la Sra. Patricia Josefina López Uriarte para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Universidad.

Reus, 20 de septiembre de 2010



Dra. Mònica Bulló Bonet
Unitat de Nutrició Humana
Departament de Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecerles a mis directores de tesis, el Prof. Jordi Salas Salvadó y la Dra. Mònica Bulló la posibilidad de compartir cuatro años de mi vida con ustedes. Gracias por aceptar ser mis Maestros en esta parte de mi camino y por su implicación en mi proceso de formación, aprendizaje, desarrollo y por las enseñanzas que tuvieron a bien transmitirme. A Carles Munné gracias por recordarme casi a diario mi mexicanidad con sus constantes "ándales" que añadía casi siempre en sus conversaciones. También agradecer a todas las compañeras y los compañeros que actualmente trabajamos en la Unidad de Nutrición Humana, por su compañía durante este período.

Gracias al Dr. Eusebio Angulo de la Universidad de Guadalajara (UdeG), México, por sus palabras de aliento que me animaron a estudiar el doctorado fuera de mi país. Agradezco muy especialmente al Dr. Raúl Vargas, la Dra. Bárbara Vizmanos y actualmente a la Dra. Norma Quezada, quienes como jefes de departamento al cual estoy adscrita en la UdeG, me brindaron todo su apoyo y permitieron mi estancia en Catalunya, para realizar el máster y la tesis doctoral en Nutrición y Metabolismo.

Gracias por siempre a la Dra. Esther Casanueva (QDEP), mi ejemplo de nutrióloga y de quien aprendí que aún las tareas más difíciles y las responsabilidades más serias, siempre pueden alcanzarse con esfuerzo y dedicación. Gracias por tu fortaleza y sabiduría, pero sobretodo por tu alegría y amistad que siempre irradiabas hacia los demás. Gracias a Claudia Hunot y Bárbara Vizmanos, mis queridas amigas, entrañables Maestras y compañeras de múltiples "batallas". Aunque nuestra comunicación se redujo hasta niveles mínimos en estos años, las tres sabemos que no es necesario conversar a diario para mantener la unidad y el cariño entre nosotras. Gracias Fabiola Márquez por el tiempo compartido en Reus, en donde llegamos a convertirnos en las mejores amigas.

Mi mayor admiración a la tenacidad del pueblo catalán, así como a su oferta cultural y a la belleza de los paisajes de sus tierras, mares y ciudades. Gracias por mantener vivas sus tradiciones, costumbres alimentarias y fiestas, pero sobretodo por persistir en celebrarlas.

Gracias a quienes me invitaron a las "calçotadas" (Vero Luque, Jordi Salas, Rosi González y la Patricia Casas), porque además de saborear la deliciosa salsa romesco que acompaña a los calçots, tuve la oportunidad de convivir con familiares y amigos que siempre se reúnen en esta maravillosa tradición catalana. Gracias a Catalunya por dejarme vivir y convivir en este país.

Gracias por el tiempo compartido con las chicas de las "promociones" de becarias y del PREDIMED (Clara Alegret, Patricia Martínez, Pilar Amigó, Patricia Casas, Fabiola Márquez, Mar Garcia, Mar Sorlí y Cristina Molina), la linda enfermera del CAP (Rosi González), las chicas de los hospitales Sant Joan y Joan XXIII (Nuria Guillén, Isabel Megías y Carme Martí) y no podía faltar mi querida amiga de Porto, la portuguesa Ana Pauperio, a todas ellas mi profundo agradecimiento por las incontables "pláticas" salpicadas todas ellas de alegrías, angustias, satisfacciones, miedos, risas, tristezas, carcajadas, enojos, felicidad y tantas emociones más. Gracias queridas amigas por las cenas, las comidas, los cafés, las "chocolaterapias" y algunos vermouth, pero sobretodo por todos los momentos inolvidables que pasamos juntas y que sirvieron para fortalecer nuestro corazón y nuestro espíritu. Agradezco especialmente a Patricia Casas, porque además de ser la mejor compañera de proyecto de investigación que pude haber tenido, me abrió las puertas de su casa y su familia. Gracias a Ángela tu madre, por su amistad y sus deliciosos platillos que preparaba para comer y a Manuel, tu padre, por las risas compartidas y la canción "Guadalajara" que tanto le gusta entonar. Desde mi corazón muchas gracias a toda la familia Casas-Agustench.

Agradezco a mi padre el enorme sentido de responsabilidad, excelencia y bien hacer que siempre he admirado, sobretodo como médico. Decirte que a pesar de los diferentes caminos que tuvimos que recorrer como familia, siempre has estado y permanecerás en mi corazón. Te quiero muchísimo, padre. A mi madre, gracias por su fortaleza, esfuerzo y tenacidad para salir adelante junto con nosotros. Gracias madre por el amor que brindas a quienes estamos a tu alrededor, por la alegría que demuestras ante la vida y tu capacidad de disfrutar desde una sencilla conversación hasta una hermosa pieza de Bach. Gracias por enseñarnos que la vida está llena de tolerancia y diversidad. Te adoro, madre. Gracias a mis hermanos Juan Arturo, Francisco Xavier, Roberto, Armando, Ernesto y mi hermana Ana, soy muy afortunada y estoy feliz de ser su hermana.

A mi amado Luis Raúl, le agradezco su compañía, aunque lejana siempre presente. Gracias Luis por tu apoyo para llevar a cabo esta aventura, gracias por tus risas y bromas transoceánicas, por tus correos electrónicos escritos con el corazón, pero sobre todo mi Luis agradezco tu cariño y amor solidario, tu bondad y tu paciencia hacia mí y quienes tenemos la fortuna de estar cerca de ti. Gracias Luis, por dejarme compartir mi vida contigo y por enseñarme lo maravilloso que puede resultar el día a día en tu compañía. Gracias además, por cuidar de nuestro lindo gatito "squal". Sabes que te quiero siempre, mucho.

Finalmente, quiero agradecer la beca y ayuda predoctoral (2006-2010) otorgada a mi persona por la Direcció General de Recerca del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu. Este apoyo me brindó la oportunidad de formarme y de hacer la tesis doctoral

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA – Asociación Americana de Diabetes
- ADN – Ácido desoxirribonucleico
- AHA – Asociación Americana del Corazón
- AGE – Productos finales de glicación avanzada
- AGMI – Ácidos grasos monoinsaturados
- AGPI – Ácidos grasos polinsaturados
- AGS – Ácidos grasos saturados
- c-HDL – Colesterol HDL
- c-LDL – Colesterol LDL
- CAT – Catalasa
- Cmax – Producción de dienos conjugados
- DMed – Dieta Mediterránea
- DM2 – Diabetes mellitus tipo 2
- ECV – Enfermedades cardiovasculares
- ERN – Especies reactivas al nitrógeno
- ERO – Especies reactivas al oxígeno
- ET-1 - Endotelina
- FDA – Administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos
- FRAP – Capacidad antioxidante de reducir el hierro
- GAE – Equivalentes de ácido gálico
- GPx – Glutation peroxidasa
- GSH – Glutación, reducido
- GSSG – Glutación, oxidado
- $H\cdot^-$ – Radical hidrógeno
- $HO\cdot^-$ – Anión hidroxilo
- H_2O_2 – Peróxido de hidrógeno
- 8-OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
- HDL – Lipoproteína de alta densidad
- HPLC – Cromatografía líquida de alta resolución
- HTA – Hipertensión arterial

ICAM-1 – Molécula intracelular de adhesión vascular-1

IMC – Índice de masa corporal

lag time – Fase de retardo para inicio de la peroxidación lipídica

LDL – Lipoproteína de baja densidad

LDL-ox – LDL oxidada

MDA – Malondialdehído

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCEP-ATPIII – Tercer Reporte del Panel de Expertos del Programa Nacional de Educación sobre
el Colesterol para la Detección, Evaluación, y Tratamiento del Colesterol
Sanguíneo Elevado en Adultos

NF- κ β – Factor de transcripción-kappa beta

NHLBI – Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre

NO \cdot – Óxido nítrico

O $_2$ – Oxígeno molecular singlete

O $_2\cdot^-$ – Anión superóxido

OMS – Organización Mundial de la Salud

ONOO \cdot^- – Peroxinitrito

ORAC – Capacidad de absorción de radicales de oxígeno

ORAC-H – ORAC- de la fracción hidrofílica

ORAC-L – ORAC- de la fracción lipofílica

7- α -OOH \cdot^- – Oxiesterol

PAT – Tonometría arterial periférica

RAGE – Receptores de productos finales de glicación avanzada

ROO \cdot^- – Peroxilo

SOD – Superóxido dismutasa

TBARS – Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TEAC – Capacidad antioxidante equivalente trolox

TRAP – Potencia total de captura de radicales

USDA – Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

VCAM-1 – Molécula celular de adhesión vascular-1

Vmax – Velocidad máxima de producción de dienos conjugados

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Balance de especies reactivas y antioxidantes *in vivo*.

Figura 1.2. Desarrollo y establecimiento de la placa aterosclerótica.

Figura 1.3. Activación de los macrófagos por las LDL-ox y formación de células espumosas.

Figura 1.4. Relación entre la dieta y el riesgo de enfermedades crónico-degenerativas.

Figura 1.5. Contenido de fenoles totales y proantocianidinas en los frutos secos.

Figura 1.6. Estudios epidemiológicos que asocian el consumo de frutos secos y el riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria.

Figura 5.1. Perfil cinético de formación de dienos conjugados (partículas de LDL).

Figura 5.2. Sistema EndoPAT-2000.

Figura 6.1. Capacidad antioxidante de las dietas experimentales y los suplementos.

Figura 6.2. Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la capacidad antioxidante del plasma (ensayos ORAC y FRAP).

Figura 6.3. Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la capacidad antioxidante del plasma en relación a la concentración de glutatión (GSH, GSSG y el cociente GSSG/GSH).

Figura 6.4. Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados).

Figura 6.5. Diagrama de flujo de los individuos del estudio.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.1. Radicales libres de relevancia biológica.
- Tabla 1.2. Contenido de macronutrientes en los frutos secos crudos y tostados (g/100 g).
- Tabla 1.3. Contenido de grasa total y ácidos grasos en los frutos secos crudos (g/100 g).
- Tabla 1.4. Contenido de fibra en los frutos secos (g/100 g).
- Tabla 1.5. Contenido promedio de vitamina E en los frutos secos (mg/100 g).
- Tabla 1.6. Contenido de diferentes vitaminas en los frutos secos.
- Tabla 1.7. Contenido de calcio, magnesio, sodio y potasio en los frutos secos (mg/100 g).
- Tabla 1.8. Contenido de fitoesteroles en los frutos secos (mg/100 g).
- Tabla 1.9. Contenido de flavonoides en los frutos secos (mg/100 g).
- Tabla 1.10. Capacidad antioxidante total de los frutos secos.
- Tabla 1.11. Estudios clínicos de intervención que evalúan el efecto del consumo crónico de frutos secos sobre el estrés oxidativo.
- Tabla 1.12. Estudios clínicos de intervención que evalúan el efecto del consumo agudo de frutos secos sobre el estrés oxidativo.
- Tabla 5.1. Composición de las dietas experimentales.
- Tabla 6.1. Características del peso corporal en los animales de experimentación.
- Tabla 6.2. Características generales de los sujetos al inicio del estudio.
- Tabla 6.3. Porcentaje de ácido α -linolénico plasmático de los sujetos del estudio.
- Tabla 6.4. Ingesta basal de macronutrientes, colesterol, fibra y alcohol de la dieta.
- Tabla 6.5. Efecto de la intervención sobre la ingesta de energía, macronutrientes, colesterol, fibra y alcohol de la dieta.
- Tabla 6.6. Características basales de adiposidad, presión arterial y perfil lipídico.
- Tabla 6.7. Efecto de la intervención sobre la adiposidad, la presión arterial y el perfil lipídico.
- Tabla 6.8. Valores basales y efecto de la intervención sobre los marcadores de estrés oxidativo.
- Tabla 6.9. Valores basales, efecto de la intervención y ajuste del efecto de la intervención del 8-oxodG por el cambio de peso corporal.
- Tabla 6.10. Valores basales y efecto de la intervención sobre los marcadores de la función endotelial.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

INDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
1. Estrés oxidativo	3
1.1. Bioquímica y origen de los radicales libres	3
1.2. Efectos del estrés oxidativo/nitrosativo	6
1.2.1. Daño oxidativo a lípidos	6
1.2.2. Daño oxidativo a proteínas.....	7
1.2.3. Daño oxidativo al ADN	7
1.2.4. Daño oxidativo a hidratos de carbono	7
1.3 Mecanismos de defensa antioxidante	8
1.3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos	8
1.3.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos	9
2. Estrés oxidativo y patologías asociadas	10
2.1. Diabetes mellitus tipo 2	10
2.1.1. Estudios epidemiológicos que muestran la relación entre diabetes mellitus tipo 2 y estrés oxidativo	11
2.1.2. Mecanismos que explican la relación entre diabetes mellitus tipo 2 y estrés oxidativo	13
2.1.3. Fuentes de radicales libres inducidos por hiperglucemia	13
2.1.3.1. Productos finales de glicación avanzada	13
2.1.3.2. Auto-oxidación de la glucosa	14
2.1.3.3. Vía del poliol (sorbitol)	14
2.1.3.4. Otros mecanismos.....	15
2.1.4. Estudios de intervención con antioxidantes para el tratamiento y prevención de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones	15
2.1.4.1. Estudios de intervención con suplementos de vitamina E y C combinados.....	16
2.1.4.2. Estudios de intervención con suplementos de vitamina E	16
2.1.4.3. Estudios de intervención con ácido lipoico	17
2.2. Enfermedades cardiovasculares	18
2.2.1. Estudios que muestran la relación entre las enfermedades cardiovasculares y el estrés oxidativo	19
2.2.1.1. Estudios epidemiológicos	19
2.2.1.2. Estudios experimentales	20
2.2.2. Estudios que muestran la relación entre las enfermedades cardiovasculares y el consumo de antioxidantes	21
2.2.2.1. Estudios epidemiológicos	21
2.2.2.2. Estudios experimentales	22

2.2.3. Mecanismos que explican la relación entre las enfermedades cardiovasculares y el estrés oxidativo	23
2.3. Síndrome metabólico	26
2.3.1. Estudios que muestran la relación entre el síndrome metabólico y el estrés oxidativo	26
2.3.1.1. Estudios observacionales.....	27
2.3.1.2. Estudios experimentales	29
2.3.1.3. Estudios de intervención	31
2.4. Estrés oxidativo asociado a otras enfermedades	33
2.4.1. Estrés oxidativo y cáncer	33
2.4.2. Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas	33
3. Papel de la dieta como modulador del estrés oxidativo.....	35
3.1. Frutas y verduras como moduladores del estrés oxidativo	36
3.2. Aceite de oliva como modulador del estrés oxidativo	38
3.3. Vino como modulador del estrés oxidativo	40
3.4. Patrones dietéticos y su relación con el estrés oxidativo	42
3.4.1. Patrón dietético prudente y estrés oxidativo	42
3.4.2. Patrón dietético Mediterráneo y estrés oxidativo	43
3.4.3. Patrón dietético occidentalizado y estrés oxidativo	46
4. Frutos secos.....	46
4.1. Definición de frutos secos	46
4.2. Composición nutrimental de los frutos secos.....	47
4.2.1. Contenido de macronutrientes y densidad energética	47
4.2.1.1. Lípidos	48
4.2.1.2. Proteínas	49
4.2.1.3. Hidratos de carbono y fibra dietética	50
4.2.1.4. Vitaminas	51
4.2.1.5. Minerales	53
4.3. Composición fitoquímica de los frutos secos.....	54
4.3.1. Fitoesteroles.....	54
4.3.2. Carotenoides	54
4.3.3. Polifenoles	55
4.3.3.1. Contenido total de fenoles.....	55
4.3.3.2. Flavonoides	56
4.3.3.3. Resveratrol	57
4.3.3.4. Otros compuestos	58
4.3.4. Melatonina	58
4.4. Capacidad antioxidante de los frutos secos	59
4.5. Biodisponibilidad y metabolismo de los componentes polifenólicos contenidos en los frutos secos.....	59
4.6. Estudios que muestran la relación entre el consumo de frutos secos y el estrés oxidativo	61

4.6.1. Estudios epidemiológicos que analizan el consumo de frutos secos y su asociación con el estrés oxidativo	62
4.6.2. Estudios epidemiológicos que analizan el consumo de frutos secos y su asociación con las enfermedades cardiovasculares	62
4.6.3. Estudios de intervención que evalúan el efecto del consumo de frutos secos sobre el estrés oxidativo	64
4.6.3.1. Efecto del consumo de frutos secos sobre la capacidad antioxidante	69
4.6.3.2. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica (partículas de LDL-oxidadas)	70
4.6.3.3. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica (malondialdehído)	71
4.6.3.4. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica (isoprostanos)	72
4.6.3.5. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica (perfil cinético de formación de dienos conjugados)	73
4.6.3.6. Efecto del consumo de frutos secos sobre la actividad antioxidante enzimática y no enzimática	74
4.6.3.7. Efecto del consumo de frutos secos sobre el daño oxidativo al ADN (8-oxodG)	75
4.6.4. Estudios experimentales con modelos animales que evalúan el efecto del consumo de frutos secos y el estrés oxidativo	76
4.6.5. Estudios <i>in vitro</i> que analizan la relación entre los frutos secos y el estrés oxidativo	78
II. JUSTIFICACIÓN	81
III. HIPÓTESIS	85
IV. OBJETIVOS	89
V. MATERIALES Y MÉTODOS	93
1. Efecto del consumo crónico de nuez entera y de extracto de piel de nuez sobre el estado oxidativo en ratones	95
1.1. Diseño del estudio.....	95
1.2. Modelos de experimentación animal	95
1.3. Dietas experimentales	95
1.4. Determinaciones analíticas	97
1.4.1. Sacrificio de los animales y obtención de muestras de sangre	97
1.4.2. Capacidad antioxidante del plasma (ensayo ORAC)	97
1.4.3. Capacidad antioxidante del plasma (ensayo FRAP)	98

1.4.4. Peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados)	98
1.4.5. Capacidad antioxidante del plasma (GSH, GSSG y el cociente GSSG/GSH)	100
1.4.6. Capacidad antioxidante de las dietas experimentales y los suplementos (ensayo ORAC- hidrofílico y ORAC lipofílico)	100
1.5. Análisis estadísticos	101
2. Efecto del consumo de frutos secos sobre el estado oxidativo y la función endotelial en individuos con síndrome metabólico	101
2.1. Diseño del estudio	101
2.2. Sujetos del estudio	102
2.3. Dietas de intervención	103
2.4. Evaluación clínica, antropométrica y actividad física	104
2.5. Evaluación de la ingesta dietética.....	105
2.6. Obtención y procesado de muestras sanguíneas	105
2.6.1. Capacidad antioxidante del plasma (ensayo ORAC)	105
2.6.2. Peroxidación lipídica del plasma (partículas LDL-oxidadas)	106
2.6.3. Peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados)	106
2.6.4. Peroxidación lipídica en muestras de orina (producción de isoprostanos).....	106
2.6.5. Daño oxidativo al ADN en muestras de orina (producción de 8-oxodG).	106
2.6.6. Marcadores plasmáticos de función endotelial (moléculas de adhesión celular vascular)	107
2.6.7. Función endotelial in vivo (tonometría arterial periférica)	107
2.7. Análisis estadísticos	109
VI. RESULTADOS	111
1. Efecto del consumo de nuez entera y extracto de piel de nuez sobre el estatus oxidativo en ratones	113
1.1. Capacidad antioxidante de las dietas experimentales y los suplementos (ensayo ORAC- hidrofílico y ORAC lipofílico)	113
1.2. Peso corporal y consumo de alimentos	114
1.3. Capacidad antioxidante del plasma (ensayos ORAC y FRAP)	114
1.4. Capacidad antioxidante del plasma (GSH, GSSG y el cociente GSSG/GSH)	115
1.5. Peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados)	116
2. Efecto del consumo de frutos secos sobre el estado oxidativo y la función endotelial en individuos con síndrome metabólico	118
2.1. Grupo poblacional de estudio.....	118
2.2. Características generales de los sujetos del estudio	118
2.3. Adherencia a las recomendaciones dietéticas	119

2.4. Ingesta de energía, nutrientes, fibra y alcohol).....	120
2.5. Adiposidad, presión arterial y perfil lipídico	122
2.6. Marcadores de estrés oxidativo	123
2.7. Marcadores de la función endotelial	123
VIII. DISCUSIÓN	127
1. Efecto del consumo de nuez entera y extracto de piel de nuez sobre el estatus oxidativo en ratones	129
2. Efecto del consumo de frutos secos sobre el estado oxidativo y la función endotelial en individuos con síndrome metabólico	131
VIII. CONCLUSIONES	137
IX. BIBLIOGRAFÍA	141
X. ANEXOS	173
1. Publicaciones científicas.	175
1.1. López-Uriarte P, Bulló M, Casas-Agustench P, Babio N, Salas-Salvadó J. Nuts and oxidation: a systematic review. Nutr Rev 2009;67(9):497-508.	
1.2. Bulló M, Nogués MR, López-Uriarte P, Salas-Salvadó J, Romeu M. Effect of whole walnuts and walnut-skin extracts on oxidant status in mice. Nutr 2010;26(7-8):823-828.	
1.3. López-Uriarte P, Nogués R, Saez G, Bulló M, Romeu,M, Masana L, Tormos C, Casas-Agustench P, Salas-Salvadó J. Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome. Clin Nutr 2010;29(3):373-80.	

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

I. INTRODUCCIÓN

1. Estrés oxidativo

1.1. Bioquímica y origen de los radicales libres

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en su orbital atómico exterior (Halliwell B. 1994). Esta característica los convierte en sustancias de vida media corta, altamente inestables y con un alto grado de reactividad (Miller DM, *et al.* 1990). Los radicales libres son sustancias imprescindibles en los organismos vivos, ya que ejercen funciones vitales relacionadas con el mantenimiento de los sistemas biológicos, ayudando a mantener la homeostasis a nivel celular en tejidos sanos y ejerciendo un papel importante como moléculas de señalización (Devasagayam TP, *et al.* 2004). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el aumento de radicales libres está implicado en la etiología de diversas enfermedades degenerativas como aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), enfermedades neurodegenerativas, cáncer y envejecimiento (Halliwell B, *et al.* 1997, Finkel T, *et al.* 2000, Finkel T. 2003, Dierckx N, *et al.* 2003, Willcox JK, *et al.* 2004, Ceriello A, *et al.* 2004).

Puesto que el oxígeno es imprescindible en los procesos aeróbicos, los radicales libres derivados del oxígeno molecular (O_2) reconocidos como especies reactivas al oxígeno (ERO), forman el grupo de radicales libres más importante para el hombre (Miller DM, *et al.* 1990). Otro grupo relevante son las especies reactivas al nitrógeno (ERN), que se originan a partir de reacciones que involucran a otro radical libre, el óxido nítrico ($NO\cdot^-$) (Beckman KB, *et al.* 1998). Existen también radicales libres, como es el caso de los tioles, que contienen azufre como grupo reactivo; o aquéllos que contienen carbono en su centro reactivo (Chihuailaf RH, *et al.* 2002) (Tabla 1.1.).

Las ERO se producen *in vivo* como consecuencia del metabolismo del O_2 a partir de fuentes endógenas y exógenas. Las ERO comprenden un colectivo de moléculas que incluyen radicales inestables de oxígeno, como el radical superóxido ($O_2\cdot^-$) y el radical hidroxilo ($HO\cdot^-$), así como también algunas moléculas no radicales como es el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

(Roberts CK, *et al.* 2009). Aunque las fuentes endógenas de ERO se producen a nivel intracelular, los radicales libres pueden ejercer sus efectos dentro y fuera de la célula (Machlin LJ, *et al.* 1987).

Tabla 1.1. Radicales libres de relevancia biológica.

Radical libre	Ejemplo
Centrado en el hidrógeno	Átomo de H (1 protón, 1 electrón)
Centrado en el carbono	Radical triclorometil, CCl ₃ •
Centrado en el sulfuro	Radical tiol, R-S•
Centrado en el nitrógeno	Radical fenildiazina, C ₆ H ₅ N=N•
Centrado en el oxígeno*	Inorgánico
	- Superóxido (O ₂ • ⁻)
	- Radical hidroxil (HO•)
	Orgánico
	- Radical alcoxil (LO•)
	- Radical peroxil (LO ₂ •)
Centrado en iones de metales en transición	Cu ⁺ / Cu ²⁺
	Fe ²⁺ / Fe ³⁺
	Ti (III) / Ti (IV)

* El O₂ es un radical por sí mismo; la molécula diatómica del oxígeno tiene dos electrones desapareados. De tal manera, que la reducción de un electrón de oxígeno produce O₂•⁻ (un electrón desapareado) y la reducción de dos electrones produce H₂O₂ (sin electrones desapareados). Aunque el H₂O₂ no se considera un radical, su capacidad de generar HO• lo convierte en un oxidante relevante.
 Adaptada de: Halliwell B. 1987.

Son numerosos las localizaciones celulares donde se pueden generar ERO, entre los que destacan el sistema de transporte de electrones mitocondrial, los peroxisomas, el sistema enzimático del citocromo P-450 o la enzima xantino-óxido-reductasa, así como las ERO que se producen por la actividad de las enzimas nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH)-oxidasa.

La mitocondria es una de las principales fuentes de generación de ERO (Dowling DK, *et al.* 2009). Del consumo total de O₂ del organismo, aproximadamente el 95% se destina a la producción de energía vía fosforilación oxidativa. Sin embargo, este proceso no es perfecto ya que entre el 1% y el 3% del O₂ se metaboliza vía la reducción univalente del O₂, lo que genera de manera inevitable, ERO (Halliwell B. 1997). Los peroxisomas son organelas celulares que participan en numerosas funciones metabólicas y que bajo condiciones fisiológicas son capaces

de producir H_2O_2 pero no $O_2^{\bullet-}$. En situación de estrés oxidativo, los peroxisomas liberan H_2O_2 al citosol contribuyendo a agravar el estado oxidativo del organismo (Valko M, *et al.* 2004). El sistema enzimático citocromo P-450 microsomal participa en la metabolización de componentes xenobióticos y de hormonas esteroideas, así como en la descomposición de prostaglandinas. Este sistema actúa activando el O_2 a especies electrofílicas de oxígeno (radicales libres o generadoras de radicales libres) (Goeptar AR, *et al.* 1995). La xantina-oxido-reductasa es una enzima que cataliza los últimos pasos del metabolismo de las purinas: la transformación de la hipoxantina hacia xantina y subsecuentemente de xantina hacia ácido úrico. Como consecuencia, se genera el anión $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 en forma de subproductos (Szasz T, *et al.* 2007). Finalmente, la familia de las enzimas NADPH es otra fuente importante de ERO. Así por ejemplo, la enzima NADPH-oxidasas mediante reacciones redox produce gran cantidad de ERO de manera deliberada en respuesta al ataque de organismos patógenos, lo que constituye un potente y rápido sistema de defensa (Szasz T, *et al.* 2007).

Existe una variedad de estímulos exógenos que también pueden causar la producción *in vivo* de ERO. Entre estos factores externos se incluyen diversos tipos de radiaciones como rayos ultravioleta, rayos X o rayos gamma. La presencia de patologías infecciosas, la exposición a xenobióticos, la contaminación por herbicidas o pesticidas, o la presencia de toxinas en el ambiente (Kregel KC, *et al.* 2007), son situaciones en las cuales se generan también de manera anómala una gran cantidad de radicales libres y sustancias oxígeno-reactivas. Sin embargo, una cierta producción de radicales libres a nivel celular es también necesario para el correcto desarrollo fisiológico del organismo. Así por ejemplo, el $NO^{\bullet-}$ interactúa como molécula de señalización biológica e interviene en numerosos procesos fisiológicos de neurotransmisión, de regulación de la función endotelial, la tensión arterial y la respuesta inmune, así como en mecanismos de defensa y de relajación muscular. El $NO^{\bullet-}$ se genera cuando determinadas enzimas oxido-sintetasas metabolizan la arginina a citrulina, provocando la formación de $NO^{\bullet-}$ vía la reacción oxidativa de cinco electrones (Valko M, *et al.* 2007).

1.2. Efectos del estrés oxidativo/nitrosativo

En condiciones fisiológicas, los organismos vivos mantienen un delicado balance entre la generación de radicales libres y la eliminación de éstos mediante sistemas antioxidantes altamente efectivos (Devasagayam TP, *et al.* 2004) (Figura 1.1.). Cuando el equilibrio entre la producción de especies reactivas y las defensas antioxidantes se pierde, se produce lo que llamamos estrés oxidativo/nitrosativo (Willcox JK, *et al.* 2004, Dalle-Donne I, *et al.* 2006).

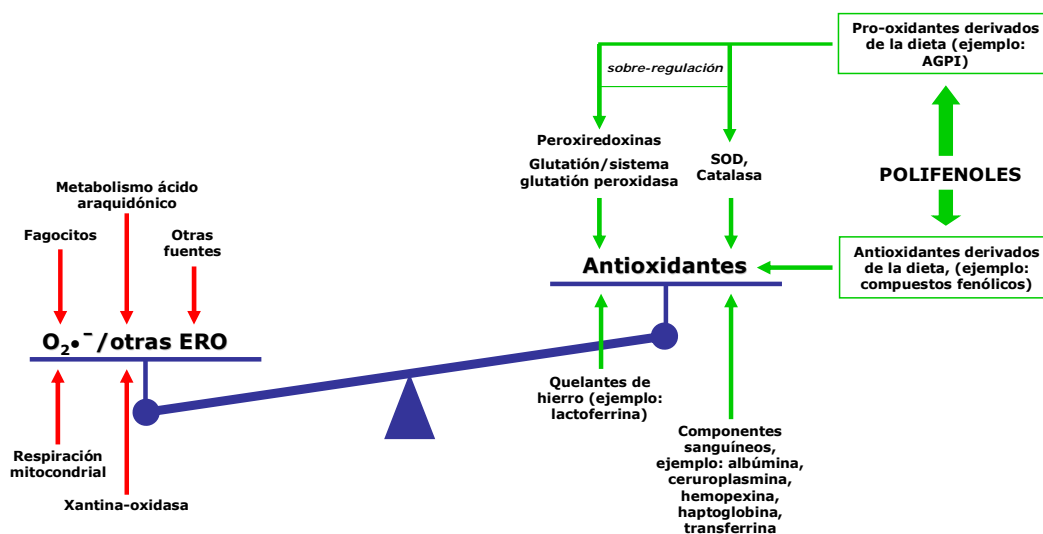


Figura 1.1. Balance de especies reactivas y antioxidantes *in vivo*.

Adaptada de: Halliwell B. 2009.

En los organismos vivos, la presencia de estrés oxidativo/nitrosativo provoca modificaciones a nivel celular en importantes biomoléculas como los lípidos, las proteínas, los hidratos de carbono o el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Willcox JK, *et al.* 2004, Dalle-Donne I, *et al.* 2006).

1.2.1. Daño oxidativo a lípidos

Las membranas lipídicas de las células presentan una elevada susceptibilidad a la oxidación. Cuando los lípidos reaccionan con las especies reactivas se produce una reacción en cadena conocida como peroxidación lipídica (Trachootham D, *et al.* 2008). Los procesos de peroxidación lipídica provocan una desestructuración física y funcional de la membrana celular, generando una mayor porosidad y permeabilidad celular e inactivando receptores de membrana. Además, durante la peroxidación lipídica se generan diversos metabolitos tóxicos,

principalmente aldehídos reactivos α , β -insaturados como el malondialdehído (MDA), el 4-hidroxi-2-nonenal, el 2-propenal (acroleína) y los isoprostanos (Dalle-Donne I, *et al.* 2006).

1.2.2. Daño oxidativo a proteínas

Las proteínas son también una diana importante de las ERO/ERN (Dalle-Donne I, *et al.* 2006). Además, la presencia de cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteica aumenta la susceptibilidad a la oxidación (Morrissey PA, *et al.* 1998). Esta mayor oxidación proteica genera productos reactivos, que a su vez pueden generar otras especies reactivas adicionales, convirtiéndose en una reacción en cadena. Las modificaciones ocurridas en la estructura de las proteínas originan alteraciones de múltiples funciones biológicas, como la actividad enzimática, la transmisión de señales y de regulación metabólica y genética (Dalle-Donne I, *et al.* 2006). Además, aunque la mayoría de las proteínas oxidadas y funcionalmente inactivas son catabolizadas por otras vías metabólicas, algunas de estas proteínas inactivas pueden acumularse en compartimentos intra o extra-celulares, lo que contribuye también al daño oxidativo. Estos efectos pueden ser perjudiciales, ya que han sido asociados con la aparición y desarrollo de diversas enfermedades degenerativas (Devasagayam TP, *et al.* 2004, Dalle-Donne I, *et al.* 2006).

1.2.3. Daño oxidativo al ADN

El daño oxidativo al ADN se produce por la interacción de éste con especies reactivas al oxígeno o con especies reactivas al nitrógeno. El $\text{HO}\cdot^-$ y el $\text{H}\cdot^-$ son los principales radicales libres que reaccionan con las bases nitrogenadas del ADN, ya que tienen la capacidad de oxidar tanto las bases púricas como las pirimidínicas y el azúcar desoxirribosa (Halliwell B, *et al.* 1999). De la misma manera, los radicales $\text{NO}\cdot^-$ y peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot^-$) también pueden reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN, provocando la ruptura y entrecruzamientos de las cadenas de nucleótidos (Trachootham D, *et al.* 2008).

En comparación con el ADN del núcleo, el ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo, no solamente por su cercanía al mayor sitio de generación de ERO (cadena transportadora de electrones), sino también por su menor capacidad de reparación contra el daño oxidativo (Inoue M, *et al.* 2003). Se ha estimado que de manera normal ocurren entre 10^4 a 10^5 alteraciones del ADN diariamente en las células de mamíferos (Fraga CG, *et al.*

1990). Entre los productos de oxidación del ADN que se han identificado, el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) es un metabolito relevante, ya que se utiliza para evaluar el grado de daño oxidativo al ADN. (Trachootham D, *et al.* 2008). Cuando el daño oxidativo es moderado, el ADN puede activar mecanismos de reparación que aseguren la integridad del mismo. Sin embargo, cuando el sistema de reparación del ADN falla o el daño oxidativo es excesivo, las modificaciones oxidativas ocasionarían cambios funcionales que podrían dar inicio a cambios permanentes del material genético, debido a las mutaciones y deleciones que se producen en el ADN nuclear o mitocondrial (Kregel KC, *et al.* 2007).

1.2.4. Daño oxidativo a hidratos de carbono

Los hidratos de carbono están sujetos al ataque de radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical $\text{HO}\cdot$ para producir sustancias reactivas (Sies H, *et al.* 1985). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose en unidades más sencillas. Los monosacáridos, una vez oxidados por los radicales libres, pueden formar moléculas capaces de reaccionar con el grupo amino de las proteínas vía su grupo carbonilo, lo que origina la acumulación de los llamados productos finales de glicación avanzada (AGE) (Thorpe SR, *et al.* 2003). Los AGE se han relacionado con las complicaciones asociadas a la diabetes tipo 2 (Peppia M, *et al.* 2009) y al aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares (McCance DR, *et al.* 1993). Aunque los procesos de glucosilación ocurren preferentemente entre los hidratos de carbono y las proteínas, también pueden producirse con otras biomoléculas con grupos funcionales capaces de reaccionar con el grupo aldehído de la glucosa, como los lípidos y los ácidos nucleicos (Bucala R, *et al.* 1993).

1.3. Mecanismos de defensa antioxidante

La exposición a distintos radicales libres ha permitido que los organismos vivos desarrollen diferentes mecanismos de defensa que limitan los efectos perjudiciales de las especies reactivas (Cadenas E. 1997). Los antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar a los radicales libres o reducir su actividad. Estas sustancias tienen la característica de reaccionar rápidamente con especies reactivas y generar nuevos radicales de reactividad reducida o nula, lo que evita la oxidación de moléculas vecinas (Thomas MJ. 2000). Por ello, es necesario

mantener un nivel de antioxidantes en las células, es decir un potencial antioxidante para la defensa del organismo. Este potencial o capacidad antioxidante se adquiere mediante el consumo de antioxidantes en la dieta y/o mediante la síntesis endógena de *novo* (Roberts CK, *et al.* 2009)

Los mecanismos de defensa antioxidante actúan en distintos niveles, de tal manera que previenen el daño oxidativo evitando la generación inicial de radicales libres, eliminando los radicales libres que se han producido o interrumpiendo la reacción en cadena de la oxidación y, reparando las membranas dañadas por los radicales libres (Yu BP. 1994, Halliwell B. 1996). Los antioxidantes se pueden clasificar en: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos, que incluyen al glutatión reducido (GSH), algunas vitaminas, los carotenos, los compuestos polifenólicos, el ácido úrico y otras sustancias.

1.3.1. Sistemas antioxidantes enzimáticos

La actividad antioxidante de las enzimas se regula de acuerdo a los requerimientos celulares, ya que su producción puede estar inducida o inhibida por efectores endógenos. La superóxido dismutasa (SOD) es una metalo-proteína con la función de catalizar el anión $O_2^{\cdot-}$ y convertirlo en H_2O_2 . Existen tres formas conocidas de esta enzima, la SOD-Cu y la SOD Zn localizadas en el citosol y la SOD/Mn que se encuentra en la matriz mitocondrial (Chaudiere J, *et al.* 1999). La catalasa (CAT) es una hemoproteína con cuatro grupos hemo que detoxifica al H_2O_2 en agua y oxígeno, que se concentra principalmente en los peroxisomas y la mitocondria (Powers SK, *et al.* 1999). La glutatión peroxidasa (GPx) es una selenoproteína que se encuentra en la matriz mitocondrial y en el citosol. Esta molécula antioxidante cataliza la reducción de H_2O_2 y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente. Para llevar a cabo su actividad antioxidante la GPx requiere de GSH, produciendo glutatión oxidado (GSSG), que vía la glutatión reductasa pasa nuevamente a su forma reducida (Powers SK, *et al.* 1999).

1.3.2. Sistemas antioxidantes no enzimáticos

El GSH es el mayor antioxidante soluble del citosol, núcleo y mitocondria. La forma oxidada del GSH es el disulfuro de glutatión-GSSG. El GSH del núcleo mantiene el estado redox de grupos sulfidrilos de proteínas, necesarias para la reparación y la expresión del ADN. El GSSG se acumula dentro de las células, por lo que concentraciones altas resultan perjudiciales. El GSH

realiza funciones de detoxificación enzimática, participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática, es un inhibidor de los radicales $\text{HO}\cdot^-$ y $\text{O}_2\cdot^-$ y tiene la capacidad de regenerar a las vitaminas E y C, reconvirtiéndolas a su forma activa. La vitamina C (ácido ascórbico) es una sustancia hidrofílica, distribuida intra y extracelularmente, que neutraliza los radicales $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{HO}\cdot^-$ y varios hidroperóxidos lipídicos, siendo regeneradora de la vitamina E. Sin embargo, en concentraciones elevadas y en presencia de metales de transición como el Fe_3^+ y Cu_2^+ , la vitamina C se convierte en un potente prooxidante. La vitamina E o tocoferol es una sustancia lipofílica representada al menos por 8 isómeros de tocoferoles, de los cuales el α -tocoferol es cuantitativamente el antioxidante más importante del plasma y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Burton GW, *et al.* 1983). Es eficaz en la defensa y mantenimiento de los fosfolípidos de la bicapa lipídica de la membrana celular, ya que neutraliza los radicales $\text{O}_2\cdot^-$, $\text{HO}\cdot^-$ y varios hidroperóxidos lipídicos hacia formas menos reactivas, e interrumpe la reacción en cadena de la peroxidación lipídica (Burton GW, *et al.* 1984). Los carotenoides poseen propiedades antioxidantes por su extensa cadena de dobles enlaces conjugados (Sies H, *et al.* 1995). Estas sustancias neutralizan radicales $\text{O}_2\cdot^-$ y peroxilo ($\text{ROO}\cdot^-$) y reducen el daño provocado por la peroxidación lipídica (Krinsky NI. 1989). Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y realizan sus funciones antioxidantes mediante la actividad de agentes reductores, donando moléculas de hidrógeno o neutralizando al radical $\text{O}_2\cdot^-$. Finalmente, existen también otras sustancias como el ácido úrico, el ácido lipoico y la melatonina, a las que se atribuyen también ciertas capacidades antioxidantes (Sies H, *et al.* 1995).

2. Estrés oxidativo y patologías asociadas

2.1. Diabetes mellitus tipo 2

De acuerdo con las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la actualidad alrededor de 220 millones de personas en el mundo padecen diabetes mellitus tipo 2, cifra que desafortunadamente podría duplicarse en el año 2030 (OMS, 2009). La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia debida a alteraciones en la secreción de la insulina y/o en la acción de la insulina (ADA, 2010). Los factores de riesgo más relevantes asociados a esta enfermedad incluyen: historia familiar de

DM2, la edad, la obesidad o sobrepeso, la dislipemia y/o el sedentarismo, cuya presencia favorecen la aparición y evolución de la DM2.

2.1.1. Estudios epidemiológicos que muestran la relación entre diabetes mellitus tipo 2 y estrés oxidativo

Diferentes estudios observacionales han demostrado de manera consistente una asociación entre la presencia de DM2 y el daño oxidativo sobre los hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Nourooz-Zadeh J, *et al.* 1995, Akkus I, *et al.* 1996, Skrha J, *et al.* 1996, Davi G, *et al.* 1999, Odetti P, *et al.* 1999, Telci A, *et al.* 2000, Ceriello A, *et al.* 2002). Otros estudios han analizado también la relación entre la presencia o no de DM2 y los distintos mecanismos de defensa antioxidante (Ceriello A, *et al.* 2001b, Nourooz-Zadeh J, *et al.* 1999).

Entre los estudios observacionales que analizan la asociación entre DM2 y la peroxidación de los lípidos está el realizado por Akkus y colaboradores (1996). Estos autores determinaron en leucocitos de pacientes diabéticos y controles sanos la concentración de MDA considerado como un marcador de oxidación lipídica. El grupo de sujetos con DM2 presentaron unos niveles significativamente superiores de MDA en comparación al grupo control (Akkus I, *et al.* 1996). Resultados similares se observaron en otro estudio de casos con pacientes diabéticos y controles sanos (Skrha J, *et al.* 1996). Ambos resultados sugieren la existencia de una asociación positiva entre el estrés oxidativo y la presencia de DM2.

Otro marcador de oxidación lipídica que se ha determinado en presencia de DM2 es la producción de isoprostanos, productos resultantes de la oxidación del ácido araquidónico. Gopaul y colaboradores (1995) compararon las concentraciones plasmáticas de isoprostanos entre 39 individuos con DM2 y 15 individuos sanos. Estos autores observaron que los pacientes con DM2 presentaban concentraciones significativamente mayores de isoprostanos en comparación con los individuos sanos (Gopaul NK, *et al.* 1995). Resultados similares fueron reportados por Davi y colaboradores (1999) que observaron un aumento de la excreción de isoprostanos en orina en aquellos pacientes diabéticos (n=85) en comparación a individuos sanos (n=85) (Davi G, *et al.* 1999).

Algunos investigadores han determinado la presencia de 8-OHdG en sangre, un marcador del daño oxidativo sobre el ADN que se produce tras el ataque del radical hidroxilo sobre el ADN,

en individuos con DM2 en comparación con pacientes sanos. Mediante cromatografía de gases y espectrofotometría de masas, Rehman y colaboradores (1999) observaron una mayor concentración de 8-OHdG en aquéllos sujetos que presentaban DM2 en comparación al grupo control (Rehman A, *et al.* 1999).

Así mismo se han realizado estudios con el fin de observar si existe una asociación entre DM2 y la presencia de daño oxidativo sobre moléculas proteicas. Tal es el caso del estudio observacional realizado sobre 43 pacientes adultos con DM2 y 20 individuos sanos, a quienes se les determinó la fracción proteica carbonilo plasmática, un marcador de la oxidación proteica, así como la glucemia en ayunas y los niveles de hemoglobina glucosilada en plasma entre otros parámetros bioquímicos (Odetti P, *et al.* 1999). En los pacientes diabéticos de este estudio se observó una relación positiva entre los niveles de hemoglobina glucosilada y las concentraciones de la fracción carbonilo del plasma, sugiriendo que aquellos sujetos con DM2 con deficiente control glucémico presentan un mayor estrés oxidativo en comparación con los sujetos sanos.

Diferentes estudios también han demostrado que en DM2 existe una alteración de los mecanismos endógenos de defensa antioxidantes. Por ejemplo, Ceriello y colaboradores (2001), mediante un estudio de casos y controles evaluaron el potencial antioxidante total del plasma mediante el método TRAP (*Total Radical Trapping Power*) en 40 pacientes diabéticos y 35 controles sanos. Los pacientes diabéticos presentaron una menor capacidad de defensa antioxidante en comparación a los controles sanos (Ceriello A, *et al.* 2001b).

Por otro lado, se ha observado que el estrés oxidativo y las concentraciones de enzimas y vitaminas con capacidad antioxidante, podrían diferir entre los sujetos que padecen o no DM2. Así por ejemplo, Akkus y colaboradores (1996) compararon las concentraciones de vitamina C y de enzimas SOD y la GPx en leucocitos entre pacientes diabéticos y de individuos sanos. Los autores reportaron concentraciones significativamente menores de vitamina C en los pacientes con DM2 en comparación con individuos sanos, mientras que las concentraciones de SOD y la GPx no fueron significativamente diferentes entre ambos grupos de pacientes (Akkus I, *et al.* 1996).

Los resultados de este y otros estudios sugieren que los pacientes diabéticos necesitan de un mayor aporte de sustancias exógenas antioxidantes para compensar el desgaste oxidativo que presentan.

2.1.2. Mecanismos que explican la relación entre diabetes mellitus tipo 2 y estrés oxidativo

Los resultados obtenidos en estudios epidemiológicos sugieren que el estrés oxidativo podría desempeñar un papel relevante en el desarrollo y/o progresión de la DM2. Es posible que la deficiencia en antioxidantes exógenos y una baja capacidad defensiva endógena condicionada genéticamente juegue un papel fundamental a la hora de explicar porqué algunos individuos desarrollan más rápidamente que otros una resistencia a la insulina, una diabetes o bien complicaciones derivadas de ella. Por otro lado, diversos mecanismos moleculares y bioquímicos han sido propuestos para explicar el origen de los radicales libres que se generan en respuesta al constante estado de hiperglucemia en que transcurre esta enfermedad. Aunque falta por dilucidar con claridad el origen del estrés oxidativo, diversos estudios han identificado fuentes de generación de radicales libres inducidas por concentraciones elevadas de glucosa. Esta generación de radicales libres participa sin lugar a dudas en la progresión de la enfermedad y posiblemente en la aparición de las complicaciones de la diabetes (Johansen JS, *et al.* 2005).

2.1.3. Fuentes de radicales libres inducidos por hiperglucemia

2.1.3.1. Productos finales de glicación avanzada. Los niveles crónicamente elevados de glucosa pueden contribuir al desarrollo de complicaciones microvasculares de la diabetes a través de la formación acelerada de AGE (Marks JB, *et al.* 2000). Este mecanismo propone que la glicación o glucosilación no enzimática de grupos amino de las proteínas en el tejido vascular y suero, altera la estructura y la función de proteínas, un proceso lento asociado al desarrollo de la enfermedad crónica (Miyata T, *et al.* 1999). Estudios *in vivo* han demostrado una formación excesiva de AGE en distintas células en presencia de elevadas concentraciones de glucosa, como el realizado por Ling y colaboradores (2001). Estos autores identificaron en distintas células de modelos de ratas con diferentes edades y diabetes inducida, una excesiva acumulación de anticuerpos monoclonales para determinadas moléculas de AGE. Los

anticuerpos identificados en células hepáticas, macrófagos del bazo, células endoteliales, glomerulares, células de Leydig y eritrocitos de las ratas, sugieren que la presencia de AGE en varios órganos y tejidos, podrían estar implicados en las distintas complicaciones de la DM2 (Ling X, *et al.* 2001). En otro estudio, en que se utilizaron también técnicas inmunohistoquímicas se analizó el tejido muscular cardíaco y arterial obtenido de la autopsia de individuos diabéticos y no diabéticos. Los resultados mostraron un mayor nivel de reactividad de los AGE dentro de la placa aterosclerótica en los vasos sanguíneos de los diabéticos en comparación con los no diabéticos (Nakamura Y, *et al.* 1993), lo que sugiere la importancia que tienen los AGE en la progresión acelerada de la aterosclerosis en pacientes diabéticos.

2.1.3.2. Auto-oxidación de la glucosa. La hiperglucemia puede inducir de manera directa la formación de radicales libres. La glucosa *per se* puede autooxidarse y formar el radical enediol, una especie altamente reactiva que puede generar radicales HO[•] (Turko IV, *et al.* 2001). El radical enediol contribuye al estrés oxidativo por su capacidad de generar AGE de manera directa, y de catalizar la conversión de O₂ en radical O₂^{•-}, lo que incrementa la producción de radicales libres (Stephens JW, *et al.* 2009). En un ensayo *in vitro* de glicación de proteínas, Jiang y colaboradores (1990) detectaron la formación de H₂O₂ en distintas concentraciones de una solución de glucosa mezclada o no con proteína (albúmina sérica bovina), ya que previamente se había propuesto que el H₂O₂ podría ser un precursor de la autooxidación de la glucosa. Tras el período de incubación los autores observaron una menor acumulación de H₂O₂ en la glucosa mezclada con proteína, en comparación con la incubación de glucosa sin proteína. A pesar de la menor formación de H₂O₂ en presencia de proteína, la acumulación de H₂O₂ detectada es suficiente para dañar las moléculas proteicas. Por ello, los autores sugirieron que la autooxidación de la glucosa podría favorecer la alteración de las proteínas (Jiang ZY, *et al.* 1990).

2.1.3.3. Vía del poliol (sorbitol). En condiciones normales, la actividad de esta vía metabólica es reducida, sin embargo, en situación de hiperglucemia puede incrementarse hasta un 30% a 35%. Esta vía metabólica que reduce la glucosa a sorbitol mediante la enzima aldosa-reductasa, utiliza la NADPH como sustrato (Ramana KV, *et al.* 2003). Una situación de hiperglucemia conduce a la disminución de las concentraciones de NADPH y de GSH (Brownlee

M. 2001) y contribuye con ello a la reducción de la capacidad antioxidante endógena, lo que aumenta la sensibilidad al estrés oxidativo en el organismo (Rolo AP, *et al.* 2006). Esta vía ha sido implicada también en la patogénesis de las complicaciones de DM2, como por ejemplo, la formación de cataratas, ya que el tipo de alcoholes derivados y la enzima aldosa-reductasa tienen la capacidad de acumularse en el tejido del cristalino (Fukushi S, *et al.* 1980, Obrosova I, *et al.* 1997). Esto ha quedado demostrado en un estudio realizado sobre ratas diabéticas con cataratas inducidas experimentalmente. En este estudio se observó que éstas ratas presentaban una acumulación de sorbitol y galactilol (polialcohol derivado de la galactosa) en las células del cristalino en comparación a otro grupo similar de ratas, a las que además se les había administrado un inhibidor de la enzima aldosa-reductasa (Fukushi S, *et al.* 1980).

2.1.3.4. Otros mecanismos. Algunos autores han propuesto otros mecanismos implicados en la aparición de complicaciones en presencia de DM2 asociados al estrés oxidativo inducido por hiperglucemia. En relación al desarrollo de enfermedades vasculares, Hori y colaboradores (1996) sugieren tras la realización de diversos ensayos experimentales *in vitro*, que el aumento en la expresión de moléculas de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y del estrés oxidativo, así como de la quimiotaxis de los monocitos observado en pacientes diabéticos podría deberse en parte, a la interacción entre los AGE y sus receptores celulares (RAGE) que se localizan en la superficie de células endoteliales, de músculo liso o de fagocitos mononucleares (Hori O, *et al.* 1996).

Entre otros mecanismos que podrían explicar las complicaciones en diabéticos, se encuentra la mayor adhesividad que los eritrocitos exhiben hacia las células endoteliales debido a la presencia de AGE en su superficie (Zoukourian C, *et al.* 1996). Además, los eritrocitos podrían exacerbar el estrés oxidativo por el aumento de su capacidad para producir peróxidos lipídicos en los sitios de adhesión al endotelio vascular, lo que incrementaría el deterioro vascular (Rattan V, *et al.* 1997).

2.1.4. Estudios de intervención con antioxidantes para el tratamiento y prevención de la diabetes mellitus tipo 2 y sus complicaciones

Existe diversos estudios realizados en modelos animales con diabetes inducida experimentalmente analizando el efecto de distintos compuestos exógenos con potencial efecto

antioxidante sobre el estatus oxidativo que se encuentra comúnmente alterado en presencia de diabetes (Maritim AC, *et al.* 2003, Scott JA, *et al.* 2004). Los resultados obtenidos sugieren una asociación entre la administración de antioxidantes endógenos y la reducción de complicaciones diabéticas. Sin embargo, los estudios clínicos de intervención realizados en pacientes con diabetes mellitus muestran resultados contradictorios tras la suplementación terapéutica con antioxidantes (Johansen JS, *et al.* 2005).

2.1.4.1. Estudios de intervención con suplementos de vitamina E y C combinados. Los estudios clínicos de intervención muestran resultados contradictorios respecto al beneficio de la suplementación combinada de vitaminas E y C. Por ejemplo, en un estudio en que se comparó el efecto de la suplementación durante 6 meses con 800 UI/d de vitamina E y 100 mg/d de vitamina C sobre la vaso-relajación dependiente del endotelio, en pacientes con DM1 y DM2 en comparación a placebo, sólo se observaron efectos positivos en los diabéticos tipo 1. (Beckman JA, *et al.* 2001). En cambio, al evaluar la función renal de 30 pacientes diabéticos, Gaede y colaboradores (2001) mediante un estudio cruzado y aleatorizado, observaron que tras la suplementación durante 4 semanas con 680 UI/d y 1250 mg/d de vitaminas E y C respectivamente, se producía una disminución del 10% en los niveles de albuminuria respecto al inicio del estudio (Gaede P, *et al.* 2001).

2.1.4.2. Estudios de intervención con suplementos de vitamina E. En relación al efecto de la suplementación de vitamina E en pacientes diabéticos con alto riesgo cardiovascular, los estudios clínicos de intervención realizados muestran también resultados altamente contradictorios. Tal es el caso del estudio de intervención "Heart Outcomes Prevention Study" (HOPE) con un diseño factorial de 2 x 2 que evaluó el efecto de la suplementación con vitamina E (400 IU/dL) en 3657 pacientes diabéticos sobre la presencia de eventos cardiovasculares fatales (accidente cerebro-vascular, infarto de miocardio y muerte por causas cardiovasculares). Al comparar los resultados con el grupo control que recibió un placebo, y después de 4,5 años de tomar diariamente la dosis recomendada de vitamina E, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, por lo que este tipo de pacientes no se beneficiaron de la suplementación con vitamina E (Lonn E, *et al.* 2002). Contrariamente a estos resultados, dos estudios de intervención que evaluaron el efecto de la suplementación con 600 o 800 UI/d de vitamina E sobre la prevención de complicaciones cardiovasculares, el

"*Cambridge Heart Antioxidant Study*" (CHAOS) con 2002 pacientes que padecían enfermedad isquémica cardíaca (Stephens NG, *et al.* 1996) y el "*Secondary Prevention with Antioxidants of Cardiovascular Disease in End-Stage Renal Disease*" (SPACE) en 196 pacientes (43% con DM2) (Boaz M, *et al.* 2000), mostraron una disminución significativa del riesgo de infarto de miocardio.

2.1.4.3. Estudios de intervención con ácido lipoico. También los efectos tras la administración de ácido lipoico han sido estudiados en pacientes diabéticos con polineuropatía diabética. El estudio de intervención, controlado y multicéntrico "*Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy*" (ALADIN) mostró que los pacientes diabéticos mejoraban significativamente los síntomas de polineuropatía tras recibir una infusión intravenosa de 600 mg de ácido lipoico durante 3 semanas, beneficio que además fue mantenido durante algunos meses tras el suministro oral de ácido lipoico (Ziegler D, *et al.* 1995). Posteriormente, el mismo grupo de investigadores realizó un estudio prospectivo en paralelo, el ALADIN II, en que aleatorizaron 65 pacientes diabéticos con síntomas de polineuropatía a recibir durante 24 meses tres tratamientos, un grupo con 600 mg de ácido lipóico, otro grupo con 1200 mg de ácido lipoico, y el grupo control que recibió placebo. Los grupos que recibieron ambas dosis de ácido lipoico mejoraron significativamente la conducción nerviosa en estos pacientes en comparación al grupo que recibió placebo (Reljanovic M, *et al.* 1999). En un tercer estudio (ALADIN III) de características similares al anterior, pero realizado sobre una cohorte de 509 pacientes seguidos durante 6 meses, se evaluó el efecto de la intervención sobre la severidad y la frecuencia de los síntomas de polineuropatía determinados mediante cuestionario. Los resultados no pudieron demostrar ningún efecto de la administración de ácido lipoico sobre los síntomas de polineuropatía (Ziegler D, *et al.* 1999). Sin embargo, en un meta-análisis que analizó los resultados de diversos estudios de intervención con este ácido se concluye que el tratamiento con 600 mg de ácido lipoico administrado en forma intravenosa durante un período de 3 semanas, es seguro y efectivo para mejorar los síntomas de polineuropatía diabética y los déficit neuropáticos (Ziegler D, *et al.* 2004).

De todos modos, tras analizar el posible efecto beneficioso de la toma de suplementos antioxidantes sobre el control de la diabetes y la prevención de sus complicaciones, la *American Diabetes Association* (ADA) concluyó recientemente que la toma sistemática de antioxidantes no queda justificada (ADA, 2010).

2.2. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad de las sociedades industrializadas y los países en vías de desarrollo. Según estimaciones de la OMS, en el año 2005 fallecieron 17,5 millones de personas por ECV, el 30% de todas las defunciones registradas en el mundo. El primer lugar de estas muertes lo ocupó la cardiopatía coronaria (7,6 millones de defunciones) seguida por los accidentes cerebrovasculares (5,7 millones). Desafortunadamente, este mismo organismo prevé que para 2030 las ECV mantendrán el primer lugar de mortalidad en todo el mundo (OMS, 2009).

Las ECV de origen arteriosclerótico relacionadas con el estrés oxidativo más frecuentes son: a) la enfermedad isquémica cardíaca, b) la enfermedad cerebrovascular y c) la enfermedad vascular periférica.

La aterosclerosis es el proceso fisiopatológico que comúnmente subyace a estas ECV (Seifried HE, *et al.* 2007). La enfermedad aterosclerótica es una patología progresiva, inflamatoria y degenerativa, de origen multifactorial caracterizada por la acumulación de lípidos, células inflamatorias y productos de desecho, que forma una cápsula de tejido fibroso y de células musculares sobre la pared de las arterias (Cherubini A, *et al.* 2005). Los principales factores de riesgo de las ECV incluyen la hipertensión arterial, la diabetes y la hipercolesterolemia, así como los antecedentes familiares de enfermedad arteriosclerótica, el hábito tabáquico, el sedentarismo o la edad avanzada (Grundy SM. 2005). La presencia de uno o mas factores de riesgo cardiovascular favorecen la ocurrencia de una lesión o disfunción endotelial, lo que permite el establecimiento o progreso de la placa aterosclerótica (Badimon L, *et al.* 1992).

Tal y como veremos posteriormente, diversos estudios atribuyen a los radicales libres y especialmente, a la peroxidación lipídica un papel preponderante en la patogénesis de la aterosclerosis (Figura 1.2.). De hecho, la hipótesis oxidativa de la aterogénesis sugiere que la modificación oxidativa de las lipoproteínas, en particular de las lipoproteínas de baja densidad es un factor determinante de la aterosclerosis (Steinberg D, *et al.* 1990).

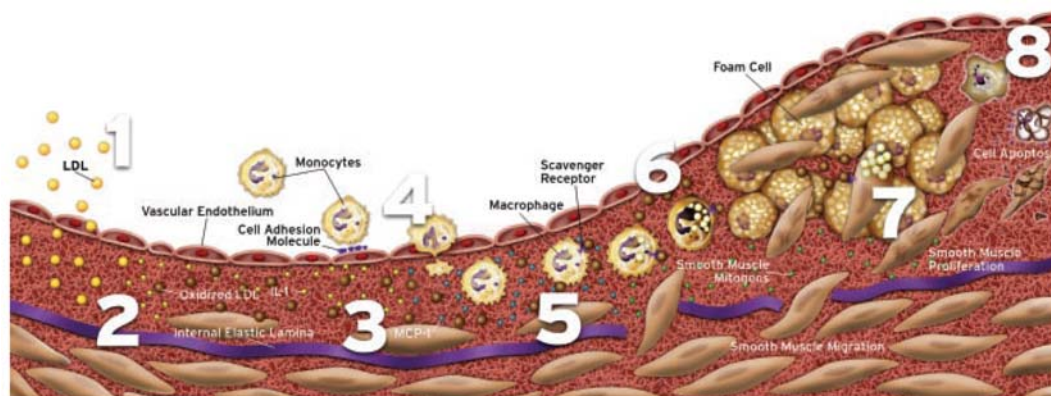


Figura 1.2. Desarrollo y establecimiento de la placa aterosclerótica.

Fuente: Faxon DP, et al. 2004

2.2.1. Estudios que muestran la relación entre las enfermedades cardiovasculares y el estrés oxidativo

2.2.1.1. Estudios epidemiológicos. Existe múltiples evidencias científicas que demuestran que diversos marcadores oxidativos se encuentran alterados en pacientes que presentan aterosclerosis (Harrison D, *et al.* 2003), patología que subyace a la mayoría de las ECV (Szasz T, *et al.* 2007, Kukreja RC, *et al.* 1992).

En un estudio caso-control realizado por Zhang y colaboradores en 2001, se sugiere que el estrés oxidativo sería un factor activador del proceso aterosclerótico. En este estudio se observaron mayores concentraciones de la enzima prooxidante mieloperoxidasa en sangre y en leucocitos en los pacientes con enfermedad coronaria, en comparación con sujetos control sanos (Zhang R, *et al.* 2001). De igual modo, en el análisis transversal de 761 sujetos diabéticos de ambos sexos que padecían o no alguna enfermedad coronaria, se observó que aquellos hombres con una menor capacidad antioxidante del plasma ($p=0,04$) y un cociente LDL-oxidadas:colesterol-LDL (LDL-ox:c-LDL) más elevado ($p=0,003$) presentaban una mayor prevalencia de enfermedad coronaria (Stephens JW, *et al.* 2006). Resultados similares fueron obtenidos en un estudio prospectivo realizado sobre una submuestra de 310 individuos sanos de la cohorte del estudio "Second Northwick Park Heart Study" (NPHSII) seguida en promedio 10,2 años. Durante este periodo se observó que los 99 individuos que desarrollaron algún evento cardiovascular presentaban una menor capacidad antioxidante plasmática al inicio del

estudio, en comparación a los 211 sujetos que no tuvieron ningún evento cardiovascular ($p=0,04$). Además, el riesgo de padecer enfermedad coronaria fue 1,3 veces mayor en los individuos con menor capacidad antioxidante ($OR=1,30$; 95% IC, 1,02-1,64; $p=0,04$), asociación que se mantuvo después de ajustar estadísticamente por diferentes factores clásicos de riesgo cardiovascular (Stephens JW, *et al.* 2006). Por último, en un meta-análisis reciente que incluyó 42 estudios observacionales caso-control y 3 estudios prospectivos, se demostró una asociación inversa entre los niveles circulantes de enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px y la CAT) y la presencia de ECV (Flores-Mateo G, *et al.* 2009). Esta serie de resultados sugieren que el estrés oxidativo es un factor independiente para la presencia y el desarrollo de ECV.

Además, existen estudios que demuestran una asociación entre el estrés oxidativo y la presencia de factores de riesgo para ECV, entre ellos la hipertensión arterial, la hiperlipidemia, el hábito tabáquico, la presencia de diabetes u obesidad o la predisposición genética (Halliwell B, *et al.* 1999, Harrison D, *et al.* 2003, Chisolm GM, *et al.* 2000, Cai H, *et al.* 2000). Al determinar la producción de isoprostanos excretados en orina en una cohorte de 2828 pacientes del estudio "Framingham Heart Study", Keaney y colaboradores (2003) observaron una asociación positiva entre la excreción de isoprostanos y el índice de masa corporal (IMC), la prevalencia de DM2 y el hábito tabáquico (Keaney JF, Jr, *et al.* 2003). En otro estudio en que se compararon las concentraciones séricas de las LDL-ox de 111 hombres hipertensos y 75 normotensos, se demostró que los individuos hipertensos presentaban una mayor concentración de LDL-ox en comparación con los individuos normotensos (Frostegard J, *et al.* 2003).

2.2.1.2. Estudios experimentales. El uso de técnicas cromatográficas o espectrofotométricas ha permitido la identificación de subproductos de peroxidación lipídica en lesiones ateroscleróticas humanas. Ya en el año 1997, Pratico y colaboradores identificaron dos tipos de isómeros de isoprostanos, en muestras de pacientes que fueron sometidos a una endoarterectomía carotídea (Pratico D, *et al.* 1997). Con el mismo tipo de pacientes, Chisolm y colaboradores en 1994 también identificaron un derivado de la oxidación del colesterol, el oxiesterol ($7\alpha\text{-OOH}\cdot^-$) en lesiones ateroscleróticas humanas (Chisolm GM, *et al.* 1994).

Diversos ensayos *in vitro* también han evaluado la asociación entre la enfermedad cardiovascular y el estrés oxidativo. Al analizar el efecto de las LDL-ox en un cultivo de células humanas del músculo liso de arteria coronaria, Bachem y colaboradores (1999) observaron un efecto dosis-dependiente de la concentración de LDL-ox sobre la síntesis de colágeno y fibronectina en este tipo de células. Es decir, cuando las células del músculo liso se cultivaron en niveles reducidos de LDL-ox se produjo una mayor síntesis de colágeno y fibronectina, lo que contribuye a la progresión de la placa ateromatosa. Por otra parte, cuando estas células se cultivaron e incubaron con niveles elevados de LDL-ox, se provocó apoptosis celular, incrementando la vulnerabilidad de la placa de ateroma (Bachem MG, *et al.* 1999). Estos resultados sugieren que ambos efectos deletéreos de las LDL-ox contribuyen al elevado potencial aterogénico característico de estas lipoproteínas modificadas.

2.2.2. Estudios que muestran la relación entre las enfermedades cardiovasculares y el consumo de antioxidantes

Se ha propuesto que la suplementación con antioxidantes como el ácido ascórbico, el α -tocoferol o el β -caroteno, entre otros, podrían neutralizar el efecto de los radicales libres y así evitar los efectos perjudiciales que produce el estrés oxidativo (Blomhoff R. 2005). Diversos tipos de estudios experimentales a nivel celular y con modelos animales *in vivo* han demostrado la capacidad que las sustancias antioxidantes tienen de inhibir el estrés oxidativo (Bruckdorfer KR. 2008, Siekmeier R, *et al.* 2007), disminuyendo así el riesgo de padecer ECV. Existe evidencia epidemiológica y de estudios de intervención que ha mostrado efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular por el consumo de suplementos antioxidantes. Sin embargo, algunos de los resultados obtenidos han sido contradictorios, lo que no sustenta plenamente esta hipótesis antioxidante probablemente por la inconsistencia de los beneficios mostrados por el consumo de suplementos antioxidantes (Mullan A, *et al.* 2009).

2.2.2.1. Estudios epidemiológicos. Después de 8 años de seguimiento de una cohorte de 87245 mujeres del estudio "Nurses'Health Study" se observó que el consumo de suplementos antioxidantes con altas dosis de vitamina E se asociaba significativamente al menor riesgo de padecer enfermedad coronaria, mientras que la suplementación de β -caroteno y vitamina C no hubieran producido efectos significativos en las mujeres que los consumieron (Stampfer MJ, *et al.* 1993). Resultados similares fueron obtenidos por Rimm y colaboradores (1993), quienes

tras evaluar la ingesta de α -tocoferol, ácido ascórbico y β -caroteno en forma de suplementos dietéticos de 39910 hombres del estudio "*Health Professional's Follow-Up Study*" durante 4 años, observaron una asociación inversa entre la ingesta de suplementos de vitamina E y el riesgo de enfermedad coronaria (Rimm EB, *et al.* 1993). En otro estudio similar, después de analizar el consumo alimentario de 5133 individuos del "*Finland Social Insurance Study*" seguidos durante 14 años, Knekt y colaboradores (1994) observaron que la ingesta dietética en particular de vitamina E, se asociaba significativamente al menor riesgo de mortalidad coronaria en toda la población evaluada, ya que el consumo dietético de vitamina C y β -caroteno no mostraron la misma relación (Knekt P, *et al.* 1994). Por otro lado, resultados contradictorios fueron obtenidos por Klipstein-Grobuch y colaboradores (2001) tras el análisis transversal de 4367 adultos holandeses del estudio prospectivo "*Rotterdam Study*". Los autores mostraron que el consumo dietético de vitamina C en las mujeres se asociaba negativamente a la reducción del riesgo de ECV; mientras que los hombres se relacionaron con la reducción de ECV tras el consumo de vitamina E (Klipstein-Grobuch K, *et al.* 2001).

2.2.2.2. Estudios de intervención. En contraste a los resultados de la mayoría de los estudios observacionales, los estudios de intervención con dietas o suplementos antioxidantes no han demostrado claramente un efecto protector sobre las ECV (Mullan A, *et al.* 2009, Steinhubl SR. 2008). Resultado de un meta-análisis que incluyó 7 ensayos clínicos aleatorizados y controlados realizados en pacientes con riesgo cardiovascular, no se observaron diferencias en la disminución del riesgo de ECV ($p=0,86$) o accidente cerebrovascular ($p=0,31$) entre los individuos suplementados con vitamina E y los que recibieron el placebo. En relación a la mortalidad por todas las causas, los autores tampoco encontraron diferencias entre grupos (OR, 1,02; 95% CI: 0,98-1,06; $p=0,42$) (Vivekananthan DP, *et al.* 2003). Resultados similares se obtuvieron en otro meta-análisis que incluyó 7 estudios aleatorizados y controlados que usaban técnicas de imagen para evaluar el efecto de la suplementación de antioxidantes sobre la placa de aterosclerosis. En este caso, no se observaron evidencias de un efecto protector por el consumo de suplementos de vitaminas y minerales antioxidantes o de vitaminas del grupo B sobre la progresión de la lesión aterosclerótica (Bleys J, *et al.* 2006).

Otro aspecto relevante de la suplementación con antioxidantes son los posibles efectos adversos que pudieran producir. Para evaluar el efecto de los suplementos antioxidantes sobre

la mortalidad por todas las causas a nivel de prevención primaria o secundaria, Bjelakovic y colaboradores (2008) realizaron un meta-análisis Cochrane de 67 estudios de intervención controlados y aleatorizados que incluyó 232550 participantes. Los resultados obtenidos mostraron que la suplementación a dosis medicamentosas con vitamina A, β -caroteno o vitamina E comporta un aumento de la mortalidad total en individuos sanos o en pacientes con distintas enfermedades. En este mismo meta-análisis, de forma contraria a las otras vitaminas antioxidantes analizadas, el consumo de vitamina C no se asoció significativamente a un mayor riesgo de mortalidad. Los autores concluyeron que no existe suficiente evidencia científica que apoye el uso de suplementos antioxidantes en la prevención primaria o secundaria de las ECV (Bjelakovic G, *et al.* 2008). Es posible que la ingesta de pequeñas cantidades de antioxidantes de diferente origen a través de la alimentación protejan de la arteriosclerosis y de la mortalidad por ECV, tal y como puede observarse en los estudios epidemiológicos. Sin embargo, dosis medicamentosas de antioxidantes aislados podría producir incluso, efectos adversos a través de empeorar el balance antioxidante o bien por otros mecanismos.

2.2.3. Mecanismos que explican la relación entre las enfermedades cardiovasculares y el estrés oxidativo

Entre los diversos mecanismos que podrían explicar la progresión de las enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas derivada del estrés oxidativo, se encuentra la oxidación de las partículas LDL, el deterioro de la función endotelial, la alteración de las vías de señalización que inducen la expresión de factores de transcripción y citoquinas proinflamatorias, la proliferación de células del músculo liso del endotelio, así como la expresión de genes proaterogénicos (Vogiatzi G, *et al.* 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo provoca la peroxidación de lípidos, principalmente del exceso de c-LDL circulante y con ello se producen LDL-ox. Estas lipoproteínas modificadas pueden aumentar su toxicidad al exhibir una mayor capacidad quimiotáctica que facilita una rápida adherencia y migración de monocitos y linfocitos al espacio sub-endotelial (Diaz MN, *et al.* 1997). Como se observa en la figura 1.3., la alteración de la captación de las LDL-ox acelera el proceso de formación de células espumosas y con ello la formación de la placa ateromatosa (Goldstein JL, *et al.* 2009, Kovanen PT. 1993).

Estudios realizados sobre cultivos de células endoteliales han demostrado los efectos citotóxicos de las LDL-ox y su posible relación con el proceso aterosclerótico. Ejemplo de ello, el ensayo realizado por Therond y colaboradores (2000) en que después de la incubación de células endoteliales humanas en diferentes concentraciones de LDL-ox se identificaron distintos productos de oxidación y una disminución de la concentración del antioxidante endógeno GSH. Los autores explicaron que el decremento del GSH había sido independiente de la concentración de LDL-ox en que fueron cultivadas las células endoteliales. Por ello, sugirieron que mecanismos adicionales o sinérgicos a la depleción del GSH podrían haber contribuido al incremento de la citotoxicidad de las partículas de LDL-ox y al daño oxidativo a nivel celular, favoreciendo así el proceso aterosclerótico y la desestabilización de la placa (Therond P, *et al.* 2000).

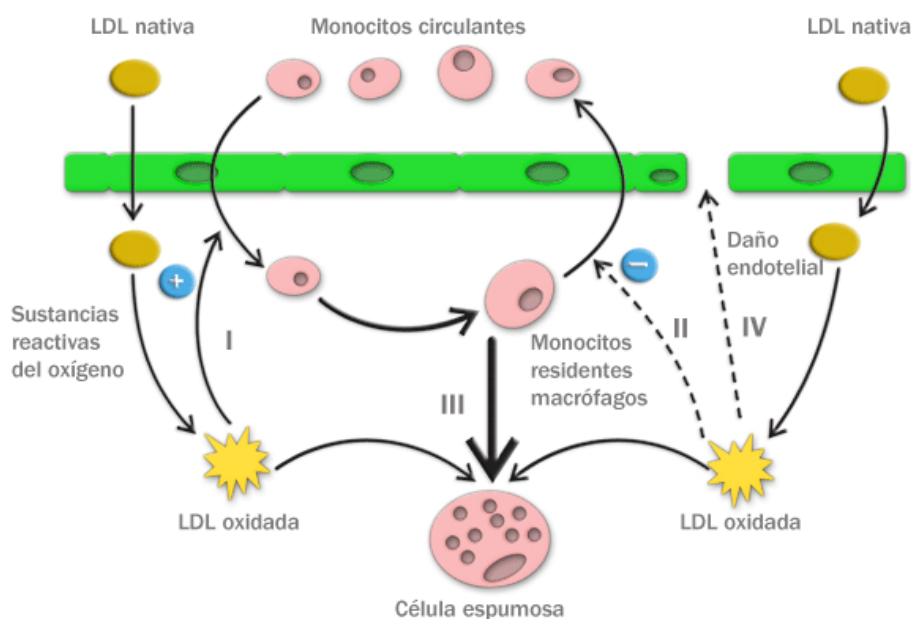


Figura 1.3. Activación de los macrófagos por las LDL-ox y formación de células espumosas.

Esquema modificado de Steinberg D, *et al.* 1989. Fuente: Ruiz-Larrea MB, *et al.* 2008.

Otro mecanismo que pudiera favorecer la respuesta inflamatoria temprana de los leucocitos mononucleares, es el incremento de la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio activado. La infiltración de células T en la íntima aumentaría la secreción de citoquinas proinflamatorias, lo cual amplificaría la respuesta proliferativa de las células de

músculo liso en la íntima. Esta situación debilitaría la capa fibrosa de ateroma y aumentaría el riesgo de trombosis y accidente cerebro-vascular ulterior. De manera notable, las células espumosas aumentan la respuesta inflamatoria y la producción de especies reactivas al oxígeno en la lesión (Ross R. 1993). En este contexto, se ha observado que la expresión de VCAM-1 en particular, responde selectivamente sobre las áreas predispuestas a la formación de lesiones ateroscleróticas (Cybulsky MI, *et al.* 1991). El aumento en la expresión de estas células de adhesión vascular fue observado en modelos experimentales de ratones, tras la inducción de la formación de lesiones ateroscleróticas (Li H, *et al.* 1993). Así mismo, mediante modelos de ratones susceptibles a aterosclerosis se observó la presencia de selectina E y P además de VCAM-1 en las lesiones ateroscleróticas (Johnson RC, *et al.* 1997, Dong ZM, *et al.* 1998). Estos resultados sugieren que las LDL-ox además de ser un sub-producto de la oxidación, también son importantes moléculas de señalización y un elemento clave para el proceso aterosclerótico (Mallika V, *et al.* 2007).

Además de los cambios producidos por el estrés oxidativo sobre las propiedades anti-inflamatorias y anti-coagulantes del endotelio, la enfermedad coronaria comporta también el deterioro de la función vasodilatadora del endotelio. El tono vascular se mantiene por la liberación de factores vasodilatadores como el NO^- y la prostaglandina- I_2 , y de factores vasoconstrictores como el tromboxano- A_2 o la endotelina. El aumento de la permeabilidad endotelial, la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria y la generación de citoquinas, son factores que promueven o exacerban la aterosclerosis (Vepa S, *et al.* 1999). El factor relajante derivado del endotelio puede ser modulado por la presencia de especies reactivas al nitrógeno, por lo que la disfunción endotelial podría ser consecuencia de la pérdida de biodisponibilidad de NO^- en la pared vascular mediante la inhibición de la síntesis o inactivación del NO^- . El NO^- puede ser inactivado por el anión $\text{O}_2^{\bullet-}$, lo que deteriora la función vasodilatadora, un signo temprano de aterosclerosis que podría culminar en un evento clínico (Ferrari R, *et al.* 1998, Zahler S, *et al.* 1999, Wattanapitayakul SK, *et al.* 2000). Estudios realizados en arterias coronarias con lesiones ateroscleróticas han evidenciado una mayor generación del radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ dependiente de la actividad de la NADPH-oxidasa, lo que puede relacionarse con el proceso inflamatorio que ocurre en la placa. El radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ puede reaccionar con el NO^- y formar ONOO^- , agente prooxidante responsable de disfunción y muerte celular en algunas enfermedades, dentro de ellas la aterosclerosis.

Entre las alteraciones en la expresión génica inducida por especies reactivas al oxígeno, pueden ocurrir cambios en vías de señalización moduladas por actividades enzimáticas, y alteraciones en la estructura molecular de biomoléculas (proteínas, lípidos, nucleótidos). Al menos dos factores de transcripción, el factor nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y la proteína de activación-1, que responden al nivel redox intracelular, se unen a regiones promotoras de genes directamente responsables de la patogénesis de algunas enfermedades, como la aterosclerosis (Sen CK, *et al.* 1996).

2.3. Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de factores que comportan un aumento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Grundy SM. 2005), diabetes mellitus 2 (Gami AS, *et al.* 2007) y mortalidad por todas las causas (Ford ES. 2004). Estas patologías se asocian al estrés oxidativo y a un estado inflamatorio de bajo grado. A pesar de las diferencias que existen entre los criterios propuestos para el diagnóstico del síndrome metabólico, se considera que la prevalencia de esta enfermedad alcanza de 20 a 30% entre los adultos de los países desarrollados (Ford ES. 2004, Buckland G, *et al.* 2008).

En base al criterio diagnóstico propuesto por el grupo de expertos del *National Cholesterol Education Program-Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults-Adult Treatment Panel III* (NCEP-ATPIII) (Grundy SM. 2005), el síndrome metabólico se caracteriza por la presencia de diferentes combinaciones de tres o más de los siguientes componentes: obesidad abdominal, hiperglucemia, hipertensión arterial y dislipidemia. Sin embargo, otros componentes han sido asociados al síndrome metabólico, entre los que se incluyen la enfermedad hepática grasa no alcohólica, el síndrome de ovario poliquístico, un estado pro-inflamatorio de bajo grado, un estado protrombótico o el estrés oxidativo (Roberts CK, *et al.* 2009).

2.3.1. Estudios que muestran la relación entre el síndrome metabólico y el estrés oxidativo

Aunque se ha sugerido a la resistencia a la insulina como uno de los principales mecanismos que podrían explicar las alteraciones asociadas a la presencia de síndrome metabólico, en los

últimos años se ha postulado que la inflamación y el estrés oxidativo podrían desempeñar un papel relevante (Wellen KE, *et al.* 2005). No en vano, un estado inflamatorio de bajo grado, condiciona para mayor resistencia a la insulina (Stocker R, *et al.* 2004). Así pues, diversos estudios realizados en pacientes con síndrome metabólico han mostrado una asociación positiva entre algunos marcadores de estrés oxidativo y la aparición de complicaciones cardiovasculares o los diversos componentes del síndrome metabólico (Keaney JF,Jr, *et al.* 2003, Wellen KE, *et al.* 2005, Furukawa S, *et al.* 2004).

2.3.1.1. Estudios observacionales. Datos provenientes de una cohorte de 3033 sujetos ancianos del estudio "*Health, Aging and Body Composition Study*" (ABC), observaron que aquellos que presentaban síndrome metabólico mostraban mayores concentraciones plasmáticas de partículas de LDL-ox en comparación con los sujetos que no padecían el síndrome metabólico, siendo el riesgo de presentar concentraciones plasmáticas de LDL-ox elevadas dos veces mayor en los sujetos que presentaban síndrome metabólico (Holvoet P, *et al.* 2004).

En 2008 se publicaron los resultados del estudio longitudinal "*Cardiovascular Risk Development in Young Adults Study*" (CARDIA), realizado en una submuestra de 1889 individuos que tenían entre 18 y 30 años de edad al inicio del estudio y, que fueron evaluados a los 15 y 20 años de seguimiento (Holvoet P, *et al.* 2008). Los autores mostraron que el estrés oxidativo evaluado mediante las concentraciones plasmáticas de LDL-ox, se asociaba positivamente con la incidencia de síndrome metabólico y con la acumulación de tres de sus factores constituyentes: la obesidad, la hiperglucemia y la hipertrigliceridemia. Asimismo, estos autores identificaron que el riesgo de padecer síndrome metabólico fue 3 veces mayor en los individuos que exhibieron mayores concentraciones de LDL-ox, en comparación con los individuos con valores reducidos de LDL-ox (Holvoet P, *et al.* 2008).

Con relación a la concentración plasmática de antioxidantes que presentan los individuos con síndrome metabólico, Ford y colaboradores publicaron en 2003 los resultados del análisis de 8808 adultos con y sin síndrome metabólico de la encuesta nacional de salud de los Estados Unidos (NHANES-III-1988-1994). Los autores mostraron que tras ajustar por diversas variables confusoras, los individuos con síndrome metabólico presentaban concentraciones

séricas disminuidas de antioxidantes (vitamina A, C, E, esterés de retinol, carotenoides y selenio) en comparación con aquellos que no presentaban síndrome metabólico. Además, sugirieron que el aumento del riesgo de padecer ECV y DM2 de los pacientes con síndrome metabólico, podría ser explicado en parte por la disminución de antioxidantes que exhiben (Ford ES, *et al.* 2003).

Diversos análisis de tipo transversal han evaluado la relación entre el estrés oxidativo y el síndrome metabólico. Cangemi y colaboradores (2007) observaron que en comparación con adultos sanos, los individuos con síndrome metabólico mostraban mayores concentraciones séricas de 8-oxodG ($p < 0.001$) un sub-producto de la oxidación del ADN, y una menor vasodilatación de la arteria braquial ($p < 0.001$) (Cangemi R, *et al.* 2007). Los autores reportaron además una relación inversa entre las concentraciones de 8-oxodG y las alteraciones en la vasodilatación mediada por el flujo vascular ($R = -0,74$; $p < 0,01$). Estos resultados sugieren el papel que el aumento de estrés oxidativo ejerce para la aparición de complicaciones cardiovasculares en pacientes con síndrome metabólico. Mediante otro estudio transversal, Fujita y colaboradores (2006) evaluaron la peroxidación lipídica determinando la producción urinaria de isoprostanos y su relación con los componentes del síndrome metabólico. Los autores observaron que los pacientes con síndrome metabólico presentaban una excreción urinaria superior de isoprostanos que los individuos control. Además, observaron que el grado de estrés oxidativo dependía en gran medida del número de componentes de síndrome metabólico que presentaran los pacientes. Asimismo, identificaron que la "obesidad abdominal" era el componente del síndrome metabólico que se relacionaba en mayor medida con el aumento del estrés oxidativo sistémico ($r = 0,636$; $p < 0,0001$), en comparación con los otros componentes del síndrome metabólico (Fujita K, *et al.* 2006). Resultados similares fueron obtenidos por Van Guilder y colaboradores (2006), quienes investigaron la relación entre el estrés oxidativo y la obesidad como componente individual del síndrome metabólico, determinando las concentraciones plasmáticas de LDL-ox en 48 individuos con normopeso y 40 pacientes con obesidad (la mitad de los pacientes obesos aparentemente sanos y la otra mitad con diagnóstico de síndrome metabólico). Los autores observaron que los dos grupos de pacientes con obesidad mostraban un aumento de los valores plasmáticos de LDL-ox en comparación al grupo control. Además, los pacientes con obesidad y síndrome metabólico

presentaban concentraciones más elevadas de LDL-ox en comparación a aquellos individuos obesos aparentemente sanos o con normopeso (Van Guilder GP, *et al.* 2006).

Tal y como se observa en los estudios citados previamente, el daño oxidativo puede ser potenciado en presencia de síndrome metabólico, lo que podría relacionarse con la disminución de la capacidad antioxidante y el consecuente agotamiento de los sistemas de defensa antioxidante que estos individuos exhiben. Ejemplo de ello, el análisis transversal de Palmieri y colaboradores (2006) cuyos resultados mostraron que en comparación con el grupo control, los pacientes con síndrome metabólico presentan una reducción de los niveles séricos de vitamina C y α -tocoferol, lo que se relacionó con un aumento observado en la producción de lípidos peroxidados ($p < 0,001$) (Palmieri VO, *et al.* 2006). Resultados semejantes obtuvieron Hansel y colaboradores (2004) al evaluar la actividad antioxidante de las sub-fracciones 3a, 3b y 3c de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Mediante un estudio transversal, los autores mostraron que los pacientes con síndrome metabólico tenían una capacidad antioxidante reducida en las sub-fracciones 3a, 3b y 3c del colesterol HDL (c-HDL) y un aumento en la producción de isoprostanos, en comparación con los individuos del grupo de individuos sanos (Hansel B, *et al.* 2004).

2.3.1.2. Estudios experimentales. Con la finalidad de explicar los posibles mecanismos involucrados en el estrés oxidativo y las posibles fuentes moleculares de especies reactivas al oxígeno en presencia de síndrome metabólico o de sus componentes, diversos estudios experimentales han sido realizados. Roberts y colaboradores en el año 2006 realizaron un estudio de intervención con ratas Fisher con obesidad inducida, que fueron usadas como modelo experimental de síndrome metabólico. Tras siete meses de someterlas a una dieta alta en grasa y azúcares refinados, los tejidos de la aorta y riñón fueron analizados y comparados con los de un grupo control de ratas alimentadas con una dieta estándar. Al comparar los cortes de los tejidos señalados, los autores observaron que la expresión de la enzima NADPH-oxidasa había aumentado y que las concentraciones de enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px, hemo-oxigenasa) habían disminuido de manera significativa en las ratas obesas con síndrome metabólico en comparación con las ratas del grupo control (Roberts CK, *et al.* 2006). Además, se observó una asociación positiva entre la generación de radicales libres y la inactivación del NO^- . De hecho, el deterioro de la respuesta vasodilatadora observado en los modelos

experimentales de síndrome metabólico se mantuvo tras la administración de acetilcolina, un potente vasodilatador. Según los autores de este estudio, los resultados sugieren que el aumento en la generación de radicales libres, la activación de la NADPH-oxidasa y la disminución de los antioxidantes enzimáticos, podrían ser algunos de los mecanismos involucrados en la relación existente entre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial que ocurre en presencia de síndrome metabólico (Roberts CK, *et al.* 2006).

Los resultados de una serie de estudios experimentales publicados por Furukawa y colaboradores en 2004, sugieren que el aumento del estrés oxidativo en el tejido adiposo en presencia de obesidad, podría ser otro factor que subyace a la alteración en la producción de adipocitoquinas, mecanismo que podría favorecer el desarrollo de síndrome metabólico. Mediante el cultivo de adipocitos 3T3-L1 incubados durante 4 horas con diferentes concentraciones de ácido linoleico, estos mismos autores observaron un aumento significativo en la expresión adipocitaria de las enzimas NADPH-oxidasas, lo que generó una actividad oxidativa aumentada que provocó la alteración en la producción de adiponectina, de plasminógeno activados de interleucina-1 (PAI-1), de proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) y de interleucina-6 (IL-6). Además, mediante un modelo experimental de ratones obesos con y sin diabetes, estos mismos autores observaron que estos dos grupos de ratones presentaban mayor peroxidación lipídica del plasma evaluada mediante el ensayo TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y del tejido adiposo blanco, comparados con un grupo control (Furukawa S, *et al.* 2004). De la misma manera, también observaron un aumento de la actividad oxidativa de las NADPH-oxidasas y la alteración en la producción de adipocitoquinas del tejido adiposo blanco. Así pues, los autores sugirieron que el aumento de estrés oxidativo en el tejido adiposo podría ser un factor desencadenante de síndrome metabólico, y por ello un posible objetivo terapéutico útil en el tratamiento de las patologías asociadas a este síndrome (Furukawa S, *et al.* 2004). Posteriormente, tras la administración de una sustancia inhibidora de la expresión de la NADPH-oxidasa en los dos modelos de ratones obesos (con y sin diabetes), observaron que la actividad de la NADPH-oxidasa y la alteración en la producción de adipocitoquinas disminuían, asociándose ello a una mejoría generalizada de otros parámetros evaluados, como la dislipemia, diabetes y esteatosis hepática que presentaban los ratones obesos, sugiriendo entonces que el aumento de estrés oxidativo en

presencia de obesidad parece contribuir al desarrollo del síndrome metabólico (Furukawa S, *et al.* 2004).

2.3.1.3. Estudios de intervención. Algunos estudios clínicos han evaluado el efecto que produce la administración de sustancias antioxidantes o de fármacos sobre individuos con síndrome metabólico.

En un estudio de diseño cruzado, aleatorizado y controlado con placebo (NaCl 0,9 g/L), Cangemi y colaboradores (2007) evaluaron en pacientes con síndrome metabólico el efecto de la administración por vía intravenosa de 1 g de vitamina C sobre la función endotelial y el estrés oxidativo, en comparación a un grupo de sujetos sanos. Los autores observaron una mayor concentración periférica de 8-oxodG ($p < 0,001$) y menor alteración de la vasodilatación de la arteria braquial ($p < 0,001$), identificando una correlación inversa entre las concentraciones de 8-oxodG y la vasodilatación inducida por la intervención ($R = -0,74$; $p < 0,01$) (Cangemi R, *et al.* 2007). En estos mismos pacientes con síndrome metabólico, se observó que la administración de placebo no producía cambios sobre la vasodilatación braquial, mientras que la infusión de la vitamina C sí redujo de manera significativa las concentraciones de 8-oxodG ($p < 0,001$). Además, se observó que la vasodilatación tras la administración del placebo, se asoció a un aumento significativo de las concentraciones de 8-oxodG, efecto que fue contrarrestado tras la administración de vitamina C. Los autores identificaron que la vitamina C se correlacionaba de forma inversa a los cambios de la vasodilatación mediada por el flujo y el estrés oxidativo ($R = -0,67$; $p < 0,01$) (Cangemi R, *et al.* 2007). Estos resultados apoyan la relevancia que el estrés oxidativo y la disfunción arterial ejercen para la aparición de algunas comorbilidades asociadas al síndrome metabólico.

Khan y colaboradores (2004) evaluaron en 40 pacientes con síndrome metabólico el efecto del quinapril, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, sobre diversos marcadores de estrés oxidativo. Mediante un ensayo clínico, aleatorizado y controlado con placebo, estos autores administraron durante 4 semanas a la mitad de los pacientes una dosis de 20 mg/día de quinapril, mientras que el resto de los pacientes con síndrome metabólico recibieron placebo. Los autores observaron que el grupo de pacientes con síndrome metabólico que recibieron el tratamiento de quinapril habían reducido significativamente las concentraciones séricas de isoprostanos, en comparación a los pacientes del grupo control. Además del

incremento de la actividad antioxidante de la enzima SOD en los eritrocitos observado en los pacientes con síndrome metabólico, también se observó un aumento en el tiempo de la fase de retardo o latencia (*lag time*) para el inicio de la oxidación. Estos resultados permiten reforzar la hipótesis que sugiere la implicación de mecanismos oxidativos en la aparición de las comorbilidades asociadas al síndrome metabólico (Khan BV, *et al.* 2004).

Por otro lado, se ha propuesto que el tratamiento con metformina podría asociarse al control del síndrome metabólico, pero su efecto terapéutico continúa en debate. Meaney y colaboradores (2008) realizaron un estudio de diseño paralelo, controlado, en que aleatorizaron 60 pacientes con síndrome metabólico y sin diagnóstico de DM2 a dos grupos. Al primer grupo se le administró una dosis de 850 mg/día de metformina junto con recomendaciones de una dieta saludable y el grupo control solo recibió las mismas recomendaciones dietéticas. Después de un año de intervención, los pacientes con metformina y dieta saludable, mostraron una mejoría significativa del estrés oxidativo en comparación a los pacientes del grupo control, ya que redujeron la producción de los metabolitos de oxidación nitrosativa evaluados (carbonilos, MDA, tirosinas, productos avanzados de oxidación proteica) y aumentaron los niveles de $\text{NO}^{\cdot-}$. El tratamiento con metformina se asoció a una mejoría de la disfunción endotelial con disminución del grosor de la intima-media de la carótida y de la nitro-oxidación (Meaney E, *et al.* 2008).

Por último, el grupo de Devaraj y colaboradores (2008) diseñaron un estudio de intervención con pacientes que presentaban síndrome metabólico para evaluar el efecto de la suplementación con α -tocoferol, γ -tocoferol o bien, de la combinación de ambas vitaminas antioxidantes sobre diversos marcadores de oxidación y de inflamación. Tras 6 semanas de intervención y en comparación a un grupo control que recibió placebo, los pacientes con síndrome metabólico que recibieron la suplementación con cualquiera de los 3 tratamientos con tocoferol mostraron una mejoría de los parámetros de estrés oxidativo y de inflamación evaluados. Sin embargo, los autores del estudio resaltaron que la suplementación combinada, obtuvo la mayor mejoría del estrés oxidativo y la inflamación en comparación a los efectos observados del α -tocoferol o γ -tocoferol administrados individualmente (Devaraj S, *et al.* 2008). Por ello, los autores sugirieron que la suplementación combinada debería ser analizada en un futuro con nuevos estudios de intervención para confirmar sus hallazgos.

2.4. Estrés oxidativo asociado a otras enfermedades

2.4.1. Estrés oxidativo y cáncer

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una estrecha relación entre el estrés oxidativo y la aparición de diversos tipos de cáncer (Valko M, *et al.* 2007). La sobreproducción de radicales libres y el consecuente daño oxidativo tiene un efecto mutagénico sobre el ADN nuclear y el ADN mitocondrial, lo que podría desencadenar la iniciación del tumor (Evans MD, *et al.* 2004). El efecto de los radicales libres sobre la doble hélice del ADN puede generar la activación de protooncogenes o la inactivación de genes supresores tumorales, lo cual conlleva la aparición y desarrollo de los mecanismos carcinogénicos (Klaunig JE, *et al.* 2004).

La mayoría de los estudios observacionales en humanos revisados por Evans y colaboradores en 2004, mostraron niveles elevados de lesiones oxidativas al ADN en presencia de diferentes tipos de tumores. Los autores de la revisión resaltaron la relevancia del estrés oxidativo en la mutagénesis espontánea del ADN, implícito en la etiología del cáncer. Sin embargo, estos autores observaron que diversas condiciones patológicas presentan estrés oxidativo y un elevado daño al ADN, sin encontrar un aumento en la incidencia de cáncer (Evans MD, *et al.* 2004).

Es evidente que el estrés oxidativo inducido por la generación de especies reactivas al oxígeno y/o especies reactivas al nitrógeno, está implicado en los múltiples procesos de la carcinogénesis mediante mecanismos genéticos y epigenéticos (Franco R, *et al.* 2008). Sin embargo, es necesario generar mayores conocimientos relacionados a los mecanismos oxidativos implicados que permitan dilucidar el papel definitivo de las lesiones oxidativas al ADN y el cáncer (Evans MD, *et al.* 2004).

2.4.2. Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas

El sistema nervioso central es particularmente vulnerable al daño oxidativo, debido a que en comparación con otros tejidos y órganos del cuerpo, el cerebro utiliza en mayor medida el anión superóxido $O_2^{\bullet -}$. Otro factor que contribuye al estrés oxidativo del cerebro, es su menor

contenido de antioxidantes y enzimas antioxidantes y finalmente, el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el cerebro y con ello, la mayor susceptibilidad a la oxidación (Sayre LM, *et al.* 2008). Las enfermedades neurodegenerativas en que el estrés oxidativo tiene un papel relevante se encuentran, la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo asociado, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis amiotrófica lateral (Everse J, *et al.* 2009). Aunque el origen del proceso neurodegenerativo es desconocido, diferentes estudios han demostrado mediante sistemas *in vitro*, modelos experimentales de animales y en estudios con humanos, que el incremento en la generación de las especies reactivas al oxígeno y el efecto deletéreo que producen podría explicar en parte, el origen y desarrollo de estas enfermedades.

A pesar del origen distinto y los diferentes efectos que producen estas enfermedades, comparten características similares entre ellas. A continuación se destacan algunas de las evidencias experimentales en que intervienen importantes procesos oxidativos que comparten para el desarrollo de estas tres importantes enfermedades neurodegenerativas (Everse J, *et al.* 2009):

- a) la presencia de peroxidación lipídica en las neuronas afectadas (Kirkinezos IG, *et al.* 2005, Perluigi M, *et al.* 2005),
- b) la generación de dos especies reactivas, el H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ (Bogdanov MB, *et al.* 1998, Huber A, *et al.* 2006),
- c) la severa disminución de la concentración de GSH en las neuronas afectadas (Sian J, *et al.* 1994, Liu H, *et al.* 2004),
- d) las alteraciones en la homeostasis del cobre, estrechamente relacionado con la fisiopatología de cada uno de los desórdenes neurológicos (Sayre LM, *et al.* 2000),
- e) la inactivación de la ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa-L1, proteína muy sensible a la oxidación (Choi J, *et al.* 2004, Poon HF, *et al.* 2005) y,
- f) la generación de enzimas prooxidantes, peroxidasas principalmente, en las neuronas afectadas (Teismann P, *et al.* 2001, Teismann P, *et al.* 2003, Choi J, *et al.* 2005).

A pesar de la aceptación generalizada del relevante papel que tiene el estrés oxidativo para el desarrollo de estas enfermedades neurodegenerativas, aun queda por esclarecer la efectividad y la necesidad de la administración de antioxidantes, ya sea mediante la recomendación de una

dieta rica en antioxidantes o bien, por la suplementación de la dieta mediante suplementos antioxidantes como una terapia efectiva (Mariani E, *et al.* 2005).

3. Papel de la dieta como modulador del estrés oxidativo

Diversos factores dietéticos podrían relacionarse con la capacidad de modular el estrés oxidativo. La capacidad antioxidante de algunos alimentos contenidos en diversos patrones dietéticos se deriva del potencial acumulativo y sinérgico que muestran vitaminas, polifenoles, carotenoides y otros constituyentes, como los compuestos de Maillard y algunos minerales (Saura-Calixto F, *et al.* 2009) y de su capacidad para interactuar entre sí. La ingesta de antioxidantes a través de una dieta saludable contribuiría a disminuir los procesos de oxidación a nivel endógeno, disminuyendo así las consecuencias negativas derivadas del estrés oxidativo (Haldar S, *et al.* 2007).

La relación entre determinados alimentos, patrones alimentarios o estilos de vida con la presencia de enfermedades (Figura 1.4.) ha generado información epidemiológica interesante, ya que los resultados podrían aplicarse en la prevención del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas. De hecho, diferentes estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre el consumo de frutas y verduras (Genkinger JM, *et al.* 2004) o cereales enteros (Slavin J. 2004) y el riesgo de mortalidad por ECV, cáncer y otras patologías crónicas (Hu FB. 2003), enfermedades a las que generalmente subyace un incremento del estrés oxidativo (Johnston C. 2009).

En una reciente y amplia revisión sistemática realizada por Mente y colaboradores (2009) que incluyó 146 estudios prospectivos y 43 estudios clínicos, se observó que el consumo de verduras, frutos secos, ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), el grado de adherencia a una dieta Mediterránea (DMed) o a una dieta "prudente" se asoció de manera inversa con el riesgo de desarrollar ECV. Contrariamente a estos resultados, los autores observaron que el consumo de ácidos grasos *trans* y alimentos con elevada carga glucémica o de índice glucémico alto y el consumo de una dieta tipo "occidental", se asoció con un mayor riesgo de padecer ECV (Mente A, *et al.* 2009).

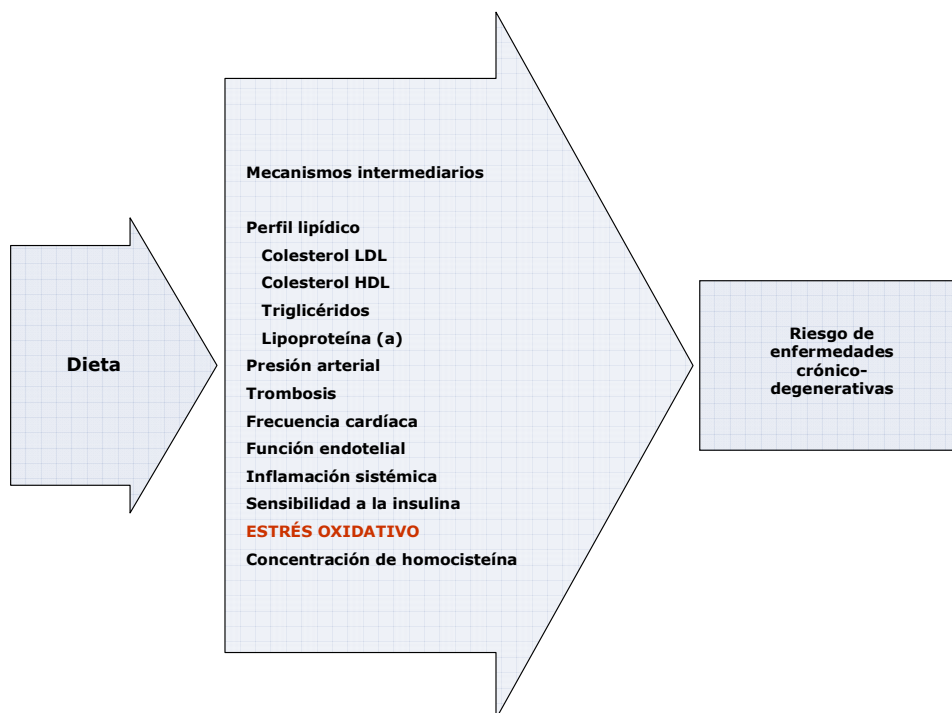


Figura 1.4. Relación entre la dieta y el riesgo de enfermedades crónico-degenerativas.

Adaptada de: Hu FB, *et al.* 2002.

Como se ha señalado, existen diferentes alimentos de origen vegetal con alto contenido en sustancias antioxidantes, entre los que cabe destacar: las frutas y verduras, el aceite de oliva, los frutos secos y el vino. A continuación se describen brevemente los estudios que relacionan el consumo de estos alimentos con el estrés oxidativo. Dado que esta tesis trata de frutos secos, este grupo de alimentos se analizará más ampliamente en el siguiente capítulo.

3.1. Frutas y verduras como modulador del estrés oxidativo

Numerosos estudios epidemiológicos han asociado el mayor consumo de frutas y verduras con un menor riesgo de desarrollar ECV (Panagiotakos DB, *et al.* 2007, Joshipura KJ, *et al.* 2001, Joshipura KJ, *et al.* 1999). Este beneficio cardiovascular podría ser explicado en parte por la disminución de la susceptibilidad a la oxidación de las partículas LDL circulantes, (Chopra M, *et al.* 2000, Hininger I, *et al.* 1997) o por el incremento en la concentración tisular de diversas sustancias antioxidantes tras el consumo de estos alimentos. Los componentes con actividad antioxidante abundantes en frutas y verduras podrían contribuir a reducir el estrés oxidativo, lo

que podría explicar en parte los beneficios del consumo de este grupo de alimentos sobre la tensión arterial, la mejoría del patrón lipídico plasmático o la sensibilidad a la insulina y de la función endotelial (Liu XQ, *et al.* 2000, Rissanen TH, *et al.* 2003).

Diversos estudios prospectivos han evaluado la relación entre el consumo de antioxidantes a través de la dieta o la capacidad antioxidante de la dieta con el riesgo de mortalidad por todas las causas. Por ejemplo, en un estudio prospectivo observacional de 10 años de seguimiento realizado sobre un grupo de 2814 fumadores belgas de alto riesgo cardiovascular, Van Hoydonck y colaboradores (2002) observaron que aquellos que consumían mayor cantidad de vitamina C y β -carotenos presentaban un menor riesgo de mortalidad en comparación a aquellos con un menor consumo (Van Hoydonck PG, *et al.* 2002). Key y colaboradores (2003) evaluaron la dieta y su relación con la mortalidad mediante la revisión de tres estudios prospectivos realizados sobre población del Reino Unido. Los autores de esta revisión no observaron diferencias significativas en cuanto a mortalidad entre los individuos que seguían una dieta vegetariana en comparación con aquellos que no eran vegetarianos. Sin embargo, al analizar los niveles plasmáticos de vitamina C en los individuos de estos tres estudios, los autores de esta revisión observaron una asociación inversa entre los niveles plasmáticos de ácido ascórbico y la mortalidad total (Key TJ, *et al.* 2003). Resultados similares fueron obtenidos en el estudio europeo "Survey in Europe on Nutrition and the Elderly: a Concerted Action" (SENECA), ya que tras 10 años de seguimiento de una cohorte de 1168 individuos ancianos aparentemente sanos, se observó una asociación inversa entre el consumo de carotenos y tocoferol y el riesgo de mortalidad por todas las causas, ECV y cáncer (Buijsse B, *et al.* 2005). En otro estudio, realizado sobre una población anciana alemana, se observó un menor riesgo de mortalidad en aquellos individuos con elevadas concentraciones de carotenoides oxigenados (β -criptoxantina, luteína y zeaxantina) en plasma. Sin embargo, en este mismo estudio no se observó asociación alguna entre mortalidad y niveles plasmáticos de carotenos totales (De Waart FG, *et al.* 2001). Por último, en un estudio realizado sobre una cohorte de 41358 adultos españoles del estudio europeo EPIC, Agudo y colaboradores (2007) observaron que el consumo de frutas y verduras frescas se asociaba a una menor mortalidad, sugiriendo que ello podría deberse en parte a la mayor ingesta de vitamina C, carotenoides y licopeno asociado al consumo de frutas y verduras (Agudo A, *et al.* 2007).

En resumen, los resultados de estos y otros estudios sugieren que el consumo de alimentos con alta capacidad antioxidante, en particular de frutas y verduras, podrían ayudar a explicar el menor riesgo de enfermedades crónico-degenerativas a través de la modulación de los procesos endógenos de oxidación.

3.2. Aceite de oliva como modulador del estrés oxidativo

El aceite de oliva virgen es uno de los aceites más estables y resistentes a la oxidación, debido especialmente al gran contenido de ácido oleico (76-89%), fenoles totales (20-150 mg/100 g), tocoferol (10-30 g/100 g) y carotenoides (200-1000 µg/100 g) (Gimeno E, *et al.* 2002, de la Torre-Carbot K, *et al.* 2005, Frankel EN. 2005). Alrededor del 80% o más de los compuestos fenólicos contenidos en el aceite de oliva se pierden durante el proceso de refinamiento, por lo que el aceite de oliva virgen contiene mayores cantidades de fenoles respecto de otros tipos de aceite de oliva (revisado por Bullo M, *et al.* 2010).

El contenido en polifenoles del aceite de oliva, particularmente del aceite de oliva virgen, depende de factores externos como el sistema de producción agrícola, el grado de madurez de la aceituna a la cosecha, el procesamiento empleado para la obtención del tipo de aceite (Gimeno E, *et al.* 2002) y el modo y tiempo de almacenamiento. La riqueza de antioxidantes y el gran contenido de AGMI del aceite de oliva virgen alarga la vida útil de almacenamiento. Sin embargo, el aceite de oliva también es susceptible a la oxidación (Frankel EN. 2007). Durante el almacenamiento disminuye su contenido en α -tocoferol, β -caroteno, clorofila y componentes fenólicos totales (Romani A, *et al.* 2007, Lerma-García MJ, *et al.* 2009).

Los efectos beneficiosos asociados al aceite de oliva se atribuyen principalmente al elevado contenido de grasas monoinsaturadas (Lopez-Miranda J, *et al.* 2010), ya que se ha observado que el consumo de dietas ricas en ácido oleico protegen en mayor medida contra la oxidación de las partículas LDL en comparación con el consumo de dietas ricas en AGPI, tanto en individuos sanos como en sujetos hipercolesterolémicos (Reaven P, *et al.* 1993, Baroni SS, *et al.* 1999). Asimismo, estudios clínicos han demostrado que el reemplazo de la grasa saturada de la dieta por grasa monoinsaturada proveniente de aceite de oliva, disminuye de manera significativa la cantidad de partículas LDL circulantes en sangre, lo que se relaciona con una

menor incidencia de enfermedad coronaria (Roche HM, *et al.* 1998, Abia R, *et al.* 1999, Ruiz-Gutierrez V, *et al.* 1998, Kris-Etherton PM, *et al.* 1999). Sin embargo, el aceite de oliva virgen contiene otros componentes minoritarios, predominantemente polifenoles, los cuales exhiben una capacidad antioxidante relevante que podrían contribuir a mejorar la salud cardiovascular (Moreno JJ, *et al.* 2003).

Diversos estudios experimentales sugieren un efecto protector de los polifenoles contenidos en el aceite de oliva contra la oxidación de lípidos, del ADN o de la oxidación de las partículas LDL. Sin embargo, los resultados del meta-análisis publicado por Vissers y colaboradores (2004) que incluyó 7 estudios de intervención realizados en humanos que evaluaban la biodisponibilidad y el efecto de los compuestos fenólicos del aceite de oliva sobre diversos marcadores oxidativos, mostraron resultados inconsistentes. Los autores de esta revisión sugieren que, aunque los compuestos fenólicos del aceite de oliva son bien absorbidos, probablemente la cantidad de estos compuestos no era suficiente para producir un efecto cuantificable y biológicamente significativo sobre la oxidación de las partículas LDL (Vissers MN, *et al.* 2004).

No obstante, los resultados del EUROLIVE, un estudio multicéntrico, de intervención y de diseño cruzado, aportaron evidencias de primer nivel sobre el papel protector de los componentes fenólicos del aceite de oliva contra el daño oxidativo (Covas MI, *et al.* 2006). En este estudio 200 hombres sanos de cinco países europeos (España, Dinamarca, Finlandia, Italia y Alemania) fueron aleatorizados a consumir tres dosis diferentes de polifenoles (alta, media, baja) mediante el consumo de 25 mL/día de 3 tipos de aceite de oliva conteniendo diferentes niveles de polifenoles. Después de tres semanas de intervención, Covas y colaboradores (2006) observaron que todos los tipos de aceite de oliva aumentaron las concentraciones de c-HDL circulantes y el coeficiente GSH/GSSG, mientras que el aceite de oliva virgen extra fue el único aceite que disminuyó significativamente el daño oxidativo al ADN. El consumo de cantidades medias y altas de polifenoles provocó una disminución en la formación de dienos conjugados, hidroxiácidos grasos y de LDL-ox, sin que se observaran cambios significativos en la producción de isoprostanos, en la actividad enzimática antioxidante o en los niveles de vitaminas antioxidantes evaluados en plasma (Covas MI, *et al.* 2006).

Además, resultados de la reciente revisión de Bulló y colaboradores (2010) destacan el efecto protector de los componentes fenólicos del aceite de oliva virgen de la dieta en contra del estrés oxidativo (Bullo M, *et al.* 2010). Los autores de esta revisión analizaron diversos estudios de intervención, controlados, aleatorizados y de diseño cruzado, con muestras poblacionales reducidas de individuos sanos, quienes recibieron dos (Salvini S, *et al.* 2006) o tres (Gimeno E, *et al.* 2007, Weinbrenner T, *et al.* 2004, Marrugat J, *et al.* 2004) tipos de aceite de oliva con diferente contenido de polifenoles y períodos de intervención, durante 4 días (Weinbrenner T, *et al.* 2004), tres semanas (Gimeno E, *et al.* 2007, Marrugat J, *et al.* 2004) y hasta ocho semanas (Salvini S, *et al.* 2006). Todos los estudios de intervención analizados mostraban que en individuos sanos, el consumo crónico de aceite de oliva con alto contenido fenólico protegía de la oxidación a las partículas LDL circulantes y al ADN. Resultados similares se observaron al analizar los estudios que evaluaban el efecto antioxidante del consumo de los polifenoles del aceite de oliva sobre pacientes con elevado estrés oxidativo, como por ejemplo en situación de enfermedad coronaria estable (Fito M, *et al.* 2005), enfermedad periférica vascular (Masella R, *et al.* 2001, Ramirez-Tortosa MC, *et al.* 1999) o en sujetos dislipidémicos (Visioli F, *et al.* 2005). Los autores de esta revisión concluyen que el consumo regular de aceite de oliva de alto contenido fenólico podría contribuir a disminuir el estrés oxidativo y con ello prevenir la aparición de algunas enfermedades crónico-degenerativas (Bullo M, *et al.* 2010).

3.3. Vino como modulador del estrés oxidativo

Resultados de diversos estudios epidemiológicos han mostrado una relación significativa entre el consumo moderado de alcohol y un menor riesgo de ECV o de mortalidad asociada a estas enfermedades (Doll R, *et al.* 1994, Thun MJ, *et al.* 1997, Fuchs CS, *et al.* 1995, Gaziano JM, *et al.* 2000, Gronbaek M, *et al.* 2000, Di Castelnuovo A, *et al.* 2002). Este efecto cardiosaludable se ha atribuido principalmente al contenido en etanol, aunque también a los diferentes antioxidantes que contiene el vino (revisado por Covas y colaboradores en 2010). La presencia de polifenoles del vino depende del origen y variedad de la uva, así como del proceso de elaboración del vino. Los componentes polifenólicos que abundan en el vino son: flavonoides como la quercetina, taninos o catequinas, sustancias no-flavonoides como el ácido gálico, cumárico o cafeico, y los estilbenos, principalmente el resveratrol (German JB, *et al.* 2000).

Numerosos estudios experimentales *in vivo* han evaluado los posibles efectos del vino sobre factores de riesgo para las ECV, como el estrés oxidativo. Algunos de ellos han sido realizados en modelos animales o en humanos (revisado por Pérez-Jiménez y Saura-Calixto en 2008). Dos estudios han evaluado el efecto del consumo de vino tinto o de vino tinto sin alcohol en ratas. En ambos estudios, la capacidad antioxidante del plasma en las ratas se incrementó significativamente por el consumo de los dos tipos de vino, aunque el aumento fue mayor por el consumo de vino tinto con alcohol (Araya J, *et al.* 2001, Rodrigo R, *et al.* 2002). Sin embargo, también se han obtenido resultados contradictorios. Benteon y colaboradores (2001) observaron que la capacidad antioxidante de ratones knockout para el gen de la apolipoproteína-E no se modificó tras el consumo de vino tinto. Se ha sugerido que esta discrepancia de resultados que se encuentran en la bibliografía podría deberse a las limitaciones metodológicas y los distintos diseños de estudio, la duración del tratamiento y las dosis de antioxidantes administradas (Perez-Jimenez J, *et al.* 2008).

En algunos estudios realizados en humanos que fueron incluidos en la revisión de Pérez-Jiménez y Saura-Calixto (2008) no se observaron modificaciones significativas en la capacidad antioxidante del plasma tras el consumo de productos derivados de las uvas. Sin embargo, otros autores han observado un aumento de la capacidad antioxidante plasmática tras el consumo de un extracto de polifenoles de vino tinto (Carbonneau MA, *et al.* 1997), de uvas (Vinson JA, *et al.* 2001), de zumo de uva (Castilla P, *et al.* 2006), de zumo concentrado de uva (O'Byrne DJ, *et al.* 2002) o de vino tinto (Tsang C, *et al.* 2005). De la misma manera Ceriello y colaboradores (2001), tras evaluar en un grupo de sujetos diabéticos de ambos sexos, el efecto agudo del consumo de una comida acompañada con vino tinto sobre la capacidad antioxidante del plasma, no observaron cambios significativos durante el período postprandial. Sin embargo, cuando estos pacientes consumieron la misma comida pero sin el vino tinto, la capacidad antioxidante plasmática disminuyó significativamente (Ceriello A, *et al.* 2001a).

En una revisión sistemática en la que se analizaron diferentes estudios de intervención, aleatorizados y controlados, evaluando el efecto del consumo de vino sobre distintos marcadores de estrés oxidativo, Covas y colaboradores (2010) destacan el efecto protector que el consumo regular de vino tiene contra los procesos de oxidación en humanos, especialmente en individuos con presencia de un elevado estrés oxidativo (fase postprandial, hábito tabáquico

o enfermedad coronaria) (Covas MI, *et al.* 2010). Los autores de esta revisión señalan que en la actualidad, no existen suficientes evidencias que indiquen que el consumo crónico de vino produzca en sujetos sanos, efectos antioxidantes que vayan más allá de la capacidad que tiene el vino de contrarrestar el efecto prooxidante que produce el consumo de alcohol (Covas MI, *et al.* 2010).

3.4. Patrones dietéticos y su relación con el estrés oxidativo

La gran variedad de alimentos y las combinaciones de nutrientes de determinados patrones dietéticos, comportan interacciones que producen efectos sinérgicos o antagónicos a quienes los consumen. Distintos estudios han evaluado el efecto que produce el consumo de un "patrón occidentalizado" o del "patrón prudente" sobre marcadores de la inflamación, la oxidación o la función endotelial, así como sobre la incidencia de diabetes, obesidad o distintos tipos de cáncer, enfermedades todas ellas relacionadas con la presencia de estrés oxidativo. Además, los patrones dietéticos se han relacionado con la tasa de mortalidad total o la mortalidad causada por otras causas.

3.4.1. Patrón dietético prudente y estrés oxidativo

El principal punto de convergencia de las dietas prudentes es el elevado consumo de alimentos naturales mínimamente procesados de bajo contenido energético, pero de alto valor nutricional. Entre las dietas prudentes podemos encontrar a las dietas vegetarianas y las dietas tradicionales, como por ejemplo la dieta Mediterránea o la dieta Asiática (O'Keefe JH, *et al.* 2008). De hecho, algunos estudios de cohorte y prospectivos, han observado que la mayor adherencia a un patrón dietético prudente se asocia significativamente con una menor mortalidad por todas las causas (Osler M, *et al.* 2001, Kumagai S, *et al.* 1999). El patrón dietético prudente comparte también algunas similitudes con el patrón de consumo de alimentos "ancestral" que nuestros antepasados homínidos mantenían (predominantemente vegetarianos y arborícolas), que se sugiere como el régimen dietético al que genéticamente permanecemos más adaptados (O'Keefe JH, *et al.* 2008).

3.4.2. Patrón dietético Mediterráneo y estrés oxidativo

Desde un punto de vista geográfico el término "dieta Mediterránea tradicional" refleja los hábitos alimentarios típicos de los grupos poblacionales que habitaban la región de la cuenca del Mediterráneo a principios de los años sesenta (Tyrovolas S, *et al.* 2010). El patrón dietético Mediterráneo además de ser variado, equilibrado y completo, engloba un estilo de vida saludable con características propias de los habitantes de esta región geográfica, que incluye costumbres, tales como la de socialización durante las comidas, la siesta y la práctica regular de actividad física, además de creencias y tradiciones basadas en el consumo de una combinación de ingredientes tradicionales, algunos de los cuales han sido actualizados mediante el uso de modernas tecnologías (Serra-Majem L, *et al.* 2004). La DMed actual conserva todavía los principales elementos característicos de este patrón tradicional (Marquez-Sandoval F, *et al.* 2008), que en general se caracteriza por un alto consumo de frutas, vegetales, legumbres, cereales, frutos secos y semillas, y el uso del aceite de oliva como la principal fuente de grasa; un consumo bajo de carne roja, cremas, bebidas azucaradas y mantequilla; un consumo moderado de pescado y cerdo, así como un consumo moderado de vino tinto, casi siempre durante las comidas (Sofi F. 2009). Numerosos estudios han demostrado que una mayor adherencia al patrón dietético Mediterráneo se asocia de forma inversa al riesgo de ECV, de mortalidad por todas las causas, cáncer y otras enfermedades crónicas relacionadas con la alimentación (Trichopoulou A, *et al.* 1994, Trichopoulou A, *et al.* 2003). Por ello, se considera a la DMed como uno de los patrones dietéticos más saludables del mundo (Roman B, *et al.* 2008).

Sin embargo, únicamente cuatro estudios epidemiológicos han analizado la asociación entre la adherencia a la DMed y el estrés oxidativo. Así por ejemplo Panagiotakos y colaboradores (2004) sobre una cohorte de 2282 sujetos del estudio ATTICA, observaron que aquellos individuos que presentaban mayor adherencia al patrón Mediterráneo tenían menores concentraciones periféricas de partículas LDL-ox en comparación con los individuos que seguían un dieta occidentalizada ($p=0.002$). Tras realizar un análisis multivariado, los autores demostraron que un aumento en 10 puntos del cuestionario que evaluaba la adherencia a la DMed se asociaba a una reducción de 22 mg/dL en las concentraciones de LDL-ox (95% CI: 8-36; $p=0,04$), tras controlar por las variables edad, sexo, IMC, hábito de fumar, escolaridad y actividad física (Panagiotakos DB, *et al.* 2004). En otro estudio prospectivo que determinó la

capacidad antioxidante total de 3042 voluntarios que no padecían ECV del estudio ATTICA, Pitsavos y colaboradores (2005) observaron que aquellos individuos ubicados en el cuartil superior de adherencia a la DMed o que consumían mayor cantidad de aceite de oliva, de frutas y verduras, presentaban una mayor capacidad antioxidante plasmática y menores concentraciones de LDL-ox circulantes (Pitsavos C, *et al.* 2005). Un año más tarde, este mismo grupo de investigadores publicaron los resultados de otro estudio realizado sobre 574 individuos del estudio ATTICA con el objetivo de identificar la posible interacción gen-dieta en relación a la adherencia a la DMed y la presencia de la mutación de la enzima metiltetrahidrofolato reductasa (C677TMTHFR), enzima estrechamente relacionada con el riesgo coronario. Al finalizar el estudio, los autores observaron que la mayor adherencia a la DMed se asociaba con menores concentraciones de LDL-ox sólo en aquellos individuos portadores del alelo T (TT y CT), pero no en los individuos homocigóticos (CC) (Dedoussis GV, *et al.* 2004). Estos resultados sugieren que la interacción dieta-gen observada para las concentraciones de las LDL-ox podría explicar en parte, el efecto beneficioso de la DMed en individuos con estrés oxidativo. Para finalizar, Dai y colaboradores (2008) al analizar la relación entre DMed y estrés oxidativo sobre una muestra de gemelos mono y dicigotos vietnamitas, observaron que el aumento de un punto en el cuestionario de adherencia a la DMed se asociaba con el aumento de un 7% en el cociente GSH/GSSG, lo que sugiere que el consumo de un patrón dietético Mediterráneo disminuye el estrés oxidativo sin observarse diferencias entre ambos tipos de gemelos. Ello sugiere que los beneficios observados sobre el estrés oxidativo por la mayor adherencia a la DMed, son independientes de factores genéticos o medioambientales (Dai J, *et al.* 2008).

El primer estudio de intervención controlado y aleatorizado que demostró un efecto positivo del consumo de una DMed sobre la oxidación fue realizado por López-Miranda y colaboradores (2000) sobre 41 estudiantes españoles sanos. Mediante un diseño cruzado se comparó el efecto del consumo de 3 dietas isocalóricas sobre la peroxidación lipídica. Después que los participantes consumieron las dietas (una enriquecida con grasa saturada, otra alta en hidratos de carbono y una DMed rica en AGMI) durante 4 semanas, los autores observaron que el consumo de la DMed aumentó significativamente la resistencia de las partículas LDL a la oxidación, en comparación al consumo de las otras dos dietas (Lopez-Miranda J, *et al.* 2000). Resultados similares fueron obtenidos por Leighton y colaboradores (1999) en adultos sanos, al

comparar los niveles de estrés oxidativo tras el consumo durante 3 meses de una DMed o una dieta alta en grasas, ambas suplementadas con vino tinto. Los autores identificaron previo al consumo de vino tinto, una reducción en las concentraciones plasmáticas de vitamina C y un aumento del daño oxidativo sobre el ADN de los leucocitos en los individuos que consumieron la dieta rica en grasas en comparación a los individuos que consumieron la DMed. Estos resultados sugieren que el reemplazo de ácidos grasas saturadas (AGS) por hidratos de carbono complejos y cantidades elevadas de antioxidantes mejora el daño oxidativo al ADN, lo que podría ayudar a explicar la baja prevalencia de algunos tipos de cáncer o de mortalidad cardiovascular en pacientes adheridos a una DMed (Leighton F, *et al.* 1999). Sin embargo, resultados contradictorios fueron observados por Ambring y colaboradores en 2004 mediante otro estudio clínico, aleatorizado, controlado y de diseño cruzado. Los autores compararon el efecto del consumo de una DMed con el de una dieta típica sueca sobre diversos parámetros oxidativos, en un grupo de mujeres sanas. Después de 4 semanas de intervención, no se observaron diferencias significativas sobre los diferentes marcadores de estrés oxidativo evaluados tras el consumo de ambas dietas (Ambring A, *et al.* 2004).

Entre los diversos estudios de intervención que han evaluado los efectos del consumo de una DMed destaca por el grado de evidencia científica, el estudio "*Prevención con dieta Mediterránea*" (PREDIMED), un estudio multicéntrico, prospectivo, aleatorizado, controlado y de diseño en paralelo. El estudio PREDIMED tiene como objetivo principal evaluar en población anciana de alto riesgo cardiovascular, el efecto que produce el consumo de una DMed sobre la prevención primaria de ECV. Con respecto al estrés oxidativo, Fitó y colaboradores (2007) observaron que tras 3 meses de intervención en una submuestra de 372 voluntarios del estudio PREDIMED, los pacientes asignados a seguir las recomendaciones dietéticas de dos tipos de DMed (una suplementada con aceite de oliva y la otra suplementada con frutos secos) disminuyeron significativamente las concentraciones plasmáticas de LDL-ox y del MDA en las células mononucleares, en comparación al grupo control que siguieron recomendaciones dietéticas de una dieta baja en grasa (Fitó M, *et al.* 2007).

En resumen, los resultados de estos estudios sugieren que el consumo de un patrón dietético Mediterráneo aumenta la capacidad antioxidante y tiene efectos beneficiosos sobre los procesos de oxidación lipídica y sobre el daño oxidativo al ADN.

3.4.3. Patrón dietético occidentalizado y estrés oxidativo

La dieta "occidentalizada" consumida en su mayoría por la población que convive en sociedades industrializadas, se caracteriza especialmente por el elevado consumo de AGS y grasas trans (Moreno JA, *et al.* 2008). Diversos tipos de estudios han mostrado una clara asociación entre el consumo de alimentos con un alto contenido de grasa saturada y el aumento de triglicéridos, estrés oxidativo, procesos inflamatorios de bajo grado, presencia de disfunción endotelial, vasoconstricción y aumento de la presión arterial sistólica (Jakulj F, *et al.* 2007, Blum S, *et al.* 2006). Además, existe suficiente evidencia epidemiológica que relaciona el consumo de dietas ricas en AGS con el aumento de las concentraciones plasmáticas de c-LDL, situación que favorece la aparición y desarrollo de enfermedad coronaria (Moreno JA, *et al.* 2008) y que a la vez contribuye al incremento en la oxidación de las partículas de LDL-ox.

4. Frutos secos

Desde tiempos remotos los frutos secos han formado parte de la alimentación humana. Durante el proceso evolutivo del género *Homo*, la dieta omnívora se ha ido adaptando a los cambios climáticos y de latitud en que éstos se desarrollaban. La alimentación de nuestros antepasados primates fue especialmente frugívora. Cuando la cacería y la pesca se convirtieron en actividad habitual de las especies de *Homo*, las plantas silvestres fueron consumidas como un complemento alimentario. Debido a los cambios estacionales, el consumo de vegetales especialmente raíces y bulbos, abundantes en espacios abiertos, se combinaron con el consumo de fruta y frutos secos de las zonas boscosas, especialmente a partir de las nueces. Una vez iniciada la domesticación de las plantas, con la aparición de la agricultura, la producción y consumo de algunos alimentos se sistematizó, lo que también involucró la producción agrícola de frutos secos (Carbonell i Roura E, *et al.* 2005).

4.1. Definición de los frutos secos

Los frutos secos son una semilla cuya pared del ovario endurece al madurar y de cáscara lignificada (Ros E. 2008). Según el Código Alimentario Español, texto legal de referencia a nivel alimentario de este país, las frutas secas o de cáscara son aquellas frutas cuya parte

comestible posee en su composición nutricional menos del 50% de agua del peso total. En esta definición se incluyen las almendras (*Prunus amygdalus*), las avellanas (*Corylus avellana*), las nueces (*Juglans regia*), las nueces de Málaga (*Carya olivaeformis*) y las castañas (*Castanea vesca*), a pesar de que esas últimas contienen alrededor del 50% de humedad, valor mucho más elevado en comparación con los otros frutos secos que contienen entre 2 a 6% de agua de su peso total (Deleuze IP. 2006.). El Código Alimentario Español no menciona a los cacahuetes (*Arachis hypogea* L.) ya que botánicamente son leguminosas, y por ello aparecen en el capítulo de legumbres secas. Sin embargo, debido al importante contenido de lípidos de los pistachos (*Pinus pinea*) y de los cacahuetes, aparecen también dentro del apartado de frutas o semillas oleaginosas (Deleuze IP. 2006.). Aunque el Código Alimentario Español no incluye dentro del grupo de los frutos secos a las nueces de Brasil (*Bertholletia excelsa*), las nueces de Macadamia (*Macadamia ternifolia* var. *integrifolia*), los anacardos (*Anacardium occidentale* L.) y las nueces pacana (*Carya illinoensis*), en esta tesis los consideraremos frutos secos por su composición similar al resto de los incluidos en el Código Alimentario.

4.2. Composición nutrimental de los frutos secos

4.2.1. Contenido nutricional y densidad energética

Los frutos secos son un grupo de alimentos que contienen una compleja matriz de nutrientes y otros componentes bioactivos, los cuales podrían contribuir a la reducción de las enfermedades crónicas como la enfermedad coronaria (Hu FB, *et al.* 1999, Sabate J, *et al.* 2001), la diabetes (Jiang R, *et al.* 2002), o el cáncer (Mills PK, *et al.* 1989, Jain MG, *et al.* 1999). La composición nutritiva es el rasgo más destacable de los frutos secos, debido principalmente a su elevado contenido de ácidos grasos, los cuales en promedio representan más del 50% del peso total del alimento (Tabla 1.2.). Su escasa humedad y su gran concentración de lípidos convierte a los frutos secos en alimentos de alto densidad energética, ya que aportan desde 571 kcal (pistachos) hasta 718 kcal (nueces de Macadamia) por cada 100 g de alimento, lo que representa entre 143 kcal y 215 kcal en una ración de 25 a 30 g.

Tabla 1.2. Contenido de macronutrientes en los frutos secos crudos y tostados (g/100 g).

Frutos secos	Crudos			Tostados*		
	Proteínas	Hidratos de carbono	Grasa	Proteínas	Hidratos de carbono	Grasa
Almendras	21,22	21,67	49,42	22,09	19,29	52,83
Anacardos	18,22	30,19	43,85	15,31	32,69	46,35
Avellanas	14,95	16,70	60,75	15,03	17,60	62,40
Cacahuetes	25,80	16,13	49,24	23,68	21,51	49,66
Nueces	15,23	13,71	65,21	ND	ND	ND
Nueces de Brasil	14,32	12,27	66,43	ND	ND	ND
Nueces de Macadamia	7,91	13,82	75,77	7,79	13,38	76,08
Pacanas	9,17	13,86	71,97	9,50	13,55	74,27
Piñones	13,69	13,08	68,37	ND	ND	ND
Pistachos	20,27	27,51	45,39	21,35	27,65	45,97

*Tostados, sin aceite ni sal. ND, no hay datos.
 Fuente: USDA, 2009.

4.2.1.1. Lípidos. Los frutos secos se distinguen por su perfil lipídico beneficioso, ya que la mayoría contienen concentraciones reducidas de AGS (<7 g/100 g de alimento) y una proporción elevada de ácidos grasos insaturados, principalmente de AGMI, a excepción de las nueces que contienen una importante cantidad de AGPI (Tabla 1.3.). La cantidad de grasas monoinsaturadas que contienen los frutos secos se sitúa entre los 9 g/100 g en el caso de las nueces, hasta los 46/100 g y 59 g/100 g de alimento en el caso de las avellanas y las nueces de Macadamia. Las nueces de Brasil, los cacahuetes y los pistachos, contienen cantidades algo inferiores de AGMI (alrededor del 24% de su grasa total). En relación a los AGPI como se ha mencionado, abundan sobretodo en las nueces (47% de su grasa total). Los piñones, pacanas y nueces de Brasil contienen cantidades moderadas de AGPI (34,1%, 21,6% y 20,5%, respectivamente) (USDA, 2009). Dentro de las grasas poliinsaturadas, los frutos secos destacan principalmente por el contenido en ácido linoleico (C18:2, n-6) con cantidades del orden del 10% al 28% de su peso. Aunque en menor proporción, los frutos secos también contienen ácido linolénico (C18:3, n-3), especialmente las nueces ya que 14% de su grasa se encuentra en forma de éste ácido graso. El resto de los frutos secos contienen concentraciones de ácido graso linolénico mucho más bajas, oscilando entre el 0,02% y el 1,37% del contenido graso total (USDA, 2009).

Tabla 1.3. Contenido de grasa total y ácidos grasos en los frutos secos crudos (g/100 g).

Frutos secos	Grasa total	AGS	AGMI	18:1 n-9	AGPI	18:2 n-6	18:3 n-3
Almendras	49,42	3,73	30,89	30,61	12,07	12,06	0,01
Anacardos	43,85	7,78	23,80	23,52	7,85	7,78	0,06
Avellanas	60,75	4,46	45,65	45,41	7,92	7,83	0,09
Cacahuetes	49,24	6,83	24,43	23,76	15,56	15,56	0,00
Nueces	65,21	6,13	8,93	8,80	47,17	38,09	9,08
Nueces de Brasil	66,43	15,14	24,55	24,22	20,58	20,54	0,04
Nueces de Macadamia	75,77	12,06	58,88	43,76	1,50	1,30	0,21
Pacanas	71,97	6,18	40,80	40,59	21,61	20,63	0,99
Piñones	68,37	4,90	18,76	17,95	34,07	33,15	0,16
Pistachos	45,39	5,56	23,82	23,17	13,74	13,49	0,26

AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; 18:1 n-9, ácido oleico; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados; 18:2 n-6, ácido linoleico; 18:2 n-3, ácido linolénico.

Fuente: USDA, 2009.

Se sugiere que el importante contenido de ácidos grasos insaturados de los frutos secos ejerce un papel modulador del perfil lipídico, ya que promueve la disminución de las concentraciones plasmáticas de colesterol total y de c-LDL, sin mostrar resultados consistentes en las concentraciones de triglicéridos o del c-HDL (Banel DK, *et al.* 2009). Sin embargo, como hemos mencionado en el párrafo anterior, el contenido de AGPI de los frutos secos los convierte en alimentos altamente susceptibles de oxidarse, característica que podría contribuir a aumentar el riesgo de oxidación de las partículas LDL (Mataix J y Ros E, 2005). Se debe resaltar que los frutos secos contienen vitaminas y compuestos con características antioxidantes importantes y que contienen además fitoesteroles y algunos minerales que podrían contrarrestar el efecto prooxidante de los frutos secos (Blomhoff R, *et al.* 2006), lo que contribuiría a la protección de las LDL contra la oxidación y con ello, a la disminución del riesgo cardiovascular.

4.2.1.2. Proteínas. Otro rasgo característico de los frutos secos es su elevado contenido proteico, aunque el valor biológico de las proteínas de los frutos secos es bajo en comparación a otras proteínas de origen animal (Suarez Lopez MM, *et al.* 2006). Las nueces de Macadamia contienen alrededor de un 8% de proteínas referido al peso total, mientras que los cacahuetes contienen alrededor del 26%. Cabe resaltar que los frutos secos son ricos en arginina (2 g/100

g de alimento en promedio) y pobres en lisina (USDA, 2009), relación beneficiosa que podría contribuir en parte, a la disminución del riesgo aterogénico observado por el consumo de frutos secos. Debido a que la arginina es un precursor del óxido nítrico, potente efecto vasodilatador exógeno, el consumo de frutos secos ha sido asociado a la relajación del músculo liso vascular (Coates AM, *et al.* 2007). Se ha visto además, que la arginina tiene la habilidad de inhibir la agregación plaquetaria, la adherencia de los monocitos y la proliferación celular del músculo liso vascular, procesos también potencialmente aterogénicos (Huynh NN, *et al.* 2006).

4.2.1.3. Hidratos de carbono y fibra dietética. En general, el contenido en hidratos de carbono de los frutos secos es reducido. El contenido en este macronutriente oscila entre el 12% del peso en el caso de las nueces de Brasil y el 33% en el caso de los anacardos (USDA, 2009). Los frutos secos, contienen una proporción considerable de fibra dietética, siendo las almendras con 13 g de fibra por 100 g de alimento los que presentan la mayor cantidad. La mayoría de los frutos secos contienen entre 6 y 11 g de fibra total (nuez, nuez de Brasil, nuez de Macadamia, avellana y pistacho, cacahuetes, pacanas y pistachos (Souci SW, *et al.* 2000, Lintas C, *et al.* 1992). Así pues, una ración de 25 g a 30 g de frutos secos podría proporcionar entre 3 y 4 g de fibra dietética, cantidad que contribuye en promedio al 13% de la ingesta media recomendada de fibra (30 a 35 g/día). En la tabla 1.4. se observa que la cantidad de fibra soluble de los frutos secos oscila entre 0,2 y 1,4 g/100 g de alimento, aunque la mayor parte de la fibra de los frutos secos es de tipo insoluble (5,3 a 12,0 g/100 g).

Tabla 1.4. Contenido de fibra en los frutos secos (g/100 g).

Frutos secos	Lintas y Cappelloni (1992)			Souci et al. (2000)		
	Insoluble	Soluble	Total	Insoluble	Soluble	Total
Almendras	14,4	0,8	15,2	12,0	1,1	13,1
Avellanas	7,8	0,4	8,2	7,8	0,4	8,2
Cacahuetes	9,9	1,0	10,9	ND	ND	ND
Nueces	5,3	0,8	6,1	5,3	0,8	6,1
Nueces de Brasil	ND	ND	ND	5,3	1,4	6,7
Nueces de Macadamia	15,8	0,1	15,9	11,0	0,2	11,2
Pacanas	9,1	0,4	9,4	ND	ND	ND
Piñones	3,8	0,8	4,5	ND	ND	ND
Pistachos	10,3	0,3	10,6	10,0	0,3	10,3

ND, no hay datos.

Fuente: Souci SW, *et al.* 2000, Lintas C, *et al.* 1992

El notable contenido de fibra dietética añade un significado especial a estos alimentos. La fibra dietética protege contra el desarrollo de enfermedad coronaria y DM2, ya que mejora la sensibilidad a la insulina (Chandalia M, *et al.* 2000). También se ha visto que la fibra dietética es capaz de reducir la velocidad de absorción de diferentes elementos nutritivos, como el colesterol. Su fermentación a nivel del colon produce ácidos grasos de cadena corta, los cuales inhiben la síntesis de colesterol endógeno. La fibra dietética también actúa secuestrando ácidos biliares a nivel intestinal, promoviendo su excreción, lo que favorece la reducción de los niveles plasmáticos de colesterol. Además se sugiere que la fibra contenida en los frutos secos produce un efecto saciante, mecanismo por el que se podría explicar en parte, el menor IMC observado en individuos con importante consumo de frutos secos en algunos de los estudios epidemiológicos realizados (Salas-Salvado J, *et al.* 2006).

4.2.1.4. Vitaminas. Los frutos secos presentan un perfil vitamínico y mineral interesante para la prevención de enfermedades cardiovasculares. El contenido de lípidos en los frutos secos es importante ya que favorece la absorción de las vitaminas liposolubles, lo que aumenta la biodisponibilidad de estas vitaminas.

Los frutos secos en general destacan por su contenido en vitamina E, ya que contienen cantidades importantes de α -tocoferol y γ -tocoferol y reducido contenido de δ -tocoferol (a excepción de pistachos y nueces) (Tabla 1.5.). Por ejemplo en las almendras y las avellanas, el contenido de vitamina E varía entre 26 y 15 mg respectivamente, de equivalentes α -tocoferol/100 g. El resto de los frutos secos contienen en promedio entre 0,62 mg (nueces y nueces de Macadamia) y 8,3 mg (cacahuetes) de equivalentes α -tocoferol/100 g. Las nueces, los pistachos y los piñones contienen importantes cantidades de γ -tocoferol, mientras que ningún otro fruto seco destaca por el contenido de β -tocoferol o de δ -tocoferol.

Otros compuestos vitamínicos destacables de los frutos secos son los folatos. El ácido fólico es una vitamina del grupo B que contribuye al adecuado funcionamiento celular y que está involucrado en los procesos de detoxificación de la homocisteína, cuya presencia plasmática se relaciona con un aumento del riesgo de aterosclerosis, sobretudo en presencia de concentraciones reducidas de ácido fólico (Welch GN, *et al.* 1998).

Tabla 1.5. Contenido promedio de vitamina E en los frutos secos (mg/100 g).

Frutos secos	α -tocoferol	γ -tocoferol	δ - tocoferol †
Almendras	25,9	0,9	ND
Anacardos	0,9	ND	0,3
Avellanas	15,0	ND	0,1
Cacahuetes *	8,33	ND	1,8
Nueces	0,7	20,8	3,8
Nueces de Brasil	5,7	7,9	ND
Nueces de Macadamia	0,6	ND	ND
Pacanas	4,1	8,1	0,2
Piñones	9,3	11,2	0,3
Pistachos	1,9	22,5	0,5

ND, No hay datos.

Fuente: Bolling BW, et al. 2010; †Kornsteiner M, et al. 2006; *USDA. 2009.

El contenido de folatos en los frutos secos es variable, pero en general se sitúa entre los 20 y los 53 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de alimento. Las nueces, las avellanas y los cacahuets son los frutos secos que destacan por el mayor contenido de folatos totales con valores en $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de alimento de 98, 113 y 240, (USDA, 2009) respectivamente. Los frutos secos también aportan cantidades considerables de tiamina, niacina y riboflavina (Tabla 1.6.). El contenido en vitamina C, vitamina B6 y ácido pantoténico de los frutos secos es en general bajo.

Tabla 1.6. Contenido de diferentes vitaminas en los frutos secos.

Frutos secos	Folatos totales	Tiamina	Niacina	Riboflavina
	$\mu\text{g}/100\text{ g}$	$\text{mg}/100\text{ g}$	$\text{mg}/100\text{ g}$	$\text{mg}/100\text{ g}$
Almendras	50	0,211	3,385	1,014
Anacardos	25	0,423	1,062	0,058
Avellanas	113	0,643	1,800	0,113
Cacahuets	240	0,640	12,066	0,135
Nueces	98	0,341	1,125	0,150
Nueces de Brasil	22	0,617	0,295	0,035
Nueces de Macadamia	11	1,195	2,473	0,162
Pacanas	22	0,660	1,167	0,130
Piñones	58	1,243	4,370	0,223
Pistachos	51	0,870	1,300	0,160

Fuente: USDA, 2009

4.2.1.5. Minerales. Los frutos secos tienen un importante contenido en calcio, magnesio y potasio, mientras que el contenido en sodio es muy bajo (a no ser que sean salados), lo que podría convertir a este grupo de alimentos en protectores frente a la desmineralización ósea, la hipertensión arterial, la resistencia a la insulina y otros factores de riesgo cardiovascular (Bullo M, *et al.* 2009). En relación al calcio, las almendras se distinguen por que contienen 264 mg/100 g de alimento, seguidas por las nueces de Brasil, las avellanas, los pistachos y las nueces con cantidades que varían entre 160 y 98 mg/100 g de alimento. El resto de los frutos secos contienen cantidades mucho más bajas (entre 45 y 70 mg/100 g), mientras que los piñones contienen sólo 16 mg/100 g de alimento (USDA, 2009). Así pues, los frutos secos podrían contribuir de forma importante a satisfacer las necesidades de calcio. Los frutos secos son también una fuente importante de magnesio ya que en promedio contienen de 144 a 297 mg/100g de alimento (USDA, 2009). El magnesio contribuye a mantener la homeostasis intracelular y a disminuir la resistencia a la insulina a través de la reducción de la producción de diversos marcadores inflamatorios. Esta mejoría de la inflamación podría contribuir a la reducción de la incidencia de DM2 y del síndrome metabólico observada en algunos estudios y cuyos efectos se asocian al consumo de frutos secos (revisado por Ros E, 2009). Con respecto al contenido de fósforo, los frutos secos contienen entre 198 y 502 mg/100g de alimento, mientras que de potasio entre 454 y 739 mg/100g de alimento (USDA, 2009).

Tabla 1.7. Contenido en calcio, magnesio, sodio y potasio en los frutos secos (mg/100 g).

Frutos secos	Calcio	Magnesio	Sodio	Potasio
Almendras	264	268	1	705
Anacardos	37	292	12	660
Avellanas	114	163	0	680
Cacahuetes	92	168	18	705
Nueces	98	158	2	441
Nueces de Brasil	160	376	3	659
Nueces de Macadamia	85	130	5	368
Pacanas	70	121	0	410
Piñones	16	251	2	597
Pistachos	105	121	1	1025

Fuente: USDA, 2009.

El contenido de hierro de los frutos secos es considerable. Contienen cantidades que varían entre 2,4 mg/100 g en el caso de las nueces de Brasil hasta los 7 mg/100g de alimento en el caso de los anacardos (USDA, 2009). Sin embargo, debido a que la absorción del hierro en los vegetales es mínima (hierro no hemo), la biodisponibilidad de este micronutriente se encuentra reducida. Además, los frutos secos también son fuente importante de cobre, manganeso y zinc. Con excepción de las nueces de Brasil con cantidades importantes de selenio, en general los frutos secos contienen niveles muy bajos de este mineral, componente crítico de la actividad antioxidante de las selenoproteínas (USDA, 2009).

4.3. Composición fitoquímica de los frutos secos

Los frutos secos también contienen otros componentes con funciones biológicas interesantes además de las ya mencionadas en los párrafos anteriores, como por ejemplo los fitoesteroles y otros componentes fitoquímicos con actividad antioxidante.

4.3.1. Fitoesteroles.

Los fitoesteroles son compuestos de origen vegetal que inhiben la absorción del colesterol de la dieta, ya que reducen la solubilidad micelar del colesterol en el lumen intestinal, lo que favorece la disminución de las concentraciones séricas de colesterol (Chen CY, *et al.* 2008).

En la tabla 1.8. se muestran los diversos tipos de fitoesteroles de los frutos secos, cuyo contenido se sitúa entre los 95 mg/100 g de alimento en las nueces de Brasil y los 279 mg/100 g de alimento en los pistachos, con un promedio de 167 mg/100 g (Phillips KM, *et al.* 2005). El β -sitoesterol, es el fitoesterol más abundante en los frutos secos y representa en todos los casos, más del 90% del total de los fitoesteroles.

4.3.2. Carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides con 40 átomos de carbono derivados biosintéticamente a partir de dos unidades de geranil-geranilpirofosfato de coloraciones que oscilan entre el amarillo (β -caroteno) y el rojo (licopeno) y que exhiben una capacidad antioxidante importante. Los carotenoides incluyen alrededor de 600 pigmentos sintetizados por vegetales, algas y bacterias fotosintéticas. Se clasifican en dos grupos: los carotenos (α -

caroteno, β -caroteno y licopenos) y las xantofilas (β -criptoxantina, luteína y zeaxantina) (Knight JA. 2000). Los frutos secos son una fuente modesta de carotenoides, ya que las concentraciones de β -caroteno y luteína se ubican para los pistachos, entre los 0,21 y 2,3 mg/100 g de peso seco, respectivamente (Kornsteiner M, *et al.* 2006).

Tabla 1.8. Contenido de fitoesteroles en frutos secos crudos (mg/100 g).

Frutos secos	β -sito esterol	Campesterol	Stigma esterol	Δ^5 -Avena-esterol	Otros	Esteroles totales
Almendras	143,4	4,9	5,0	19,7	19,6	199
Anacardos	112,6	8,9	<1,2	13,7	13,3	150
Avellanas	102,2	6,6	<2,5	2,6	2,5	121
Cacahuetes	76,8	13,2	12,1	17,8	15	137
Nueces	88,9	4,9	ND	7,3	9,1	113
Nueces de Brasil	65,5	2,0	6,2	13,6	3,4	95
Nueces de Macadamia	143,7	9,6	ND	13,3	17,0	187
Pacanas	116,5	5,9	2,6	14,6	14,1	157
Piñones	132,0	19,8	<1,7	40,3	34,2	236
Pistachos	209,8	10,1	2,3	26,2	24,6	279

ND, No hay datos.

Fuente: Phillips KM, *et al.* 2005.

4.3.3. Polifenoles

Se trata de un grupo de compuestos químicos que presentan uno o más grupos hidroxil (-OH) unidos directamente a un anillo aromático. Los mecanismos por los que se podría explicar la asociación beneficiosa entre el consumo de polifenoles de la dieta y la reducción del riesgo de enfermedades crónicas, incluyen la antioxidación, la antiinflamación, la detoxificación carcinogénica y la reducción del colesterol (Bolling BW, *et al.* 2010). Los polifenoles identificados hasta la actualidad en la mayoría de frutos secos comprenden las antocianinas, los flavonoides, los lignanos, las naftoquinonas, los ácidos fenólicos, las proantocianidinas, los estilbenos y los taninos hidrolizables. Sin embargo, algunos autores sugieren que el perfil fenólico y la cantidad de polifenoles en los frutos secos podrían variar en función del fruto seco, del sistema de cultivo, del período de la cosecha, la localización de la huerta, el tratamiento post-cosecha y el almacenamiento del fruto seco (Bolling BW, *et al.* 2010).

4.3.3.1. Contenido total de fenoles. La reacción Folin-Ciocalteu, es el método más utilizado para determinar el contenido total de fenoles en las plantas comestibles. En la figura 1.5. se observa que los frutos secos con la mayor cantidad de fenoles totales son las nueces pacana, las nueces y los pistachos, cuyos niveles varían entre 103 y 1650 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) /100 g de alimento (Kornsteiner M, *et al.* 2006, Wu X, *et al.* 2004).

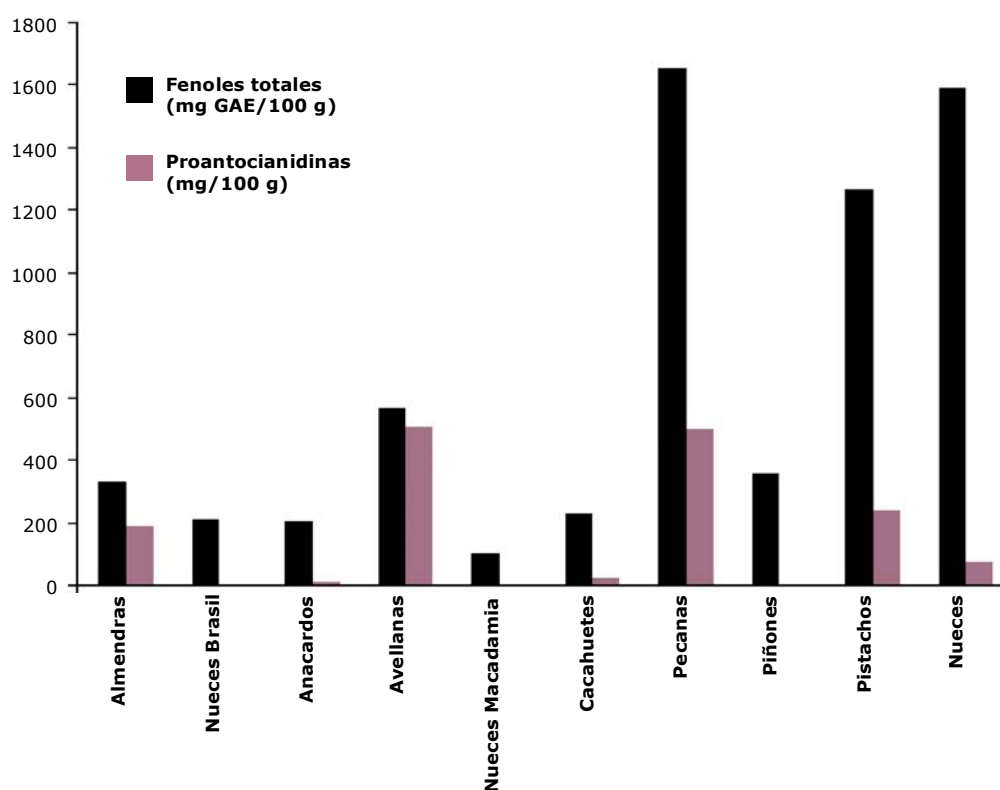


Figura 1.5. Contenido de fenoles totales y proantocianidinas en los frutos secos.

Fuente: Bolling BW, *et al.* 2010.

El contenido promedio que exhiben los frutos secos es comparable a los alimentos que contienen una alta proporción de fenoles, como por ejemplo los arándanos (531 mg GAE /100 mg), las ciruelas (367 mg GAE /100 g) o las uvas pasas (1065 mg GAE /100 g) (USDA, 2007b). Es importante señalar que la mayoría de los compuestos fenólicos de los frutos secos se localizan en la parte externa, es decir en la piel que los recubre, por lo que la eliminación de esta piel provocaría la pérdida de una cantidad importante de su capacidad antioxidante (Blomhoff R, *et al.* 2006).

4.3.3.2. Flavonoides. Los flavonoides son moléculas de bajo peso molecular sintetizados por las plantas en forma de pigmentos y que se agrupan en una familia de compuestos polifenólicos, de los que se han identificado más de 5000 flavonoides diferentes (Ross JA, *et al.* 2002). Con excepción de las nueces de Macadamia y las nueces de Brasil, los frutos secos contienen cantidades importantes de flavonoides, como las nueces pacana con 34,01 mg/100 g de alimento, seguido de concentraciones en (mg/100 g) de 15,24 en almendras, de 14,37 en pistachos, de 11,96 en avellanas, de 2,71 en nueces, de 1,98 en anacardos, de 0,66 en cacahuets y 0,49 en el caso de los piñones. Los principales tipos de flavonoides identificados en los frutos secos son: las flavan-3-oles, los flavonoles y las antocianinas, y en menor cantidad, las flavanonas e isoflavonas, tal y como se muestra en la tabla 1.9. Los pistachos son el fruto seco con mayor contenido de isoflavonas, 3,63 mg/100g de alimento, lo que representa más de 100 veces el contenido de otros frutos secos (USDA, 2007a). Las proantocianidinas o taninos condensables existen como oligómeros solubles con 2 o 6 núcleos fenólicos flavan-3-ol (catequina, epicatequina, epigalocatequina o epigalocatequina 3-O-galato) o en forma de polímeros insolubles. Las proantocianidinas de los frutos secos incluyen principalmente catequinas y epicatequinas, aunque también podemos encontrar la afzelequina (almendras y cacahuets) y la epigalocatequina (almendras, nueces pacana, pistachos). Las proantocianidinas son el polifenol que predomina en almendras, avellanas, cacahuets, pacanas y pistachos. De hecho, las avellanas y las pacanas son los frutos secos con mayor cantidad de proantocinidinas con 501 y 494 mg/100 g respectivamente, mientras que para las nueces de Brasil, las nueces de Macadamia o los piñones no se ha reportado el contenido de este tipo de polifenoles. En relación al procesamiento de los frutos secos y el contenido de proantocianidinas, se sugiere que el tostado reduce su cantidad. En especial, se ha visto que en los pistachos el contenido en proantocianidinas disminuye espectacularmente después de tostarlos (Bolling BW, *et al.* 2010).

4.3.3.3. Resveratrol. El resveratrol (3,4',5-tri-hidroxi-estilbeno) pertenece a un tipo de compuestos fenólicos llamados estilbenos (Bolling BW, *et al.* 2010). Algunas plantas producen resveratrol y otros estilbenos como respuesta al estrés fisiológico, a una infección provocada por hongos o la radiación ultravioleta. La cantidad de resveratrol contenida en los pistachos es comparable con la de los cacahuets, con 84 y 115 µg/100 mL, respectivamente (Tokusoglu O, *et al.* 2005). Recientes evidencias científicas sugieren que el resveratrol podría contribuir a la

neuroprotección, a la regulación del sistema inmune y a la quimioprevención en contra del cáncer (Pervaiz S, *et al.* 2009).

Tabla 1.9. Contenido de flavonoides en los frutos secos (mg/100 g).

Frutos secos	Flavan-3-oles	Flavanonas	Flavonoles	Antocianinas	Iso-flavonas	Total
Almendras	4,47	0,38	7,93	2,46	0,01	15,25
Anacardos	1,98	ND	ND	ND	0,01	1,99
Avellanas	5,25	ND	ND	6,71	0,03	11,99
Cacahuetes	0,66	ND	ND	ND	0,26	0,68
Nueces	ND	ND	ND	2,71	0,03	2,74
Nueces de Brasil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nueces de Macadamia	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pacanas	15,99	ND	ND	18,02	ND	34,01
Piñones	0,49	ND	ND	ND	ND	0,49
Pistachos	6,85	ND	1,46	6,06	3,63	18,00

ND, No hay datos.
 Fuente: USDA, 2009

4.3.3.4. Otros compuestos fenólicos. Los frutos secos contienen otros tipos de componentes fenólicos relacionados con la salud. Por ejemplo, se ha determinado que las almendras contienen ácidos fenólicos (Milbury PE, *et al.* 2006) pero se desconoce la cantidad y el perfil de los ácidos fenólicos contenidos en estos frutos secos. Las nueces contienen ácido síringico (34 mg/100 g) y naftoquinona juglona (12 mg/100 g) (Colaric M, *et al.* 2005)). Para el caso de las elagitaninos, las nueces, las avellanas y los anacardos contienen una cantidad considerable de estos componentes (Clifford MN, *et al.* 2000). Además, los frutos secos también contienen lignanos, fitoquímicos relacionados con actividades fitoestrógenicas. Entre los distintos tipos de frutos secos, destacan los pistachos por su mayor cantidad de lignanos que contienen alrededor de 0,2 mg/100 g de alimento (Thompson LU, *et al.* 2006).

4.3.4. Melatonina

La melatonina o el N-acetil-5-metoxitriptamina, es una hormona ampliamente distribuida en el reino animal y en algunos alimentos de origen vegetal. Esta hormona desempeña un papel

antioxidante y está presente en las nueces con una concentración de 3,5 ng/g de alimento (Reiter RJ, *et al.* 2005).

4.4. Capacidad antioxidante de los frutos secos

La capacidad antioxidante de los frutos secos ha sido evaluada *in vitro* mediante distintos métodos, como el ensayo *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, para la fracción lipofílica y la fracción hidrofílica (ORAC, ORAC-L y ORAC-H), el ensayo *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), el ensayo *Total Radical-trapping Antioxidant Parameter* (TRAP) y el ensayo *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC). En la tabla 1.10. se presentan los resultados de los estudios que han determinado la capacidad antioxidante de diversos frutos secos.

Tabla 1.10. Capacidad antioxidante total de los frutos secos.

Frutos secos	ORAC (L+H) *	FRAP ‡	TRAP ‡	TEAC ‡
	µmol TE/g	µmol Fe ²⁺ /g	µmol TE/g	µmol TE/g
Almendras	44,5	41,3	6,3	13,4
Anacardos	20,0	-	-	-
Avellanas	96,5	42,3	6,9	12,0
Cacahuetes	31,7	15,5	3,3	4,8
Nueces	135,4	453,9	31,9	137,0
Nueces de Brasil	14,2	-	-	-
Nueces de Macadamia	17,0	-	-	-
Pacanas	179,4	-	-	-
Piñones	7,2	13,4	1,5	5,3
Pistachos	79,8	192,7	25,9	61,5

Fuente: * Wu X, *et al.* 2004; ‡ Pellegrini N, *et al.* 2006.

4.5. Biodisponibilidad y metabolismo de los componentes polifenólicos contenidos en los frutos secos

En la actualidad, poco se sabe de la biodisponibilidad de las sustancias antioxidantes de los frutos secos, ya que se desconoce con certeza su absorción y metabolización tras su consumo. El número de estudios publicados que han evaluado la biodisponibilidad en los frutos secos es escaso y limitado. De hecho, sólo un estudio ha investigado la biodisponibilidad de los polifenoles contenidos en los frutos secos en el plasma de hámsteres, tras la ingestión de un

extracto de piel de almendras (Chen CY, *et al.* 2005). Además, dos estudios analizaron la bioaccesibilidad de diversos componentes nutritivos y no nutritivos contenidos en las almendras durante la digestión, la cual fue monitoreada tras el consumo de las almendras, lo que podría incidir sobre la biodisponibilidad y absorción de los componentes de los frutos secos (Mandalari G, *et al.* 2008, Ellis PR, *et al.* 2004).

Recientemente dos estudios evaluaron la biodisponibilidad de un extracto de la piel de almendras en sujetos sanos (Urpi-Sarda M, *et al.* 2009, Bartolome B, *et al.* 2010). Mediante un estudio piloto con dos voluntarios sanos, Urpi-Sarda y colaboradores (2009) investigaron la biodisponibilidad de los polifenoles de la almendra después del consumo agudo de un extracto obtenido de la piel de este fruto seco. Tras 48 horas de haber consumido una dieta con bajo contenido fenólico y después de 10 a 12 horas de ayuno, ambos sujetos ingirieron 10 cápsulas conteniendo una dosis de 884,4 mg del extracto de polifenoles. Antes y después de la administración del extracto de polifenoles de almendras se extrajeron muestras de sangre y se recolectó orina en diferentes momentos del estudio. Después del consumo del extracto de polifenoles de piel de almendra se identificaron tanto en el plasma como en la orina de ambos sujetos, los metabolitos glucurónido, O-metil glucurónido, sulfato y O-metil sulfato de derivados (epi) catequina, así como los conjugados glucurónido de naringenina y isoramentina, y los conjugados de sulfato de isoramentina, junto con los conjugados de hidroxifenilvalerolactonas. Estos autores identificaron además, numerosos metabolitos microbianos derivados de los flavanoles en sus formas sulfato y glucurónido, lo que confirmó que los monómeros y polímeros de las flavanolas de la piel de las almendras habían sido absorbidos y conjugados en el hígado. Posteriormente, el mismo grupo de investigadores, realizó un estudio clínico, aleatorizado, controlado con placebo y de diseño en paralelo, sobre 16 adultos sanos (Bartolome B, *et al.* 2010). Los autores siguieron el mismo protocolo del estudio piloto previo, para evaluar el efecto del consumo agudo de la misma dosis de extracto de polifenoles de piel de almendra sobre la biodisponibilidad de los polifenoles contenidos. Los resultados de ambos estudios permitieron identificar tanto en plasma como en orina, 22 derivados conjugados del metabolismo de fase II de flavanolas, flavonoles y hidroxifenilvalerolactonas. Además observaron que en comparación a quienes sólo recibieron el placebo, los individuos que consumieron el extracto de piel de almendra presentaron mayores concentraciones de los metabolitos, los cuales pudieron identificarse en distintos momentos

que duró el período de la recolección de orina (24 horas). Por ello, los autores destacaron la relevancia del papel de las bacterias intestinales a nivel del colon, ya que favorecen el metabolismo de los polifenoles altamente polimerizados contenidos en la piel de las almendras (Urpi-Sarda M, *et al.* 2009, Bartolome B, *et al.* 2010).

En relación al metabolismo de los polifenoles de los frutos secos, se destaca en una reciente revisión que, los oligómeros y polímeros de los flavan-3-ols (catequina y epicatequina) y las proantocianidinas son difícilmente absorbidos y degradados a sus formas monoméricas durante el tránsito por el estómago, lo que indica que estos polímeros son estables en el medio gástrico y que llegan al intestino delgado en forma de polímeros (revisado por Bullo M, *et al.* 2010). Estos componentes fenólicos que no se absorben, podrían ejercer su actividad antioxidante en el tracto gastrointestinal sobre los radicales libres generados por la matriz fecal y sobre aquellos radicales libres inducidos por las células del epitelio intestinal. Cuando los polímeros y oligómeros de los fenoles llegan al colon, estos son metabolizados por la microbiota intestinal y convertidos a diferentes tipos de ácidos fenólicos, los cuales podrían ejercer aquí su actividad biológica antioxidante (Urpi-Sarda M, *et al.* 2009, Bartolome B, *et al.* 2010).

Los resultados de estos escasos estudios que analizan la biodisponibilidad y metabolismo de los polifenoles de los frutos secos, muestran la importante implicación del tracto digestivo y de la microbiota intestinal en el metabolismo y la absorción de las moléculas antioxidantes contenidas en los frutos secos. La identificación de distintos metabolitos de las sustancias antioxidantes producidos tras la ingesta de los extractos de piel de almendras, sugieren que la actividad antioxidante ocurre en diferentes niveles del tracto digestivo, lo que podría contribuir en parte, a la reducción del estrés oxidativo que subyace a las enfermedades crónico-degenerativas.

4.6. Estudios que muestran la relación entre el consumo de frutos secos y el estrés oxidativo

Debido a que los ácidos grasos poliinsaturados, en particular los de cadena larga, son el sustrato lipídico más susceptible de oxidarse (Reaven P, *et al.* 1993, Bonanome A, *et al.* 1992) se ha sugerido que el consumo de frutos secos podría incrementar la oxidación (Mataix J y Ros

E, 2005) y con ello producir efectos negativos sobre la salud. Aunque la mayoría de los frutos secos contienen principalmente grasa monoinsaturada, con excepción de las nueces que destacan por su contenido de grasa poliinsaturada, todos los frutos secos son susceptibles de oxidarse. Sin embargo, los resultados de ensayos clínicos y estudios experimentales *in vitro* que han evaluado el efecto de los frutos secos sobre el estrés oxidativo, no han demostrado de manera clara el efecto prooxidante de los frutos secos.

4.6.1. Estudios epidemiológicos que analizan el consumo de frutos secos y su asociación con el estrés oxidativo

En la actualidad, no existen datos epidemiológicos sobre el consumo de frutos secos y su relación con el estrés oxidativo en el hombre. A pesar de esto, existen resultados de amplios estudios epidemiológicos que han observado una asociación entre la mayor frecuencia del consumo de frutos secos y la disminución del riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria y todas las causas. La mejoría del perfil lipídico, principalmente por la reducción del colesterol total y c-LDL, es el principal mecanismo al que se han atribuido los beneficios cardiovasculares observados tras el consumo de frutos secos. Sin embargo, se sugiere que otros mecanismos adicionales podrían contribuir a la disminución del riesgo cardiovascular, como por ejemplo, la disminución de la susceptibilidad de las partículas LDL a la oxidación, la disminución de los procesos inflamatorios o la mejoría de la disfunción endotelial. Además, cabe señalar que debido a los importantes efectos cardiosaludables observados tras el consumo de frutos secos, este grupo de alimentos ha sido incluido dentro de diferentes guías alimentarias de algunos países, como Estados Unidos, Canadá y España. En este mismo sentido, la *Food and Drug Administration* (FDA) emitió una declaración en que autoriza la leyenda para el etiquetado de frutos secos y productos que contienen frutos secos, en que se alega que: "el consumo de una dieta que incluye 29 g diarios de frutos secos puede reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular" (FDA, 2003).

4.6.2. Estudios epidemiológicos que analizan el consumo de frutos secos y su asociación con las enfermedades cardiovasculares

Los primeros estudios epidemiológicos que mostraron evidencias favorables sobre la salud cardiovascular con el consumo de frutos secos fueron realizados sobre 4 amplias cohortes de individuos. Los resultados de estos estudios observacionales mostraron una asociación inversa

entre la frecuencia de consumo de frutos secos y la reducción del riesgo de padecer enfermedad coronaria, ECV, infarto al miocardio, muerte súbita y muerte por todas las causas (Figura 1.6.). El primer estudio epidemiológico que analizó la relación entre el consumo de frutos secos con la enfermedad coronaria fue el "*Adventist Health Study*" realizado sobre una cohorte de 26743 adventistas de California (Fraser GE, *et al.* 1992). Los autores mostraron que tras 6 años de seguimiento, los sujetos con mayor frecuencia de consumo de frutos secos (5 o más veces/semana) presentaban un 38% menor riesgo de mortalidad por cardiopatía coronaria (P para la tendencia de $<0,01$) o un 48% menor riesgo de padecer un infarto al miocardio (P para la tendencia de $<0,05$) en comparación con los individuos que no consumían frutos secos o los consumían menos de una vez por semana (Fraser GE, *et al.* 1992). También en el "*Iowa Women's Health Study*" realizado sobre una cohorte de 19411 mujeres postmenopáusicas sin ECV previa, Kushi y colaboradores (1996) observaron que tras 7 años de seguimiento, las mujeres que consumían 4 o más veces/semana frutos secos presentaban 40% menor riesgo de mortalidad por cardiopatía coronaria, en comparación con las mujeres que rara vez o nunca consumían frutos secos (RR: 0,60; IC 95%: 0,36-1,01). Tras ajustar por el consumo de vitamina E, el riesgo se redujo en un 28% (RR: 0,72; IC 95%: 0,42-1,13) (Kushi LH, *et al.* 1996). En 1998 se publicaron los resultados del estudio realizado por Hu y colaboradores (1999) sobre una cohorte de 86016 mujeres del estudio "*Nurses's Health Study*". Tras 14 años de seguimiento se observó que después de ajustar por diferentes factores de riesgo de enfermedad coronaria (edad, menopausia, IMC, tabaquismo, hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, terapia hormonal sustitutiva, antecedentes familiares de infarto agudo de miocardio, uso de polivitamínicos, alcohol, aspirina, ejercicio físico e ingesta total de energía), las mujeres que consumían 5 o más raciones de frutos secos a la semana presentaban un 39% menor riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria, un 32% menor riesgo de infarto agudo de miocardio no mortal y un 35% menor riesgo de enfermedad coronaria (Hu FB, *et al.* 1998). En el estudio "*Physician's Health Study*" también se obtuvieron resultados similares. Tras 17 años de seguimiento de una cohorte de 22071 médicos, Albert y colaboradores (2002) observaron que los hombres que tenían una mayor frecuencia de consumo de frutos secos (más de 1 vez/semana) presentaban un 47% menor riesgo de mortalidad por insuficiencia cardíaca en comparación con aquellos que rara vez o nunca los consumían (Albert CM, *et al.* 2002).

Los resultados obtenidos en los estudios epidemiológicos descritos previamente, son una evidencia inequívoca del efecto cardioprotector asociado a la mayor frecuencia en el consumo de frutos secos. El análisis conjunto de los cuatro estudios prospectivos mediante un meta-análisis mostró una reducción media del riesgo de muerte por enfermedad coronaria del 37% (RR: 0,63; IC 95%: 0,51-0,83) en los individuos que consumían 4 o más raciones de frutos secos por semana en comparación con aquellos que rara vez o nunca los consumieron (Kelly JH,Jr, *et al.* 2006). Además, los autores determinaron una reducción media del riesgo de muerte por enfermedad coronaria del 8,3% por cada ración de frutos secos consumida semanalmente (28-30 g). Por ello, se propone que los frutos secos pueden constituir uno de los alimentos de consumo habitual con mayor efecto cardioprotector. Sin embargo, son necesarios más estudios que permitan aclarar los mecanismos que podrían ayudar a explicar los efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular observados tras el consumo de frutos secos (Kelly JH,Jr, *et al.* 2006).

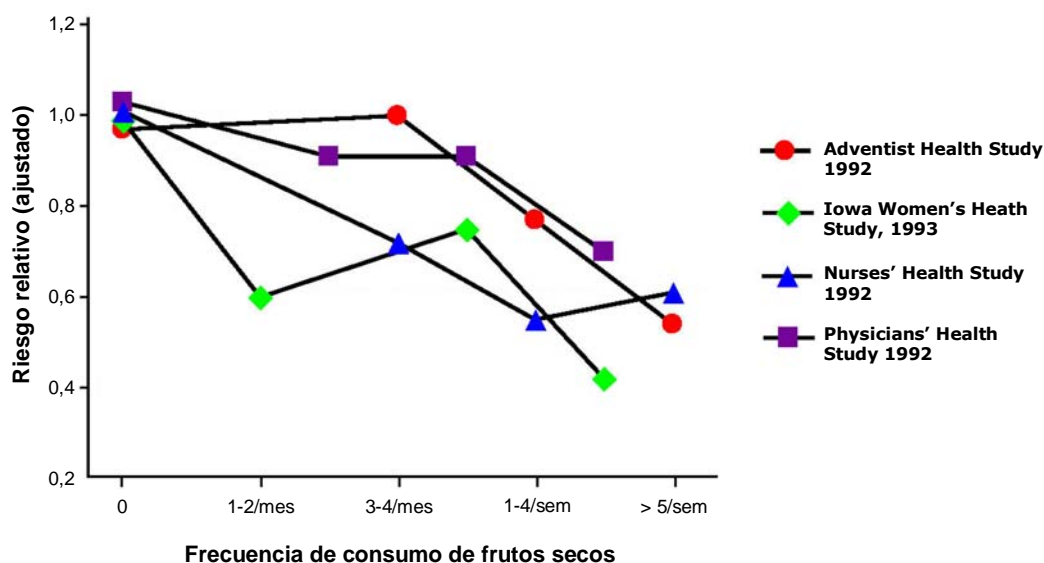


Figura 1.6. Estudios epidemiológicos que asocian el consumo de frutos secos y el riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria.

Fuente: revisado por Ros E. 2010

4.6.3. Estudios de intervención que evalúan el efecto del consumo de frutos secos sobre el estrés oxidativo

Diversos ensayos clínicos han analizado el efecto del consumo crónico o agudo de distintos tipos y dosis de frutos secos sobre diversos marcadores de estrés oxidativo. Los resultados analizados en una revisión sistemática que incluyó 20 estudios clínicos de intervención, aleatorizados, controlados, de diseño cruzado o en paralelo, realizados sobre individuos sanos o no, mostraron que el consumo de frutos secos, principalmente los de mayor contenido en AGMI, producía una mejoría en diferentes marcadores de la oxidación evaluados. Sin embargo, los resultados obtenidos de los estudios que investigaron el efecto del consumo de las nueces, frutos secos con alto contenido de AGPI sobre diversos parámetros oxidativos, fueron menos consistentes con respecto a producir una mejoría de los procesos oxidativos en comparación al consumo de otro tipo de frutos secos (Lopez-Uriarte P, *et al.* 2009.).

Tabla 1.11. Estudios clínicos de intervención que evalúan el efecto del consumo crónico de frutos secos sobre el estrés oxidativo.

Autor año	N (H/M) Individuos	Diseño y duración del estudio	Dieta grupo control	Dieta grupo intervención	Dosis de frutos secos (g/día)	Peroxidación lipídica			Actividad antioxidante enzimática y no enzimática	Daño al ADN
						LDL-ox séricas	MDA	Formación de dienos conjugados		
Zambón et al, (2000)	49 (23/26) HC	Cruzado (6 sem/ período)	Mediterránea	Mediterránea + nueces	41 - 56	NE	NE	↓ lag time (NS)	NE	NE
Hargrove et al, (2001)	22 (9/13) Sanos	Cruzado (3,5 sem/ período)	Occidental	a) Baja en grasa, de paso II b) Alta en AGMI (aceite oliva) c) Alta en AGMI (aceite cacahuete) d) Alta en AGMI (cacahuete + mantequilla de cacahuete)	c) 17.0 d) 18.3 + 18.0	NE	NE	↑ lag time con aceite cacahuete (NS) y con cacahuete+mantequilla de cacahuete (P<0.05) = Vmax con aceite cacahuete (NS) y con cacahuete + mantequilla cacahuete (NS) ↑ Cmax con ambos tratamiento de cacahuete (NS)	NE	NE
Muñoz et al, (2001)	6 (6/0) HC	Cruzado (6 sem/ período)	Mediterránea	Mediterránea + nueces	41 - 56	NE	NE	↓ lag time (NS) ↑ Vmax (P=0.012) ↑ Cmax (NS)	NE	NE
Hyson et al, (2002)	22 (10/12) Sanos	Cruzado (6 sem/ período)	Control	a) Control + aceite almendra reemplazando otras fuentes de grasa b) Control + almendra reemplazando otras fuentes de grasa	35 ± 2 66 ± 5	NE	NE	↑ lag time (NS) ↓ Vmax (NS) ↑ Cmax (NS)	NE	NE
Iwamoto et al, (2002)	40 (20/20) Sanos	Cruzado (4 sem/ período)	Asiática	Asiática + nueces	44 - 58	NE	NE	↓ lag time (NS)	NE	NE
Jenkins et al, (2002)	27 (15/12) HC	Cruzado (4 sem/ período)	Baja en grasa, de paso II	a) Baja en grasa + almendras b) Baja en grasa + ½ almendra	a) 73 b) 37	NE	NE	↓ Cmax (P≤0.01)	NE	NE
Ros et al, (2004)	20 (8/12) HC	Cruzado (4 sem/ período)	Mediterránea	Mediterránea + nueces	40 - 65	↓ (NS)	↓ en plasma (NS)	↓ lag time (NS)	NE	NE
Haddad et al, (2006)	24 (14/10) Sanos	Cruzado (4 sem/ período)	Baja en grasa, de paso I	Baja en grasa, paso I, isocalórica + pacanas	72	NE	↓ en plasma (P<0.014)	NE	NE	NE
Jia et al, (2006)	30 (30/0) Fumadores	Paralelo (4 sem)	Asiática	a) Asiática+dosis baja de suplemento en polvo de almendra b) Asiática+dosis alta de suplemento en polvo de almendra	a) 84 b) 168	NE	↓ en plasma (P<0.05) en ambas dosis	NE	↑ SOD en plasma (NS) en ambas dosis ↑ GSH-Px en plasma (NS) en ambas dosis	↓ 8-OHdG en orina (P<0.05) en ambas dosis ↓ % fragmentación ADN (P<0.05) con dosis alta
Kocygit et al, (2006)	44 (24/20) Sanos	Paralelo (3 sem)	Baja en grasa, isocalórica	Baja en grasa isocalórica + pistachio	65 - 75	NE	↓ en plasma (P<0.05)	NE	NE	NE

Tabla 1.11. Continuación.

Autor año	N (H/M) Individuos	Diseño y duración del estudio	Dieta grupo control	Dieta grupo intervención	Dosis de frutos secos (g/día)	Peroxidación lipídica			Actividad antioxidante enzimática y no enzimática	Daño al ADN
						LDL-ox séricas	MDA	Formación de dienos conjugados		
Canales et al, (2007)	22 (12/10) Alto riesgo CV	Cruzado (5 sem/ período)	Control	Control + carne y salsas enriquecidas con pasta de nuez	21.4	NE	↓ en eritrocitos (P=0.05)	NE	↑ CAT* (P=0.05) ↑ SOD* (NS) ↑ PON1* (NS) ↑ Glutación total* (P<0.001) ↑ GSH* (NS) ↑ GSSG* (P<0.01) ↓ GSH/GSSG* (P<0.05)	NE
Davis et al, (2007)	64 (29/35) SMet	Paralelo (8 sem)	Sudafricana, isocalórica	a) sudafricana suplementada con nueces b) sudafricana suplementada con anacardos	63 108	NE	NE	NE	↓ GSH en plasma (NS) ↓ GSSG en plasma (NS) ↑ GSH/GSSG en plasma (NS)	NE
Li et al, (2007)	60 (60/0) Fumadores y no fumadores	Cruzado (4 sem/ período)	Asiática + carne de cerdo	Asiática + suplemento de almendra en polvo	84	NE	↓ en orina (P<0.05) sólo fumadores	NE	En fumadores: ↑ SOD y ↑ GPx en plasma (P<0.05) ↓ Catalasa en plasma (NS)	En fumadores: ↓ 8-OHdG y ↓ % fragmentación ADN (P<0.05) en orina (P<0.05)
Nus et al, (2007)	23 (14/9) Alto riesgo CV	Cruzado (5 sem/ período)	Control	Control + carne y salsas enriquecidas con pasta de nuez	21,4	(NS)	↓ en eritrocitos (P=0.031) de los portadores del polimorfismo PON1-192R	NE	NE	NE
Jenkins et al, (2008)	27 (15/12) HC	Cruzado (4 sem/ período)	Baja en grasa	a) Baja en grasa + 1 dosis almendra b) Baja en grasa + ½ dosis almendra	a) 73 b) 37	NE	a) ↓ en suero (P=0.04) b) (NS)	NE	NE	NE
Spacarotela, et al, 2008	21 (21/0) Alto riesgo CA próstata	Cruzado (8 sem/ período)	Dieta habitual occidentalizada	Dieta habitual occidentalizada + nueces reemplazando otras fuentes de grasa	75	↓ (NS)	NE	NE	NE	NE
Thomson et al, (2008)	59 (30/29) Sanos	Paralelo (12 sem)	Control	Control + nueces de Brasil	8	NE	NE	NE	↑ GPx en sangre (P<0.001) ↑ GPx en plasma (P=0.002)	NE
Kay et al, 2010	27 (10/17) HC	Cruzado (4 sem/ período)	Baja en grasa	a) Baja en grasa + 1 porción pistachos b) Baja en grasa + 2 porciones pistachos	a) 32-63 b) 63-126	↓(P<0,05) ↓(P<0,05)	NE	NE	NE	NE

Abreviaturas: N, número; H, hombre; M, mujer; MDA, malondialdeído; ADN, ácido desoxirribonucleico; HC, hipercolesterolemia; NE, no evaluado; p, diferencia entre grupos (frutos secos y control); lag time, fase de retardo o latencia para el inicio de la peroxidación lipídica; NS, no significativo; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; Vmax, velocidad máxima de producción de dienos; Cmax, producción máxima de dienos conjugados; SOD, superóxido dismutasa; CA, cáncer; GSH-Px, glutatión peroxidasa; 8-OHdG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina; (*), evaluado en eritrocitos; CAT, catalasa; PON1, paraoxonasa-1; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; cociente GSH/GSSG

Tabla 1.12. Estudios clínicos de intervención que evalúan el efecto del consumo agudo de frutos secos sobre el estrés oxidativo.

Autor, año	N (H/M) Individuos	Diseño y duración de la intervención	Dieta grupo Control	Dieta grupo de intervención	Dosis de fruto seco (g/día)	Capacidad antioxidante	Peroxidación lipídica					
							LDL-ox sérica	MDA	Iso prostanos totales del plasma	Formación de dienos conjugados en partículas LDL		
										Lag time	Vmax	C max
Cortés et al. (2006)	24 (20/4) Sanos y HC	Cruzado 1 comida/día	Comida alta en grasa + aceite de oliva	Comida alta en grasa + nueces	40	NE	↓ (NS)	NE	NE	(NS)	(NS)	(NS)
Jenkins et al. (2006)	15 (7/8) Sanos	Cruzado 1 alimento/día	97 g pan blanco	97 g pan blanco + almendras	60	TAC sérica (NS)	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Berry et al. (2008)	20 (20/0) Sanos	Cruzado 1 alimento/día	Magdalena horneado con 50 g de aceite de girasol	Magdalenas horneadas con macropartículas de almendras	96.5	NE	NE	NE	(NS)	NE	NE	NE
				Magdalenas horneadas con aceite de almendra + harina de almendra desgrasada	50.0+47.0	NE	NE	NE	(NS)	NE	NE	NE
Torabian et al, 2009	14 (7/7) Sanos	Cruzado 1 alimento/día	Batido	Batido isocalórico + nueces	81	ORAC and FRAP ↑ (P<0,05)	(NS)	↓ (NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)
				Batido isocalórico + almendras	91	ORAC and FRAP ↑ (P<0,05)	(NS)	↓ (NS)	(NS)	(NS)	(NS)	(NS)

Abreviaturas: N, número; H, hombre; M, mujer; LDL-ox, lipoproteína de baja densidad oxidadas; MDA, malondialdeido; Vmax, velocidad máxima de producción de dienos conjugados; Cmax, producción máxima de dienos conjugados; HC, hipercolesterolemia; NE, no evaluado; NS, no significativo; TAC, capacidad antioxidante total; ORAC, capacidad de absorción de radicales de oxígeno ensayo; FRAP, capacidad antioxidante de reducir el hierro

4.6.3.1. Efecto del consumo de frutos secos sobre la capacidad antioxidante. Cinco estudios que evaluaron el efecto del consumo de frutos secos sobre la capacidad antioxidante mostraron resultados contradictorios.

En un estudio de diseño en paralelo y de tres semanas de duración, 44 individuos sanos fueron aleatorizados a consumir una dieta baja en grasa o una dieta isocalórica suplementada con pistachos (Kocyigit A, *et al.* 2006). Los autores observaron que en comparación al consumo de la dieta control baja en grasa, los individuos que consumieron la misma dieta suplementada con pistachos aumentaron significativamente su potencial antioxidante determinado mediante la capacidad plasmática para inhibir la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Kocyigit A, *et al.* 2006). En otro ensayo clínico de diseño en paralelo realizado sobre pacientes con síndrome metabólico, se comparó el efecto sobre la capacidad antioxidante plasmática del consumo de dos dietas enriquecidas con nueces enteras o anacardos con una dieta habitual isocalórica exenta de frutos secos. Los autores no encontraron diferencias entre intervenciones en la capacidad antioxidante del plasma determinada mediante el método ORAC (Davis L, *et al.* 2007). Resultados similares obtuvieron Tapsell y colaboradores en 2004, cuando evaluaron en pacientes con DM tipo 2 la capacidad antioxidante plasmática mediante un estudio de diseño en paralelo, controlado y aleatorizado, comparando el efecto de una dieta baja en grasa con el de la misma dieta suplementada con 30 gramos diarios de nueces (Tapsell LC, *et al.* 2004).

Solo dos estudios han evaluado el efecto del consumo agudo de frutos secos sobre la capacidad antioxidante. Es el caso del ensayo clínico, de diseño cruzado realizado sobre 15 voluntarios sanos realizado por Jenkins y colaboradores (2006), quienes no observaron diferencias significativas postprandiales entre el consumo de un alimento base conteniendo 60 g de almendras crudas y el consumo del mismo alimento sin almendras añadidas (Jenkins DJ, *et al.* 2006). Sin embargo, Torabian y colaboradores (2009) mediante un estudio de mismo diseño observaron diferencias significativas en la capacidad antioxidante plasmática postprandial entre el consumo de un batido enriquecido con 91 g de almendras o el consumo de otro batido isocalórico conteniendo 81 g de nueces (Torabian S, *et al.* 2009).

4.6.3.2. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica (partículas de LDL-oxidadas).

Ninguno de los estudios que han evaluado el efecto del consumo de nueces sobre la peroxidación lipídica, mostraron efectos significativos en la concentración sérica de las LDL-ox (Ros E, *et al.* 2004, Cortes B, *et al.* 2006, Nus M, *et al.* 2007, Spaccarotella KJ, *et al.* 2008). El primero de estos estudios, realizado por Ros y colaboradores (2004) comparó el efecto del consumo de nueces sobre la oxidación lipídica en 20 pacientes hipercolesterolémicos, los cuales fueron aleatorizados a consumir dos dietas isocalóricas en el contexto de una DMed, en que las nueces sustituían o no la energía proveniente de otras fuentes de AGMI. Aunque los resultados mostraron una tendencia hacia la disminución en las concentraciones de las partículas LDL-ox en aquellos individuos que consumieron la DMed enriquecida con 40-65 g/día de nueces, los autores no observaron diferencias significativas en los cambios de LDL-oxidadas entre los dos grupos de intervención (Ros E, *et al.* 2004). Mediante otro estudio, este mismo grupo de investigadores comparó en sujetos sanos como hipercolesterolémicos, el efecto postprandial del consumo de una comida rica en grasa monoinsaturada (25 g de aceite de oliva) respecto a otra comida con alto contenido de grasas poliinsaturadas (40 g de nueces). Los autores observaron de nuevo la misma tendencia a la mejoría en las concentraciones séricas de LDL-oxidadas (Cortes B, *et al.* 2006). Posteriormente, Nus y colaboradores (2007) observaron en individuos con alto riesgo cardiovascular, que el consumo de salsas y derivados cárnicos enriquecidos con 21.4 g nueces/día durante cinco semanas, tampoco produjo cambios significativos sobre la oxidación de las partículas de LDL, en comparación al consumo de la misma dieta isocalórica suplementada con los derivados cárnicos sin la inclusión de nueces (Nus M, *et al.* 2007). Por último, mediante un ensayo clínico de diseño cruzado realizado sobre ancianos de elevado riesgo de padecer cáncer de próstata, no se observaron diferencias en los cambios de las concentraciones séricas de LDL-oxidadas entre el consumo de una dieta habitual Americana (occidentalizada) suplementada con 75 g de nueces y la misma dieta sin nueces (Spaccarotella KJ, *et al.* 2008). Sin embargo, en 27 sujetos con hipercolesterolemia moderada, el consumo durante 4 semanas de dietas isocalóricas bajas en grasa enriquecidas con dos dosis de pistachos (dosis baja, 32-63 g/día; dosis alta, 63-126 g/día) produjo una reducción significativa en las concentraciones séricas de partículas de LDL-oxidadas en comparación a una dieta control baja en grasa (Kay CD, *et al.* 2010).

4.6.3.3. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica

(malondialdehído). Casi todos los estudios que han evaluado el efecto del consumo dietético de frutos secos sobre la peroxidación lipídica a través de la determinación de las concentraciones de MDA han demostrado efectos beneficiosos tanto en pacientes con estrés metabólico (Tapsell LC, *et al.* 2004, Nus M, *et al.* 2007, Li N, *et al.* 2007, Jia X, *et al.* 2006, Jenkins DJ, *et al.* 2008, Canales A, *et al.* 2007) como en individuos sanos (Kocyigit A, *et al.* 2006, Torabian S, *et al.* 2009, Haddad E, *et al.* 2006). La producción del MDA ha sido determinada en distintos fluidos biológicos, como plasma, orina, suero o eritrocitos.

Dos estudios han investigado el efecto del consumo de almendras sobre individuos sanos con hábito tabáquico. En el primero de ellos, un estudio de diseño en paralelo realizado sobre 30 individuos sanos fumadores, se comparó el efecto del consumo de dos dietas isocalóricas enriquecidas con 84 g/día o 168 g/día de almendras en polvo con el de una dieta control isocalórica sin almendras sobre las concentraciones plasmáticas de MDA (Jia X, *et al.* 2006). Tras 4 semanas de intervención, los autores observaron una disminución significativa de las concentraciones de MDA en los individuos que consumieron las dietas enriquecidas con almendras en comparación a aquellos que consumieron la dieta control. Posteriormente, mediante un estudio de diseño cruzado este mismo grupo de investigadores mostró en un grupo de 60 individuos sanos con hábito de fumar los mismos efectos beneficiosos sobre la producción de MDA en orina del consumo de almendras en polvo (Li N, *et al.* 2007). En otro estudio de diseño cruzado aleatorizado y controlado, también se observó una disminución significativa de las concentraciones séricas de MDA en pacientes hipercolesterolémicos, tras el consumo de una dieta baja en grasa suplementada con 73 g/día de almendras respecto al consumo de la mitad de la dosis de almendras (37 g/día) o bien, del consumo de la misma dieta control isocalórica sin almendras añadidas (Jenkins DJ, *et al.* 2008).

En relación al efecto de las nueces sobre las producción de MDA, dos estudios de diseño cruzado, han investigado el efecto del consumo de derivados cárnicos enriquecidos con nueces sobre las concentraciones de MDA en eritrocitos de individuos de elevado riesgo cardiovascular (Nus M, *et al.* 2007, Canales A, *et al.* 2007). Los resultados de estos dos estudios mostraron que tras el consumo durante cinco semanas de los derivados cárnicos reestructurados y salsas, ambos productos enriquecidos con nueces, se produjo una disminución de las concentraciones

de MDA respecto al período de consumo de la carne y salsas sin nueces añadidas. Cabe destacar que Nus y colaboradores (2007) mostraron una reducción de la producción de MDA especialmente en los individuos con el polimorfismo PON1-192R, lo que sugiere que la presencia de este polimorfismo podría modular el efecto de las nueces sobre la oxidación de las partículas LDL y, así contribuir a la disminución del riesgo cardiovascular observado por el consumo de frutos secos (Nus M, *et al.* 2007).

Por otra parte, Haddad y colaboradores (2006) evaluaron mediante un estudio de diseño cruzado y controlado, el efecto del consumo de pacanas sobre la producción plasmática de MDA en sujetos sanos. Los autores observaron que el consumo de una dieta rica en pacanas (20% de la energía) durante 4 semanas, producía una disminución significativa en la concentración plasmática de MDA, en comparación al consumo de una dieta control (Haddad E, *et al.* 2006). Finalmente, Torabian y colaboradores (2009) mediante un estudio de diseño en paralelo observaron que tras el consumo agudo de dos batidos enriquecidos, bien con nueces o con almendras, se producía una disminución en la producción plasmática de MDA significativamente mayor que tras el consumo de batidos sin frutos secos añadidos (Torabian S, *et al.* 2009).

4.6.3.4. Efecto del consumo de frutos secos y su efecto sobre la peroxidación lipídica (isoprostanos). Sólo dos estudios de intervención han evaluado la peroxidación lipídica mediante la determinación de isoprostanos en orina de 24 horas. Mediante un estudio de diseño cruzado realizado sobre 27 individuos hipercolesterolémicos de ambos sexos, Jenkins y colaboradores (2008) mostraron que la producción de isoprostanos disminuía significativamente tras el consumo de un suplemento de almendras, en el contexto de una dieta control baja en grasa, en comparación al periodo de la dieta control sin almendras. Los autores destacaron que incluso después de corregir la excreción de isoprostanos mediante la excreción urinaria de creatinina, la producción de éstos fue menor en aquellos pacientes hipercolesterolémicos que consumieron la dieta baja en grasa enriquecida con almendras, respecto a la dieta control baja en grasa (Jenkins DJ, *et al.* 2008). Sin embargo, en un estudio de diseño cruzado realizado sobre hombres sanos por Berry y colaboradores (2008) en que se comparó el efecto postprandial del consumo de "magdalenas" enriquecidas con dos dosis de almendras con el de "magdalenas" control (horneadas con aceite de girasol) sobre las

concentraciones plasmáticas de isoprostanos, los autores no observaron diferencias entre grupos de intervención (Berry SE, *et al.* 2008).

4.6.3.5. Efecto del consumo de frutos secos sobre la peroxidación lipídica (perfil cinético de formación de dienos conjugados). Diversos índices han sido utilizados para evaluar la cinética de formación de dienos conjugados, lo que permite determinar la susceptibilidad de las partículas LDL a la oxidación, mediante el *lag time*, la velocidad máxima de producción de dienos conjugados (V_{max}), y la cantidad máxima de dienos conjugados producidos (C_{max}) (Kleinveld HA, *et al.* 1992).

Ocho ensayos clínicos de diseño cruzado analizando el efecto del consumo de diferentes tipos de dietas enriquecidas con frutos secos sobre la susceptibilidad de las LDL a la oxidación han sido realizados tanto en individuos sanos como hipercolesterolémicos. La mayoría de ellos han observado un efecto no significativo del consumo de frutos secos sobre estos marcadores, sin embargo incluso algunos de ellos han observado un incremento en la formación de dienos conjugados en comparación a una dieta control. Se ha sugerido que estas discrepancias en los resultados entre estudios podría ser debida al tipo de fruto seco estudiado debido a la composición en ácidos grasos y otros componentes de los mismos (revisado por López-Uriarte y colaboradores, 2009).

Hasta la actualidad, cuatro ensayos clínicos han evaluado mediante un diseño cruzado el efecto del consumo crónico de nueces sobre la formación de dienos conjugados. Tres de ellos fueron realizados por el mismo grupo investigador sobre pacientes hipercolesterolémicos. Los autores de estos tres estudios analizaron el efecto del consumo de dos dietas isocalóricas tipo Mediterráneo, donde los alimentos ricos en AGMI fueron reemplazados por nueces (Ros E, *et al.* 2004, Zambon D, *et al.* 2000, Munoz S, *et al.* 2001). El cuarto de ellos, realizado sobre mujeres sanas por Iwamoto y colaboradores (2002), comparó el efecto del consumo de una dieta isocalórica tipo japonés en la que las nueces reemplazaron otras fuentes de grasa, con el del consumo de una dieta exenta de nueces. En todos estos estudios se observó que el consumo de las dietas enriquecidas con nueces tiende a empeorar la cinética de formación de dienos conjugados.

El efecto postprandial del consumo de nueces ha sido también estudiado por Cortés y colaboradores en el año 2006. Los autores no observaron diferencias significativas sobre la formación de dienos conjugados tras el periodo postprandial de una comida test enriquecida con nueces en comparación a una comida test isocalórica que contenía misma cantidad de grasa pero en forma de aceite de oliva (Cortés B, *et al.* 2006).

Resultados similares se han observado en los estudios evaluando el efecto del consumo de almendras sobre la peroxidación lipídica. Así, Jenkins y colaboradores (2002) observaron que la producción de dienos conjugados disminuyó de manera significativa en los pacientes hipercolesterolémicos tras el consumo de una dieta baja en grasa suplementada con 73 g/día o con 37 g/día de almendras en comparación con el consumo de una dieta control baja en grasa (Jenkins DJ, *et al.* 2002). Por el contrario, Hyson y colaboradores (2002) no observaron diferencias significativas sobre la cinética de formación de dienos conjugados entre el consumo de dos dietas isocalóricas enriquecidas, con almendra entera o bien con aceite de almendra, en comparación al consumo de una dieta control isocalórica sin frutos secos añadidos (Hyson DA, *et al.* 2002). Hargrove y colaboradores (2001) evaluaron el efecto del consumo de una dieta baja en grasa o tres dietas diferentes enriquecidas con grasas monoinsaturadas (aceite de oliva, aceite de cacahuete y los cacahuetes más mantequilla de cacahuete) sobre la susceptibilidad *in vitro* a la oxidación de las LDL en individuos sanos, respecto al consumo de una dieta occidentalizada. Los autores observaron que respecto al consumo de esta dieta típica Americana (occidentalizada), los individuos que consumieron la dieta baja en grasa o cualquiera de las tres dietas altas en grasas monoinsaturadas redujeron la susceptibilidad de las partículas LDL a la oxidación, ya que aumentaron significativamente el *lag time* (Hargrove RL, *et al.* 2001).

4.6.3.6. Efecto del consumo de frutos secos sobre la actividad antioxidante enzimática y no enzimática. El efecto del consumo de frutos secos sobre la actividad antioxidante enzimática y no enzimática ha sido evaluado en cinco estudios clínicos, con resultados también contradictorios. El estudio de Li y colaboradores (2007) mostró que el consumo de un suplemento de almendras en polvo dentro del contexto de una dieta regular, produjo un aumento significativo de la actividad antioxidante de las enzimas SOD y GPx en

adultos sanos fumadores, cosa que no ocurrió en aquellos individuos no fumadores (Li N, *et al.* 2007).

Resultados similares obtuvieron Canales y colaboradores (2007) al identificar una mejoría generalizada del estado oxidativo en pacientes con elevado riesgo cardiovascular durante el período de consumo de productos cárnicos enriquecidos con nueces. Los autores de este estudio de diseño cruzado, identificaron a nivel eritrocitario un aumento significativo de la actividad antioxidante de la enzima catalasa y la reducción del cociente GSH/GSSG, tras el consumo de productos cárnicos enriquecidos con nueces (Canales A, *et al.* 2007). Thomson y colaboradores (2008) observaron también una mejoría en la actividad antioxidante en un estudio de diseño en paralelo, controlado con placebo, aleatorizado y de 12 semanas de duración, al comparar el efecto del consumo de una dieta habitual suplementada con 8 g/día de nueces del Brasil con el producido tras el consumo de otras dos dietas isocalóricas (una suplementada con una tableta de seleniometionina equivalente a 100 µg de selenio, y la otra una dieta control). Los autores de este estudio identificaron que el consumo de nueces del Brasil (equivalentes a 100 µg de selenio) en el contexto de una dieta habitual resultó efectivo para aumentar las concentraciones circulantes de selenio y la actividad antioxidante plasmática de la GPx (Thomson CD, *et al.* 2008). Sin embargo, los resultados de un estudio de diseño en paralelo realizado sobre pacientes con síndrome metabólico no mostraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas del GSH, GSSG o del cociente GSH/GSSG, entre el consumo de una dieta control sin frutos secos añadidos y dos dietas isocalóricas suplementadas con frutos secos (nueces y anacardos, respectivamente) (Davis L, *et al.* 2007). Finalmente, Jia y colaboradores (2006) tampoco observaron efecto sobre la actividad antioxidante del consumo de una dieta suplementada con almendras en polvo (Jia X, *et al.* 2006).

4.6.3.7. Efecto del consumo de frutos secos sobre el daño oxidativo al ADN (8-oxodG). Sólo dos ensayos clínicos realizados por el mismo grupo investigador han evaluado el efecto del consumo de frutos secos sobre el daño oxidativo al ADN. Estos estudios han investigado el efecto del consumo de una dieta habitual suplementada con almendras en polvo en individuos sanos fumadores y no fumadores. Los parámetros analizados en ambos estudios fueron el porcentaje de deleciones en las cadenas de ADN de los linfocitos y la determinación

de la excreción urinaria de 8-oxodG. Respecto a los individuos sanos no fumadores, aquellos con hábito tabáquico disminuyeron significativamente el daño oxidativo al ADN tras el consumo de una dieta habitual suplementada con almendras en polvo. Estos resultados sugieren que el consumo de almendras podría ayudar a disminuir el estrés oxidativo mediado por el tabaquismo (Li N, *et al.* 2007, Jia X, *et al.* 2006).

En resumen, los resultados de los ensayos clínicos que han evaluado el efecto del consumo de frutos secos sobre diversos marcadores de estrés oxidativo, no han mostrado el efecto prooxidante característico de los AGPI contenidos en los frutos secos, particularmente en las nueces. Además, en la mayoría de los estudios que analizaron el efecto de las almendras, pistachos, nueces de Brasil o cacahuetes, todos ellos ricos en AGMI, han mostrado un efecto beneficioso tras su consumo, aunque este efecto no ha sido consistente en los estudios realizados con nueces. Por ello, se sugiere que el potencial antioxidante de los polifenoles y de los otros antioxidantes contenidos principalmente en la piel o cubierta de los frutos secos, podrían contribuir a prevenir los efectos adversos del estrés oxidativo que produce la grasa poliinsaturada que contienen en mayor o menor medida, todos los frutos secos (Lopez-Uriarte P, *et al.* 2009.).

4.6.4. Estudios experimentales con modelos animales que analizan el efecto del consumo de frutos secos y el estrés oxidativo

Pocos estudios han evaluado el efecto del consumo de frutos secos sobre el estrés oxidativo en modelos animales. De hecho, sólo seis estudios experimentales (cuatro crónicos y dos agudos) han analizado el efecto de los frutos secos sobre la peroxidación lipídica, la actividad enzimática antioxidante y la formación de productos de oxidación del colesterol. De ellos, cinco se llevaron a cabo en roedores y uno en conejos.

Efectos similares fueron observados en dos estudios que evaluaron la peroxidación lipídica y las actividades enzimáticas antioxidantes en el tejido aórtico de animales que fueron alimentados con dietas enriquecidas con nueces. Mediante un grupo de hámsteres machos Golden Syrian, Davis y colaboradores (2006) evaluaron el efecto del consumo de 12 dietas experimentales aterogénicas de alto contenido de grasa, enriquecidas con concentraciones crecientes de nueces enteras (61-150 g/kg de alimento) de α -tocoferol (8,1-81 mg/kg de alimento) o de

dietas simples conteniendo aceite de nuez (32 g / kg de alimento) o γ -tocoferol (81 mg / kg de alimento) sobre algunos marcadores relacionados con la aterosclerosis. El contenido de hidratos de carbono, proteínas, grasas, fibras, vitaminas y minerales para cada dieta se mantuvo a un nivel constante en las 12 dietas experimentales. Los autores de este estudio no observaron diferencias significativas en las concentraciones enzimáticas de la MnSOD, CuSOD, ZnSOD o de la proteína reductasa biliverdina en la aorta, entre los hámsteres alimentados con nueces y aquellos alimentados con α -tocoferol o γ -tocoferol después de 26 semanas de intervención. Sin embargo, observaron que el aumento del contenido de nueces en las dietas se asoció inversa y significativamente con los niveles de endotelina (ET-1) aórtica de manera dosis-dependiente (Davis P, *et al.* 2006). Los autores sugirieron que los efectos beneficiosos sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular observada en este estudio después del consumo de nueces, no se debieron a los cambios en el estrés oxidativo, sino a los efectos relacionados de la ET-1 sobre los procesos endoteliales. Del mismo modo, Iwamoto y colaboradores (2002) no observaron cambios significativas en los niveles de productos finales en la oxidación del colesterol en la aorta abdominal o torácica en ratones deficientes de apolipoproteína-E tras haber consumido una dieta enriquecida con aceite de nuez en comparación a los ratones alimentados con una dieta enriquecida con aceite de cártamo. Sin embargo, los ratones hembra que recibieron la dieta con aceite de nueces presentó una lesión de mayor tamaño en la raíz aórtica en comparación a los ratones hembras que consumieron la dieta enriquecida con aceite de cártamo. Los autores atribuyeron estos efectos al importante contenido de ácido α -linolénico en las nueces y a la especificidad del modelo estudiado, ratones deficientes en apolipoproteína E (Iwamoto M, *et al.* 2002b). Por el contrario, Aksoy y colaboradores (2007) evaluaron el efecto del consumo del pistacho sobre la actividad sérica de la paraoxonasa-1 y la arilesterasa. Un total de 36 ratas fueron aleatoriamente asignadas a consumir una de tres dietas durante 10 semanas: una dieta enriquecida con 2,5 g/día de pistachos (20% de la ingesta calórica total), una dieta enriquecida con 5 g/día de pistachos (40% de la ingesta calórica total) o una dieta control, sin pistachos añadidos. Los autores observaron que las ratas que consumieron el 20% de su energía diaria en forma de pistachos, mostraron un aumento significativo de la actividad de la paraoxonasa-1 y la arilesterasa en comparación con el grupo control. Sin embargo, el aumento en la actividad antioxidante fue mitigado cuando la ingesta del pistacho alcanzó el 40% de la ingesta calórica diaria, pero siguió siendo más elevada que la del grupo control (Aksoy N, *et al.* 2007). Hatipoglu y colaboradores (2004) demostraron que el

aceite de avellana tuvo un efecto beneficioso sobre la peroxidación lipídica en conejos que recibieron una dieta hipercolesterolémica, ya que después de 14 semanas de consumo de los frutos secos se observó que los niveles de peroxidación lipídica del plasma, del hígado y de la aorta (medido por la concentración de MDA y por la formación de dienos conjugados) fueron significativamente menores que en aquellos conejos que no consumieron el aceite de avellana. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las actividades del GSH, GPx o de la GSH-transferasa en el hígado de los conejos que consumieron las dietas que contenían aceite de avellana y los que no lo hicieron. Los autores sugirieron que el aceite de avellana puede tener un potencial antiaterogénico que podría relacionarse con la disminución de los marcadores de estrés oxidativo evaluados en este estudio, especialmente sobre la oxidación de las partículas de LDL (Hatipoglu A, *et al.* 2004).

Los dos estudios que evaluaron el efecto del consumo agudo de frutos secos, mostraron una mejoría del estrés oxidativo después que los roedores consumieron nueces o extractos de flavonoides de la piel de almendra. En un modelo de hámsteres, Chen y colaboradores (2005) observaron que el aumento significativo de la concentración plasmática postprandial de catequina, epicatequina y flavonoides, se relacionó con un retraso del inicio de la oxidación (*lag time*) de las LDL después de 120 min de la ingestión de 40 μ M de ácido gálico (6,8 mg de un extracto de piel de almendra flavonoides) que los hámsteres que no ingirieron el extracto de la almendra. Estos resultados sugirieron a los autores que este extracto de flavonoides es biodisponible y que actúa sinérgicamente con las vitaminas C y E para proteger a las partículas LDL contra la oxidación (Chen CY, *et al.* 2005). El segundo estudio agudo se llevó a cabo usando ratas (Reiter RJ, *et al.* 2005). Después de un período de ayuno, los animales asignados al grupo control se les dejó consumir comida habitual de roedores, mientras que al grupo de los frutos secos, se les dio acceso al consumo de nueces a granel. Cinco horas y media después de haber consumido las nueces a granel, la capacidad postprandial antioxidante del suero (medido por el método TEAC y FRAP) aumentó significativamente en comparación con las ratas del grupo control. Los autores relacionaron este efecto beneficioso al aumento de los niveles de melatonina en la sangre secundario a la ingestión de nueces (Reiter RJ, *et al.* 2005).

4.6.5. Estudios *in vitro* que analizan la relación entre los frutos secos y el estrés oxidativo

Para la evaluación *in vitro* del efecto de los frutos secos sobre el estrés oxidativo, se han realizado sobre distintas muestras biológicas como plasma o partículas de LDL humanas, membranas microsomales del hígado de bovinos o del ADN de plásmidos. Los resultados de estos ensayos han mostrado una mejoría generalizada en la mayoría de los marcadores de estrés oxidativo evaluados, tras la incubación de estas muestras en presencia de los extractos obtenidos de frutos secos.

Cuatro de los estudios que evaluaron la peroxidación lipídica mediante la formación de dienos conjugados sobre partículas humanas de LDL, observaron que tras la incubación con extractos de nueces (Anderson KJ, *et al.* 2001), flavonoides (Chen CY, *et al.* 2005) o polifenoles (Chen CY, *et al.* 2007) de la piel de almendras, o de extractos hidrofílicos de pistachos (Gentile C, *et al.* 2007), el período del *lag time* aumentaba de manera significativa, y por tanto una mayor inhibición de la peroxidación lipídica de las partículas LDL. Anderson y colaboradores (2001) además observaron una reducción significativa en la formación de TBARS, tras 4 horas de incubación de plasma humano en presencia de extractos fenólicos de nueces (equivalentes a 100 y 150 mmol/L de ácido elágico) respecto al plasma incubado en ácido elágico, componente usado como referencia.

Dos estudios evaluaron la peroxidación lipídica de las partículas de LDL a través de la inhibición de la formación de dienos conjugados; el primero de ellos analizó la actividad de extractos obtenidos de la almendra completa, de la piel oscura de la almendra, o de la cáscara verde de la almendra (Wijeratne SS, *et al.* 2006), y el segundo lo hizo mediante las avellanas enteras o los subproductos de avellanas (Shahidi F, *et al.* 2007). Wijeratne y colaboradores (2006) observaron una inhibición efectiva de la oxidación de las LDL humanas después de 20 horas de incubación con los extractos de la almendra entera, la piel morena, o la cáscara o cubierta verde de almendra, en dosis de 10, 50 y 100 ppm equivalentes de quercetina, en comparación a la quercetina, compuesto utilizado como referencia de control. Shahidi y colaboradores (2007) también observaron que los extractos de subproductos de la avellana (piel, cáscara, cubierta verde, hojas de árbol) disminuyeron significativamente la peroxidación de lípidos tras 22 horas de incubación, en comparación con la semilla de la avellana, debido al mayor

porcentaje de inhibición de formación de dienos conjugados en las partículas LDL producido (Shahidi et al, 2007). Gentile y colaboradores (2007) investigaron la actividad protectora de los extractos hidrofílicos y lipofílicos de una variedad siciliana de pistachos frente a la peroxidación lipídica mediante otro ensayo *in vitro* que evaluó la formación de TBARS en los microsomas de hígado de bovino. Los resultados mostraron que en presencia de los extractos hidrofílicos de pistacho, la formación de TBARS se redujo significativamente en comparación con los microsomas incubados sin el extracto de pistacho (Gentile C, *et al.* 2007). Por último, dos ensayos *in vitro* evaluaron el daño oxidativo al ADN, mediante el porcentaje de ADN superenrollado tras una hora de incubación de plásmidos de ADN de *Escherichia coli* con extractos de almendras enteras o de sus subproductos (Wijeratne SS, *et al.* 2006) y de semillas de avellanas o sus subproductos (Shahidi F, *et al.* 2007). Ambos estudios mostraron que tras la incubación durante 1 hora con extractos obtenidos de almendras enteras, o de la piel oscura, la cáscara verde o bien de las semillas (con piel) de avellanas, de la piel, o la cubierta verde o de la hoja del árbol, ejercieron un mayor efecto protector contra la delección de fragmentos de cadenas del ADN superenrollado, con respecto a la incubación del ADN en presencia de la quercetina o la catequina, usadas como componentes de referencia (Wijeratne SS, *et al.* 2006, Shahidi F, *et al.* 2007).

JUSTIFICACIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

II. JUSTIFICACIÓN

Estudios epidemiológicos han demostrado de forma consistente que consumir frecuentemente frutos secos se asocia con una reducción del riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, diabetes tipo 2 o mortalidad por todas las causas (Kelly JH, Jr, *et al.* 2006). Se sugiere que la mejoría del perfil lipídico, es el principal mecanismo que podría explicar la reducción del riesgo de enfermedad coronaria observada tras el consumo de frutos secos (Mukuddem-Petersen J, *et al.* 2005). Sin embargo, se han sugerido otros mecanismos adicionales, entre ellos la disminución de la inflamación de bajo grado, la reducción de los mecanismos oxidativos o la mejoría de la función endotelial, que podrían contribuir a los efectos beneficiosos que ejercen los frutos secos en la prevención de la enfermedad cardiovascular (Johnson RK, *et al.* 2000, Krauss RM, *et al.* 2000). Debido a esto, los frutos secos han sido incluidos en las guías alimentarias de diferentes países del mundo y como un componente óptimo de dietas recomendadas en la prevención de la enfermedad cardiovascular de origen arteriosclerótico (Johnson RK, *et al.* 2000, Krauss RM, *et al.* 2000).

Sin embargo, los frutos secos son alimentos con alto contenido de grasa y presumiblemente por esta razón, hasta hace poco, fueron ignorados o tratados con cautela en la mayoría de las recomendaciones dietéticas. Uno de los posibles efectos deletéreos del consumo crónico de frutos secos se debe a la grasa poliinsaturada que contienen, especialmente las nueces (Kris-Etherton PM, *et al.* 1999), ya que los AGPI son altamente susceptibles de oxidarse (Reaven P, *et al.* 1993). De hecho, se ha observado en estudios experimentales con modelos animales y en estudios clínicos con humanos (Berry EM, *et al.* 1991), que el consumo de una dieta enriquecida con ácido linoleico aumenta la oxidación de las LDL (Berry EM, *et al.* 1991; Thomas MJ, *et al.* 1996). Esto es importante, ya que existen evidencias que nos indican que el daño oxidativo tiene un papel fundamental en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis, el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas (Wu LL, *et al.* 2004).

No obstante, evidencias recientes nos indican que algunos componentes bioactivos contenidos en los frutos secos podrían contrarrestar el efecto pro-oxidante que ejercen los AGPI sobre las LDL (Zambon D, *et al.* 2000, Iwamoto M, *et al.* 2002, Ros E, *et al.* 2004). Diversos

componentes fitoquímicos comunes en los frutos secos, como por ejemplo polifenoles o los fitoesteroles, ejercen una variedad de acciones implicadas en actividades antioxidantes. Estos fitoquímicos podrían trabajar en sinergia con otros constituyentes importantes de los frutos secos como las vitaminas antioxidantes (α -tocoferol, γ -tocoferol) y minerales que disminuyen el daño oxidativo a lípidos y/o proteínas lo que retardaría la progresión de la placa aterosclerótica y el desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas (Chen CY, *et al.* 2008).

Sin embargo, el efecto del consumo de los frutos secos sobre la oxidación ha sido poco estudiado. De hecho, solo un número reducido de estudios de intervención ha evaluado el efecto del consumo de frutos secos sobre el estrés oxidativo, y solamente en ocho de estos estudios, la oxidación fue el objetivo principal de estudio. Estos ensayos clínicos han sido realizados sobre diferentes poblaciones, usando diversos tipos de frutos secos, y el daño oxidativo ha sido analizado mediante distintas técnicas y enfoques, lo cual podría explicar los resultados contradictorios que se han obtenido (Lopez-Uriarte P, *et al.* 2009). El efecto de los frutos secos sobre la función endotelial ha sido también escasamente estudiado y con resultados contradictorios (Ros E, *et al.* 2004, Schutte AE, *et al.* 2006).

Por todo lo anterior, se propuso llevar a cabo dos estudios experimentales, el primero de ellos mediante un modelo experimental de ratones para investigar los efectos que produciría el consumo de una dieta estándar enriquecida con nueces enteras y otra con piel de nuez, sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo y la capacidad antioxidante del animal. Asimismo se planteó la necesidad de realizar un segundo estudio en humanos, en este caso con la finalidad de analizar los efectos que produciría el consumo crónico de una mezcla de frutos secos sobre diversos marcadores plasmáticos de estrés oxidativo, sobre la capacidad antioxidante y la función endotelial determinada "*in vitro*" e "*in vivo*" en un grupo de adultos con síndrome metabólico, exentos de diabetes mellitus tipo 2.

HIPÓTESIS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

III. HIPÓTESIS

Estudio 1

El consumo crónico de dietas estándar enriquecidas con nueces enteras o con extracto de la piel de nuez reduce el estrés oxidativo en comparación al consumo de una dieta estándar sin nueces añadidas en ratones.

Estudio 2

El consumo regular de 30 g/día de una mezcla de frutos secos, en el contexto de una dieta cardiosaludable *ad libitum*, produce una reducción del estrés oxidativo y una mejoría de la disfunción endotelial en sujetos con síndrome metabólico sin ningún efecto deletéreo sobre el peso corporal.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

IV. OBJETIVOS

Estudio 1

En un modelo experimental de ratones sanos, comparar el efecto que produce el consumo de una dieta enriquecida con nueces enteras o bien con un extracto obtenido de la piel de nuez en comparación a una dieta control sobre:

- La formación de dienos conjugados del plasma.
- Las concentraciones plasmáticas de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).
- La capacidad antioxidante total del plasma.

Estudio 2

En un grupo de individuos con síndrome metabólico, comparar el efecto del consumo crónico de una dieta cardiosaludable respecto al efecto producido por el consumo de la misma dieta, suplementada con una mezcla de 30 g diarios de frutos secos, sobre:

- La capacidad antioxidante total del plasma.
- La formación de dienos conjugados del plasma.
- La concentración urinaria de isoprostanos producidos.
- La concentración urinaria de 8-oxodG producidos.
- Las concentraciones plasmáticas de las moléculas de adhesión celular (ICAM-1 y VCAM-1).
- La tonometría arterial periférica.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

MATERIALES Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Efecto del consumo crónico de nuez entera y de extracto de piel de nuez sobre el estado oxidativo en ratones

1.1. Diseño del estudio

Estudio de intervención, de diseño en paralelo, controlado y aleatorizado de 8 semanas de duración, realizado con la finalidad de evaluar el efecto que produce el consumo de dos dietas estándar, la primera enriquecida con nueces enteras y la segunda con un extracto de piel de nuez, sobre diferentes parámetros de estrés oxidativo en un modelo experimental de ratones sanos.

1.2. Modelos de experimentación animal

Se utilizaron treinta y seis ratones machos de la cepa C57BL/6J de 5 semanas de edad, procedentes de los Laboratorios Charles River (Barcelona, España). Los animales se estabularon bajo condiciones ambientales controladas, a una temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa entre 40% a 60%, alternando ciclos automáticos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos aplicados en este protocolo de investigación fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Animal de la Universitat Rovira i Virgili (Tarragona, España). Los animales se mantuvieron en las condiciones de estabulación y manipulación establecidas en las directrices de alojamiento y cuidado de animales de la Directiva 86/609 del Consejo de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económico, publicadas en noviembre 24 de 1986 (Artículo 5).

1.3. Dietas experimentales

Después de un período de adaptación de 14 días, los ratones fueron asignados de manera aleatoria a recibir *ad libitum* una de tres dietas experimentales durante ocho semanas:

- a) Grupo control, los ratones fueron alimentados exclusivamente con la dieta estándar de mantenimiento A04-Panlab (Barcelona, España) en forma de pienso en "pellet".
- b) Grupo nuez entera, los ratones consumieron la misma dieta estándar de mantenimiento que el grupo control, suplementada con un 10% en forma de nueces, las cuales fueron trituradas y mezcladas en forma de pienso peletizado.
- c) Grupo piel de nuez, los ratones consumieron también la dieta estándar de mantenimiento A04-Panlab, suplementada con un 2% del extracto de piel de nuez mezclado con el pienso.

La determinación de los porcentajes de los suplementos adicionados a la dieta estándar (nueces enteras molidas y el extracto de la piel de las nueces), se hizo en base a las recomendaciones de consumo de frutos secos para individuos sanos obtenidas de las guías alimentarias de distintos países (Haddad EH, *et al.* 1999, Johnson RK, *et al.* 2000, Krauss RM, *et al.* 2000, Salas-Salvadó J, *et al.* 2001). Así pues, el porcentaje de frutos secos adicionado a la dieta de los ratones, corresponde al equivalente calórico de las recomendaciones nutricionales de frutos secos en humanos establecidas en 30g al día. En la tabla 5.1. se muestra la composición nutricional de los piensos y suplementos utilizados en las dietas experimentales, según los resultados obtenidos por el *Laboratoire de Recherche Alimentaire* en CEDEX, Francia.

Tabla 5.1. Composición de las dietas experimentales.

Variable	Dieta control	Dieta nueces enteras	Dieta extracto de piel de nuez
Energía total (kcal/kg)	2900	3323	3264
Hidratos de carbono (%)	60	49,5	50,6
Grasas (%)	3,1	9,6	6,8
AGS (%)	12,9	13,5	15,6
AGMI (%)	22,58	17,5	18,1
AGPI (%)	40,29	69,4	66,3
Proteína (%)	16,1	15,8	15,7
Fibra (%)	15,1	15,1	16,3
Cenizas (%)	5,1	4,3	4,3
Otros (%)	2,0	5,7	6,3

Abreviaturas: AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGS, ácidos grasos saturados.

Durante el período del estudio, el peso corporal se registró semanalmente usando una báscula electrónica de precisión. El consumo de alimento se registró dos veces por semana, calculando la cantidad de alimento consumido de la siguiente forma: comida consumida (g/días de reposición/animal) = (total alimento proporcionado - total alimento no consumido al momento de reposición) / número de animales por grupo.

1.4. Determinaciones analíticas

1.4.1. Sacrificio de los animales y obtención de muestras de sangre

Después de 8 semanas de intervención dietética y tras 12 horas de ayuno, los ratones fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de solución ketamina/xilacina combinada (100/10 mg/kg peso, respectivamente), que fue disuelta en una solución salina al 0,9%. La sangre se extrajo por punción cardíaca hasta la exanguinación y muerte. La sangre obtenida se recolectó en tubos con ácido etilendiaminatetracético (EDTA) usado como anticoagulante. Las muestras se procesaron inmediatamente y el plasma se almacenó en congelador de -80°C hasta el posterior análisis.

Con las muestras de plasma obtenidas se determinaron:

- la capacidad antioxidante total mediante los ensayos ORAC y FRAP
- la peroxidación lipídica mediante el perfil cinético de formación de dienos conjugados y
- la capacidad antioxidante (GSH, GSSH y cociente GSSG/GSH) mediante técnicas fluorimétricas.

1.4.2. Capacidad antioxidante del plasma (ensayo ORAC)

Para determinar la capacidad antioxidante del plasma se utilizó el método fluorimétrico descrito por Cao G y colaboradores (1993) y modificado por Ou y colaboradores (2001), basado en la inhibición de los radicales peroxilo que se generan a partir del 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH). Para ello se realizó una dilución 1:500 del plasma en solución tampón de fosfato de potasio (PBS) 75 mM (pH 7,4). Para la reacción se utilizaron 20 µL de la muestra diluida y 370 µL de fluoresceína 48 nM dispuestos en una placa de pocillos múltiples. Los reactivos se mezclaron y se incubaron durante 10 segundos antes del registro de la

fluorescencia inicial. Los radicales peroxilo se generaron con 10 μL del reactivo AAPH y la fluorescencia se monitoreó cada minuto durante 120 minutos a una longitud de onda de excitación de 485 nm (λ de excitación) y longitud de onda de emisión de 538 nm (λ de emisión) con un lector de placas de fluorescencia Fluoroskan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finlandia). El trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), un análogo de la vitamina E, fue usado como estándar. Los valores ORAC finales se calcularon mediante la regresión entre la concentración de Trolox y el área bajo la curva de la caída de fluorescencia, expresando los resultados como milimol de equivalentes Trolox por litro de plasma (mmol TE/L plasma) (Cao G, *et al.* 1993, Ou B, *et al.* 2001).

1.4.3. Capacidad antioxidante del plasma (ensayo FRAP)

Este método propuesto por Benzie y Strain (1996) se basa en la capacidad que tiene una muestra biológica, en este caso el plasma, de reducir un complejo férrico (Fe^{3+}) a su forma ferrosa (Fe^{2+}). El poder antioxidante de la muestra se cuantifica por colorimetría midiendo la absorbancia a 593 nm. Para ello se mezcló 1 mL de reactivo previamente temperado a 37°C (10 v/v de solución tampón de acetato 300 mM, pH 3,6 + 1 v/v de 2,4,6,-tripiridil-s-triazina 10 mM en HCl 40 mM + 1 v/v de FeCl_3 20 mM + 1,2 v/v de agua destilada) con 30 μL de cada muestra de plasma y los estándares. Todas las mediciones se realizaron por duplicado tras 4 minutos de reacción (Benzie IF, *et al.* 1996). La absorbancia se monitoreó con un espectrofotómetro UV-VIS (Perkin-Elmer Lambda 25, Beaconsfield, UK) equipado con 8 celdas y baño controlado por termostato. Los resultados se compararon con una curva estándar preparada con diferentes concentraciones de sulfato ferroso y los valores FRAP se expresaron como micromol hierro/litros de plasma ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{L plasma}$).

1.4.4. Peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados)

Para el análisis se utilizó un sistema de columnas desalinizadoras PD-10 para remover el EDTA del plasma (Amersham Biosciences). Como agente oxidante se utilizó el Cu^{2+} y la formación de dienos conjugados se midió a 234 nm durante 5 horas a 37°C, mediante el método descrito previamente por Spranger y colaboradores en 1998. Para ello, se eluyeron 50 μL de plasma mediante una columna con PBS hasta obtener una dilución final 1:75. La oxidación se inició en una cubeta espectrofotométrica con 1,5 mL del plasma eluído, 1,47 mL de PBS y 30 μL de

- solución CuCl_2 5mM (Spranger T, *et al.* 1998). Posteriormente se determinó el perfil cinético de formación de dienos conjugados (Figura 5.1.) del plasma, obteniéndose información relativa al:
- a) período de latencia o retraso (*lag time*), que representa el período previo al inicio de la oxidación (minutos) y que relaciona la resistencia de los lípidos en contra de la oxidación inducida por el Cu^{2+} ,
 - b) la tasa máxima de oxidación (V_{max}), que representa el incremento en la producción de dienos conjugados por unidad de tiempo (nmol/min/mL de plasma) y que se determinó mediante la absorptividad molar de dienos conjugados ($E_{240} = 29500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$),
 - c) la cantidad máxima de dienos conjugados (C_{max}) que se determinó usando el mismo valor de absorptividad molar utilizado para la V_{max} .
 - d)

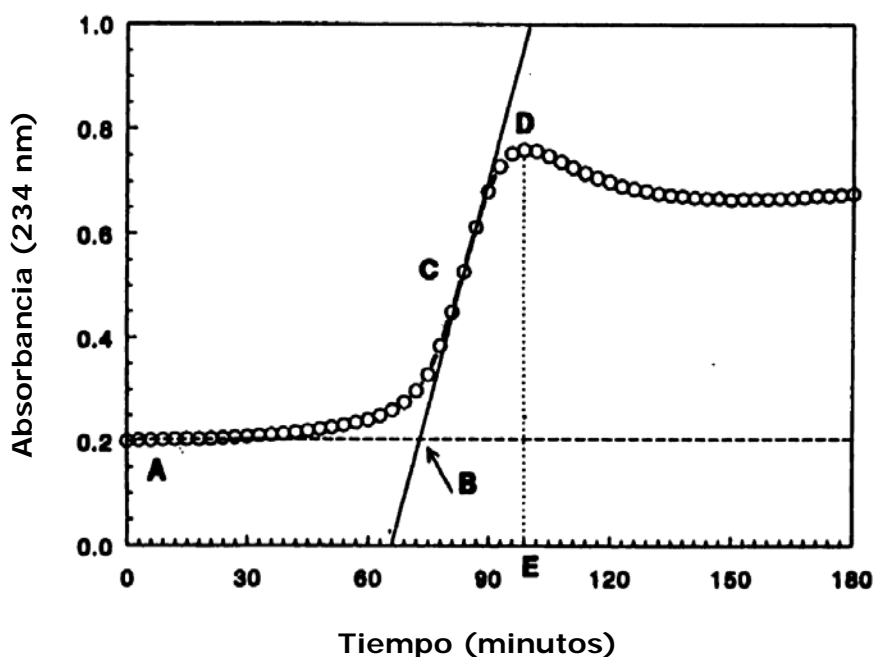


Figura 5.1. Perfil cinético de formación de dienos conjugados (partículas de LDL)
Abreviaturas: A: Basal; B: *lag time*; C: V_{max} ; D: C_{max} ; E: tiempo de oxidación
Fuente: Kleinveld HA, *et al.* 1992

1.4.5. Capacidad antioxidante (GSH, GSSG y el cociente GSSG/GSH)

La determinación de las concentraciones de GSSG y GSH se hizo mediante fluorimetría con el método descrito por Hissin y Hilf (1976). Se utilizó un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50B (Whaltman, Mass, USA), realizando las lecturas a una longitud de onda de excitación de 350 nm y longitud de onda de emisión de 420 nm. Cuando el glutatión se encuentra en su forma

reducida (GSH), actúa como un antioxidante y se transforma hacia su forma oxidada (GSSG), por lo que la determinación del cociente GSSG/GSH ayuda a identificar el grado de estrés oxidativo que se puede presentar en diversas muestras biológicas. Para el ensayo GSH, las muestras de plasma se diluyeron 1:10 en solución tampón fosfato-EDTA pH 8,0. Se hizo una segunda dilución, en este caso de 1:20 en la cubeta de reacción con la muestra de plasma diluído (100 μ L) y solución tampón PBS (1,8 μ L), que se mezcló después con 100 μ L de solución O-Phtalaldehído (OPT) pH 8,0 (Sigma Chemicals, Company). Después de homogeneizar la mezcla y tras un período de incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, la muestra se transfirió a una cubeta de reacción y se hizo la lectura con el espectrofluorímetro en las condiciones especificadas al inicio del apartado. Para el ensayo GSSG y debido a que el GSSG reacciona también con el OPT, pero lo hace a un pH 12,0, cada muestra de plasma (50 μ L) se incubó en 20 μ L de *N*-etil-maleímida 0,04 M (Merck) durante 25 minutos a temperatura ambiente, mezcla a la que se adicionó 430 μ L de solución tampón NaOH 0,1 N, para obtener el pH requerido (pH 12,0). Se utilizaron 100 μ L de esta mezcla para medir el GSSG, utilizando el procedimiento descrito para el ensayo GSH, con la diferencia que se usó solución tampón NaOH 0,1 N como diluyente, en lugar de solución tampón de fosfato EDTA (Hissin PJ, *et al.* 1976). Los resultados se expresan en nanomol por mililitro de plasma (nmol/mL plasma) y la relación entre los dos parámetros se obtuvo al dividir el valor del GSSG entre el GSH.

1.4.6. Capacidad antioxidante de las dietas experimentales y los suplementos (ensayos ORAC-hidrofílico y ORAC-lipofílico)

La capacidad antioxidante de todos los piensos y suplementos suministrados a los ratones se determinó en muestras sólidas de la nuez entera, la piel de nuez, la dieta estándar, la dieta estándar con nuez entera y la dieta estándar con el extracto de piel de nuez, de acuerdo al método descrito en el apartado 1.4.2. de este capítulo. Para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos y lipofílicos de los piensos y suplementos se utilizó el ensayo ORAC. Para la fracción lipofílica se extrajo 1 g de cada muestra sólida triturada en una solución de hexano/diclorometano (1:1, hex/dcm). Los extractos obtenidos se secaron bajo corriente de nitrógeno en baño de agua a 30°C y los residuos se reconstituyeron en 1 mL de acetona. Para la fracción hidrofílica se extrajeron las muestras de los piensos y los suplementos a analizar mediante solución de acetona:agua:ácido acético (70:29,5:0,5). Para el ensayo ORAC de

ambas fracciones se realizó una dilución 1:100 previa de las muestras. La capacidad antioxidante se expresó como micromol de equivalentes Trolox por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$ de muestra).

1.5. Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como media (desviación estándar). Para comprobar si las variables siguieron una distribución normal se aplicó la prueba estadística de Kolgomorov-Smirnov. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para evaluar si existían diferencias significativas al inicio del estudio en las variables peso corporal y consumo alimentario entre los grupos de intervención. La comparación de las variables del estudio entre el inicio y final de la intervención, dentro del mismo grupo y entre los grupos se realizó mediante prueba t de *Student* para datos apareados y el ANOVA con correcciones post-hoc. El nivel de significación estadística para todas las pruebas se estableció en $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS/PC, versión 15,0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

2. Efecto del consumo de frutos secos sobre el estado oxidativo y la función endotelial en individuos con síndrome metabólico

2.1. Diseño del estudio

Estudio clínico de diseño en paralelo, controlado y aleatorizado, de 12 semanas de duración, realizado para evaluar el efecto del consumo de frutos secos sobre diversos parámetros oxidativos y de función endotelial en un grupo individuos con síndrome metabólico.

El presente protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitari Sant Joan de Reus. El estudio fue registrado en el *International Standard Randomised Controlled Trial* con el número: ISRCTN36468613. Todos los sujetos dieron su consentimiento voluntario a participar en el estudio, tras ser plenamente informados de forma oral y escrita del objeto de estudio y de los procedimientos a seguir.

2.2. Sujetos de estudio

Durante el período de octubre de 2005 a febrero de 2007 se entrevistaron individuos de ambos sexos con síndrome metabólico y edad comprendida entre 18 y 65 años, que provenían de tres centros de atención primaria de las comarcas del Baix Camp (Riudoms y Reus) y Alt Camp (Alcover) en Tarragona, así como del Hospital Universitari Sant Joan de Reus para valorar si cumplían con los criterios de inclusión de este protocolo de investigación.

Para el diagnóstico de síndrome metabólico, los individuos debían cumplir al menos con tres de los cinco componentes diagnósticos propuestos por el grupo de expertos del NCEP-ATPIII (Grundy SM. 2005):

- circunferencia de cintura ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres;
- triglicéridos ≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L) o recibir tratamiento farmacológico para hipertrigliceridemia;
- c-HDL < 40 mg/dL (0,9 mmol/L) en hombres y < 50 mg/dL (1,1 mmol/L) en mujeres o recibir tratamiento farmacológico para aumentar el c-HDL;
- presión arterial sistólica ≥ 130 mm Hg o presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg o recibir tratamiento farmacológico antihipertensivo;
- glucosa en ayunas ≥ 100 mg/dL o recibir tratamiento farmacológico para la glucosa elevada

Los criterios de exclusión fueron:

- índice de masa corporal > 35 kg/m²;
- alergia al consumo de frutos secos;
- presencia de diabetes mellitus tipo 2 con o sin tratamiento farmacológico;
- presencia de alguna enfermedad inflamatoria, infecciosa, pulmonar obstructiva, neoplásica, endocrina o hematológica activa, o bien de algún proceso infeccioso agudo o crónico;
- presentar leucocitosis al inicio del estudio (leucocitos > 10000 células $\times 10^6$);
- toma de tratamiento farmacológico antiinflamatorio, corticoides, hormonas o antibióticos en la semana previa al inicio del estudio;
- presencia de enolismo o drogodependencia activa, excluyendo el tabaquismo;
- haber seguido una dieta muy restrictiva durante los 3 meses anteriores al inicio del estudio o una pérdida de peso corporal superior a 5 kg en los últimos 3 meses.

En cita previa al inicio del estudio, médicos de los centros de atención primaria y del Hospital Universitari Sant Joan de Reus realizaron el cribado de los pacientes elegibles mediante una entrevista personal, el análisis bioquímico y el historial clínico, con el propósito de corroborar el estado de salud de los individuos y su adecuación para el estudio.

2.3. Dietas de intervención

Tras la visita de pre-inclusión, los pacientes seleccionados fueron estratificados por sexo y edad (<50 años o \geq 50 años) y aleatorizados mediante el uso de una tabla de números aleatorios a seguir una de las dos dietas de intervención:

- a) Grupo control. Los sujetos adscritos a este grupo recibieron recomendaciones dietéticas cualitativas para seguir una dieta cardiosaludable, en base a las recomendaciones de la *American Heart Association* (AHA) (Krauss RM, *et al.* 2000). Además, a todos ellos se les remarcó especialmente, que no consumieran ningún tipo de fruto seco o cacahuetes durante el período del estudio
- b) Grupo frutos secos. Los sujetos recibieron las mismas recomendaciones dietéticas cualitativas del grupo control, pero además se les suplementó diariamente con 30 g de una mezcla de frutos secos crudos (15 g de nuez + 7,5 g de almendra + 7,5 g de avellana) que se les facilitaban de manera gratuita.

De manera general, las recomendaciones de la dieta cardiosaludable que recibieron los participantes de ambos grupos de intervención incluían, además de la reducción del consumo de cualquier fuente de grasa, un mayor consumo de frutas y verduras, preferir el consumo de granos enteros y productos alimentarios libres de grasa o de bajo contenido de grasa, consumir pescado al menos dos veces por semana, limitar el consumo de carnes rojas seleccionando carnes blancas en su lugar, limitar el consumo de grasas trans y/o grasas saturadas y colesterol, así como de alimentos que contengan aceites vegetales parcialmente hidrogenados, bebidas azucaradas y alimentos con azúcar adicionada, seleccionar y preparar alimentos con poca o sin sal añadida y reducir el consumo de alcohol.

Con el objetivo de mejorar el seguimiento y la adherencia a las recomendaciones dietéticas indicadas, se ofreció consejo nutricional especializado en las entrevistas personales que se hicieron durante estudio (al inicio y cada cuatro semanas). Por último, se recomendó a todos los participantes que no cambiaran el patrón de actividad física habitual, ni tampoco el hábito tabáquico, en caso de ser fumadores.

2.4. Evaluación clínica, antropométrica y actividad física

Al inicio del estudio, en la cuarta, octava y en la última semana de la intervención, se determinó la tensión arterial, el peso, la talla (sólo en visita inicial), el perímetro de la cintura, y se estimó el nivel de actividad física.

La presión arterial sistólica y diastólica se determinaron por duplicado en el brazo no dominante utilizando un oscilómetro electrónico semiautomático (Omron® 705IT) siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Europea de Hipertensión y de la Sociedad Europea de Cardiología (Redon J, *et al.* 2003). El peso corporal se midió usando una báscula electrónica (Tanita® TBF-300). En la medición de la talla, se utilizó un estadiómetro de pared (Holtain Ltd, Crymych, DYFED, Britain), para lo que se colocó al sujeto de pie, sin zapatos y se ajustó la barra superior sobre el vértice más prominente de la cabeza, registrando la talla con una precisión de lectura de 0,1 cm. La circunferencia de cintura se midió en el punto medio, ubicado entre el borde costal inferior y el reborde superior de la cresta iliaca, con el sujeto en bipedestación, registrando la medición al final de una espiración suave. Mensualmente se estimó el gasto energético promedio diario debido a la actividad física realizada usando un cuestionario de actividad física de tiempo libre de Minnesota (Taylor HL, *et al.* 1978), validado en población española (Elosua R, *et al.* 1994).

2.5. Evaluación de la ingesta dietética

Se evaluó mediante el registro alimentario de 3 días (2 días laborables y 1 día festivo) que los mismos pacientes completaban, en base a las indicaciones proporcionadas personalmente. Durante cada visita mensual de seguimiento, los registros dietéticos fueron revisados y completados junto con el paciente. Posteriormente, cada registro de alimentos fue codificado

para facilitar la captura de la información dietética en una base de datos. Después de la captura de la información dietética, se obtuvieron los valores de la ingesta energética total y de los nutrientes consumidos en la dieta utilizando las tablas españolas de composición de alimentos (Mataix J, *et al.* 2003). El grado de adherencia a la intervención dietética se evaluó mediante el análisis de los registros de alimentos de 3 días y del recuento de los envases vacíos de frutos secos devueltos. Además, mediante cromatografía de gases se determinó la concentración plasmática del ácido α -linolénico, un componente mayoritario en la nuez, que se utilizó como marcador biológico del consumo de los frutos secos. Para ello, se seleccionaron al azar mediante tabla de números aleatorios, 27 individuos de ambos grupos de intervención (14 del grupo frutos secos y 13 del grupo control).

2.6. Obtención y procesado de muestras sanguíneas y orina

Al inicio y al final del estudio y tras 12 horas de ayuno, se extrajeron por punción venosa muestras de sangre de todos los pacientes del estudio. La sangre se recogió en tubos de plasma-EDTA y de suero. Una parte de las muestras de sangre se remitían el mismo día de la extracción al laboratorio de referencia (Hospital Universitari Sant Joan de Reus) para su inmediato procesamiento y determinación del: hemograma, recuento y fórmula leucocitaria, velocidad de sedimentación globular, albúmina, colesterol total, c-HDL, triglicéridos, glucosa, sodio, potasio, urea, creatinina, ácido úrico y transaminasas. Las muestras restantes se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se transfirieron a alícuotas de 0,5 mL de plasma y suero y se procedió a su almacenamiento a -80°C hasta el análisis posterior. Los pacientes recogieron la orina excretada durante las 24 horas previas a la visita inicial y a la visita final. Después de la homogeneización de la orina, se almacenaron dos muestras de orina por paciente (2 x 10 mL) en un congelador de -20°C hasta su procesamiento.

2.6.1. Capacidad antioxidante del plasma (ensayo ORAC)

La capacidad antioxidante del plasma se determinó mediante el método fluorimétrico descrito por Cao y colaboradores (1993) y modificado por Ou y colaboradores (2001), descrito en el punto 1.4.2. de este capítulo.

2.6.2. Peroxidación lipídica del plasma (partículas LDL-oxidadas)

Mediante un kit comercial ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*) Merckodia (Uppsala, Suecia) se determinaron los niveles circulantes de las LDL oxidadas en plasma, con un coeficiente de variación intra e inter-ensayo de 6,33% y de 4,73% respectivamente.

2.6.3. Peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados)

La peroxidación lipídica del plasma se evaluó mediante la determinación de los índices de formación de dienos conjugados. Para ello, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 1.4.4. de este capítulo.

2.6.4. Peroxidación lipídica en muestras de orina (producción de isoprostanos)

Se extrajeron los isoprostanos de las muestras de orina mediante columnas de inmunoafinidad (Cayman Chemical Corporation, Ann Arbor, MI). Para ello, se inyectó un total de 0,5 mL de orina a las columnas, que se lavaron con 2 mL de 0,1 mol/L de PBS, seguido de 2 lavados con 2 mL de agua. Los isoprostanos se eluyeron de la columna con 2 mL de una solución de etanol al 95% (Makino A, *et al.* 2002). Posteriormente, se determinó la concentración urinaria de isoprostanos mediante la técnica de inmunoensayo enzimático (EIA) usando kits comerciales (Cayman Chemical Corporation, Ann Arbor, MI). Las lecturas de las placas se realizaron a 405 nm en un Multiskan EX, Thermo Labsystems y los resultados se expresaron en nanogramos (ng) de isoprostanos/mmol de creatinina.

2.6.5. Daño oxidativo al ADN en muestras de orina (producción de 8-oxodG)

Para la determinación del 8-oxodG se adicionó, a 1 mL de orina, 100 µL de solución 3 mol/L Tris-EDTA (pH 8,6) agitándose durante 30 seg. La solución obtenida se colocó en una columna Bond Elute C18 (OH) SPE (3 mL), previamente preparada con 3 mL de metanol y 3 mL de agua. Después se lavó la columna con 3 mL de agua, seguido de 3 mL de acetonitrilo 2,5% y metanol 1,5% en 10 mmol/L de solución tampón de borato (pH 7,9). La muestra se eluyó con 3 mL de esta misma solución tampón y se inyectó a una columna de intercambio de cationes Bond Elute preparada con 3 mL de metanol y 3 mL de solución tampón de borato (pH 7,9). El 8-oxodG se eluyó con 2 mL de solución de acetonitrilo/metanol en solución tampón de borato, ajustando el pH a 6,0. A 2 mL del eluyente se le adicionaron 4 mL de una mezcla de

diclorometano:propano-2-ol (50:50) y se agitó en vórtex durante 30 seg. La muestra se centrifugó 10 minutos a 3500 rpm y se eliminó la fase líquida superior. Posteriormente se evaporaron 3 mL de la fase orgánica hasta la sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 50°C. Finalmente, la muestra se reconstituyó en 1 mL de solución tampón para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) sin acetronilo y se inyectaron 50 µL de esta muestra a una columna de HPLC (Brown ED, *et al.* 1995). Para separar el 8-oxodG se usó una bomba HPLC modelo Waters 515, mediante columna 5 µm Spherisorb ODS2 (4,6 mm x 250 mm) a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se empleó una solución tampón de 50 mmol/L de PBS (pH 5,1) en 5% de acetronilo, con un tiempo de retención de 7,5 minutos. Para evaluar la precisión y optimización del ensayo HPLC/CE (HPLC/detección electroquímica) para aislar y detectar el 8-oxodG, se obtuvieron diariamente cromatogramas de las muestras y los patrones utilizados (Espinosa O, *et al.* 2007). Los valores del 8-oxodG se expresaron como el cociente de la concentración de creatinina en la orina, en milimol por mililitro (mmol/mL).

2.6.6. Marcadores plasmáticos de función endotelial (moléculas de adhesión celular vascular)

Mediante un kit comercial ELISA (Enzyme Linked Inmunoabsorbent Assay) Diaclone (Besançon, Francia), se determinaron las concentraciones plasmáticas de las moléculas solubles de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y de las moléculas solubles de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), con un coeficiente de variación intra e inter-ensayo de 2,82-8,15% y 2,27-5,94%, respectivamente.

2.6.7. Función endotelial *in vivo* (tonometría arterial periférica)

La función endotelial se evaluó *in vivo* mediante el sistema EndoPAT-2000 (Itamar-Medical Ltd, Caesarea, Israel), una tecnología no invasiva, validada y utilizada previamente para evaluar el tono vascular arterial periférico en diversas poblaciones (Lavie P, *et al.* 2000, Bonetti PO, *et al.* 2003a, Bonetti PO, *et al.* 2003b, Goor DA, *et al.* 2004, Hamburg NM, *et al.* 2008).

El EndoPAT-2000 es un equipo digitalizado de registro y dos dispositivos de medición adaptados con biosensores semejantes a un "dedal" grande y que están recubiertos por una sonda de látex inflable. Ambos dedales están conectados a un dispositivo que mide el flujo sanguíneo. El cambio del volumen sanguíneo del pulso arterial se detecta en la punta de los dedos de la mano, mediante una señal fisiológica de tonometría arterial periférica (PAT), que

proporciona un índice confiable y reproducible (índice PAT) que valora la función endotelial (Munzel T, *et al.* 2008). Este método se basa en la medición de las variaciones de la amplitud de la onda del pulso durante una hiperemia reactiva (Rubinshtein R, *et al.* 2010) (Figura 5.2.).

Durante la realización de esta prueba el individuo permanecía en decúbito supino. Se colocaba un dedal en el dedo índice de la mano que se sometería a la prueba de hiperemia (brazo test) y el otro dedal en el dedo índice contra-lateral. Se inflaba el interior de los dos dedales (sonda de látex) mediante un dispositivo conectado al ordenador, que aplica una presión uniforme de 70 mmHg (predeterminada por la presión arterial diastólica de referencia) en ambos dedos, lo que previene la estasia sanguínea y la distensión venosa que ocurriría en la insuflación del manguito durante la fase de hiperemia (Munzel T, *et al.* 2008). Posteriormente se aseguraba el manguito del tensiómetro al brazo test y registraban tres lecturas del flujo sanguíneo cada 5 minutos: la lectura basal, con el manguito del tensiómetro desinflado; la lectura de oclusión, que se producía tras inflar el manguito del tensiómetro a 60 mmHg por encima de la presión arterial sistólica basal del sujeto o, insuflando el manguito a 200 o 300 mmHg para ocluir el flujo sanguíneo y provocar la isquemia braquial y, por último, durante la hiperemia reactiva, al desinflar el manguito del tensiómetro y liberar de la oclusión del flujo sanguíneo a la arteria braquial. La señal PAT registrada se enviaba y almacenaba continuamente al ordenador.

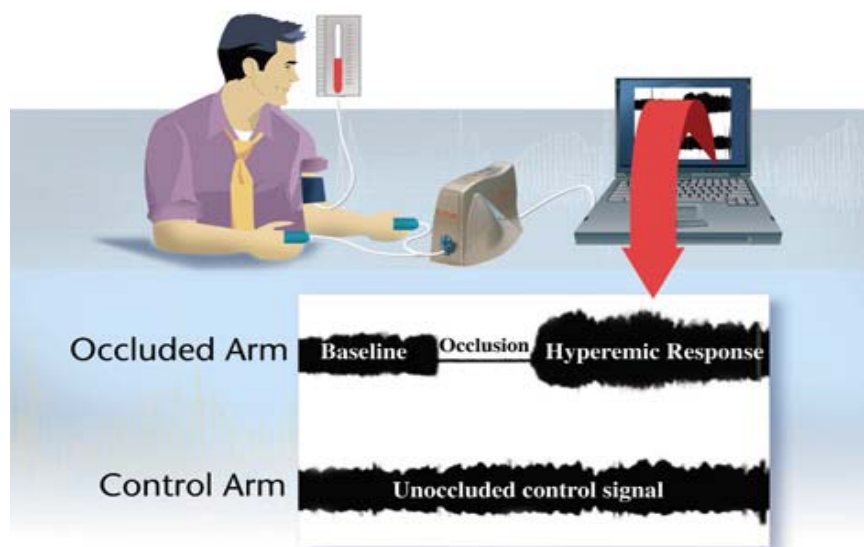


Figura 5.2. Sistema EndoPAT-2000.

Los datos obtenidos se procesaban automáticamente mediante un algoritmo del programa informático del sistema EndoPAT-2000 (Itamar-Medical Ltd, Caesarea, Israel). La señal PAT resultante comparaba la medición del brazo test con el brazo contra-lateral, la cual adaptaba de acuerdo a las alteraciones sistémicas registradas del brazo test. Al finalizar, el sistema EndoPAT-2000 calcula la respuesta a la hiperemia reactiva y registra el índice PAT.

2.7. Análisis estadísticos

Debido a la escasez de estudios publicados en el momento del diseño del estudio que hubieran evaluado el efecto del consumo de frutos secos sobre diversos parámetros oxidativos en pacientes con síndrome metabólico, el tamaño de la muestra fue calculada a partir del análisis de la respuesta al cambio del c-LDL obtenido en estudios similares con pacientes hipercolesterolémicos (Jenkins DJ, *et al.* 2002, Sabate J, *et al.* 2003, Ros E, *et al.* 2004). Utilizando el programa Epi-Info se calculó que serían necesarios 26 sujetos por cada tratamiento para detectar diferencias entre los grupos con un grado de error α del 5% y una potencia para detectar esa diferencia del 80%, considerando un 10% de pérdidas de la muestra.

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar el patrón de distribución de las variables cuantitativas. Debido a que la distribución de la variable Cmax no seguía un patrón de distribución normal, esta variable se analizó mediante pruebas no paramétricas. Las variables cuantitativas se expresaron como media (desviación estándar) o media (intervalo de confianza del 95%). La variable Cmax se expresó como mediana [rango intercuartil]. Las variables cualitativas se expresan en número de participantes y porcentaje. Para evaluar si existían diferencias significativas al inicio del estudio de las variables entre los grupos de intervención, se utilizaró la *t-Student* para las variables cuantitativas y el test de Chi-cuadrado para las variables cualitativas. Los cambios entre el inicio y el final de la intervención dentro del mismo grupo se analizaron mediante la prueba *t-Student* para datos apareados o la prueba de Wilcoxon, si no se cumplía la condición de normalidad de la distribución de los valores. Los cambios entre los grupos de intervención se analizaron mediante la prueba de *t-Student* para datos independientes o la prueba U de Mann-Whitney, si no se cumplía la condición de normalidad. Además, para descartar el posible efecto del cambio de peso corporal entre los

grupos, se hizo un análisis de la covarianza (ANCOVA) del cambio entre los grupos del 8-oxodG, introduciendo el cambio de peso corporal como covariable. El nivel de significación estadística para todas las pruebas se estableció en $p < 0,05$. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS/PC, versión 15,0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

VI. RESULTADOS

1. Efecto del consumo crónico de nuez entera y extracto de piel de nuez sobre el estado oxidativo en ratones

1.1. Capacidad antioxidante de las dietas experimentales y los suplementos (ensayos ORAC-hidrofílico y ORAC-lipofílico)

En la figura 6.1. se observa la capacidad antioxidante (ensayo ORAC, ORAC-H, ORAC-L) de las tres dietas experimentales y de los suplementos (nueces enteras y el extracto de la piel de nuez) utilizados para enriquecer el pienso de los ratones durante el estudio. Como se puede observar en la figura 6.1. el extracto obtenido de la piel de nuez mostró una mayor capacidad antioxidante que las nueces enteras, particularmente en su fracción hidrofílica. Estos resultados sugieren que numerosos compuestos potencialmente antioxidantes están contenidos principalmente en la piel de las nueces.

En relación a la capacidad antioxidante de las dietas experimentales, se observó que ambas dietas enriquecidas con nueces (nuez entera o extracto de piel de nuez), comportaron un incremento de los valores ORAC respecto a los valores de la dieta control. Se sugiere por ello, que las dos dietas enriquecidas con nueces poseen una mayor capacidad antioxidante, principalmente en su fracción hidrofílica (Figura 6.1.).

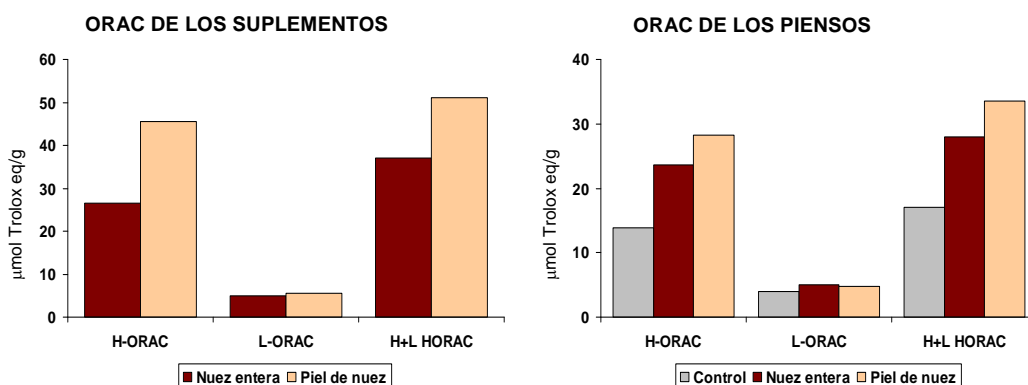


Figura 6.1. Capacidad antioxidante de los suplementos y las dietas experimentales.

1.2. Peso corporal y consumo de alimentos

En relación al cambio promedio de peso corporal y la cantidad de alimento que consumieron los ratones, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de intervención durante el estudio (Tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Características del peso corporal en los animales de experimentación.

Variable	Grupo control	Grupo nuez entera	Grupo extracto de piel de nuez	P
Peso corporal (g)				
Basal	22,18 ± 0,51	21,68 ± 0,26	21,39 ± 0,41	0,419
Final	29,24 ± 0,82	28,04 ± 0,48	28,72 ± 0,59	0,432
Cambio	7,05 ± 0,52	6,36 ± 0,50	7,33 ± 0,86	0,561

Valores se expresan como promedio ± DE.
 Significancia estadística determinada por ANOVA.

1.3. Capacidad antioxidante del plasma (ensayos ORAC y FRAP)

Al evaluar la capacidad antioxidante del plasma mediante los ensayos ORAC y FRAP, se observó que los ratones que consumieron cualquiera de las dietas enriquecidas con nueces, exhibieron una menor capacidad antioxidante, respecto a aquellos ratones alimentados con la dieta control. Como se aprecia en la figura 6.2. el grupo de animales que consumió la dieta enriquecida con el extracto de la piel de nuez mostró una reducción de la capacidad antioxidante del plasma (ensayos ORAC y FRAP) estadísticamente significativa con respecto a lo ocurrido en el grupo control.

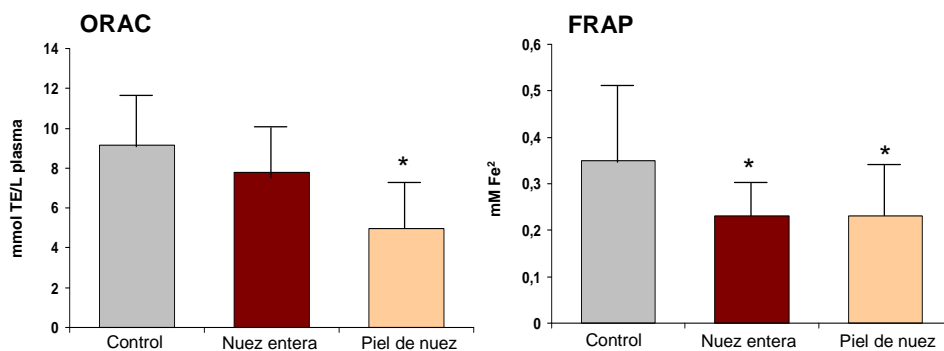


Figura 6.2. Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la capacidad antioxidante del plasma (ensayos ORAC y FRAP).

* P<0,05 versus grupo control. Significancia estadística determinada por ANOVA.

Resultados similares se observaron en el grupo alimentado con la dieta enriquecida con nueces enteras, aunque la reducción significativa de la capacidad antioxidante solo se observó en el ensayo FRAP.

1.4. Capacidad antioxidante del plasma (GSH, GSSG, y el cociente GSSG/GSH)

En la figura 6.3.A. se observa que, en comparación al grupo control, los dos grupos que consumieron las dietas enriquecidas con frutos secos mostraron una menor concentración plasmática de GSH, aunque las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas para el grupo que recibió la dieta con el extracto de piel de nuez ($P=0,020$).

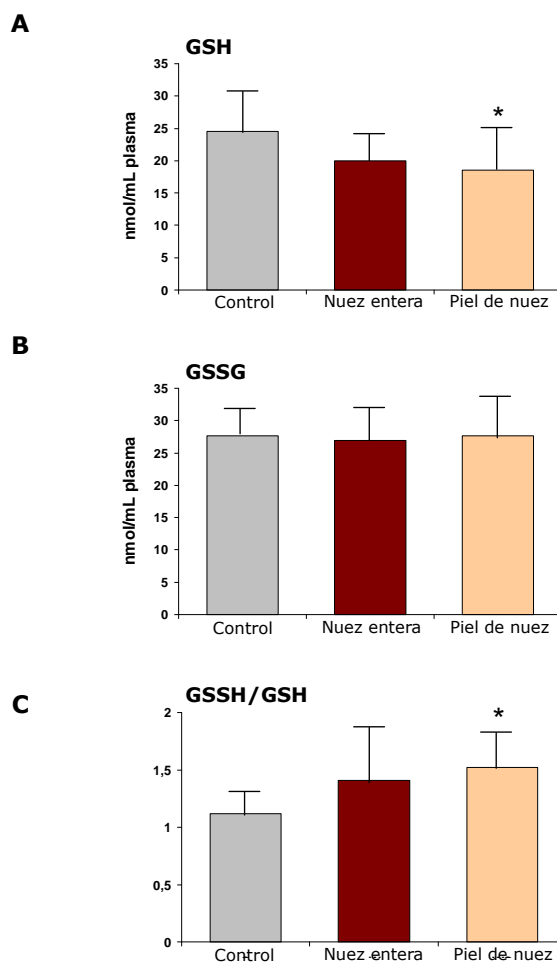


Figura 6.3. Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la capacidad antioxidante del plasma en relación a la concentración de glutatión (GSH, GSSG y el cociente GSSG/GSH).

* $P < 0,05$ versus grupo control. Significancia estadística determinada por ANOVA.

Al determinar las concentraciones plasmáticas de GSSG, no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos de intervención durante el período del estudio (Figura 6.3.B.), por lo que el cociente GSSG/GSH fue significativamente mayor en el grupo que consumió la dieta enriquecida con el extracto de la piel de nuez en comparación a aquellos ratones que consumieron la dieta control (Figura 6.3.C.).

1.5. Peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados)

La figura 6.4.A. muestra que los ratones que consumieron cualquiera de las dietas enriquecidas con nueces, aumentaron significativamente la producción de dienos conjugados en comparación a los alimentados con la dieta control. Cabe destacar que los ratones suplementados con nuez entera presentaron una mayor concentración de dienos conjugados ($p < 0,03$) en plasma en comparación a los que consumieron la dieta suplementada con el extracto de piel de nuez o la dieta control.

Con relación a los índices *lag time* y *Vmax*, no se observaron diferencias significativas entre los ratones alimentados con cualquiera de las tres dietas de intervención, tal y como se aprecia en las figuras 6.4.B. y 6.4.C.

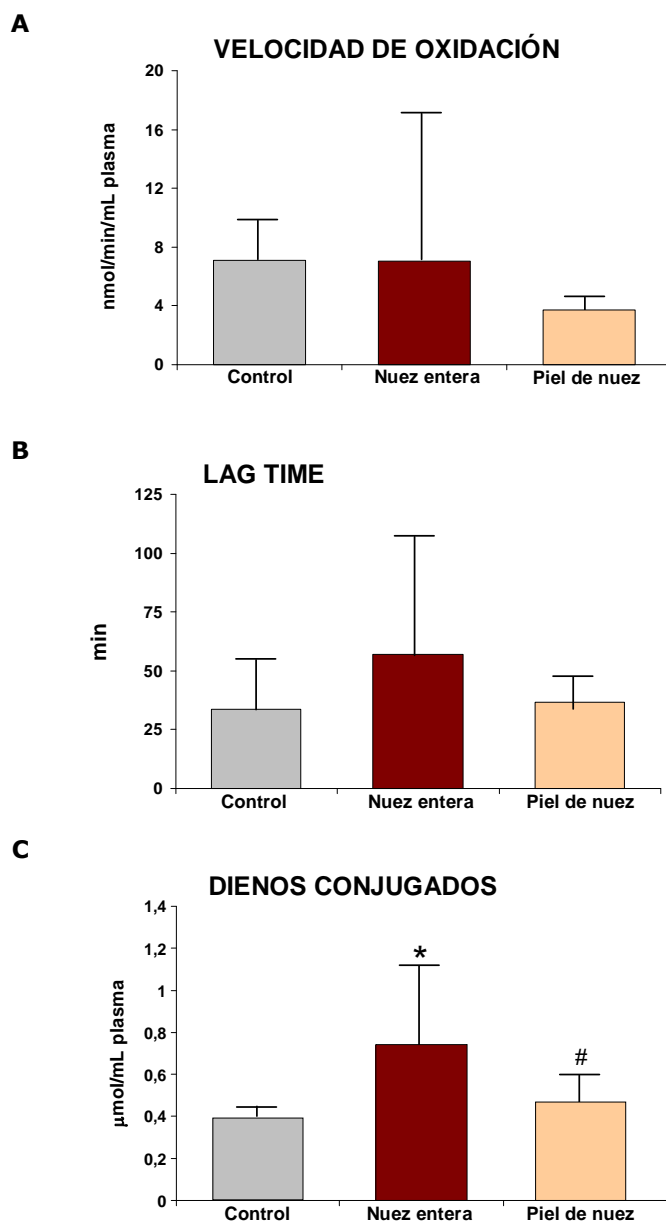


Figura 6.4. Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la peroxidación lipídica del plasma (perfil cinético de formación de dienos conjugados).
* $P < 0,05$ versus grupo control. # $P < 0,03$ versus grupo nuez entera.
Significancia estadística determinada por ANOVA.

2. Efecto del consumo de frutos secos sobre el estado oxidativo y la función endotelial en individuos con síndrome metabólico.

2.1. Grupo poblacional de estudio

En la Figura 6.5. se muestra el diagrama de flujo de los sujetos de estudio. De los 61 sujetos elegibles para participar en el estudio, 9 no cumplieron los criterios establecidos de inclusión. Así pues se aleatorizaron al estudio un total de 52 sujetos. Dos de ellos abandonaron el estudio por razones personales, por tanto se incluyeron un total de 50 sujetos en el análisis estadístico final, 25 de ellos en el grupo frutos secos y 25 en el grupo control.

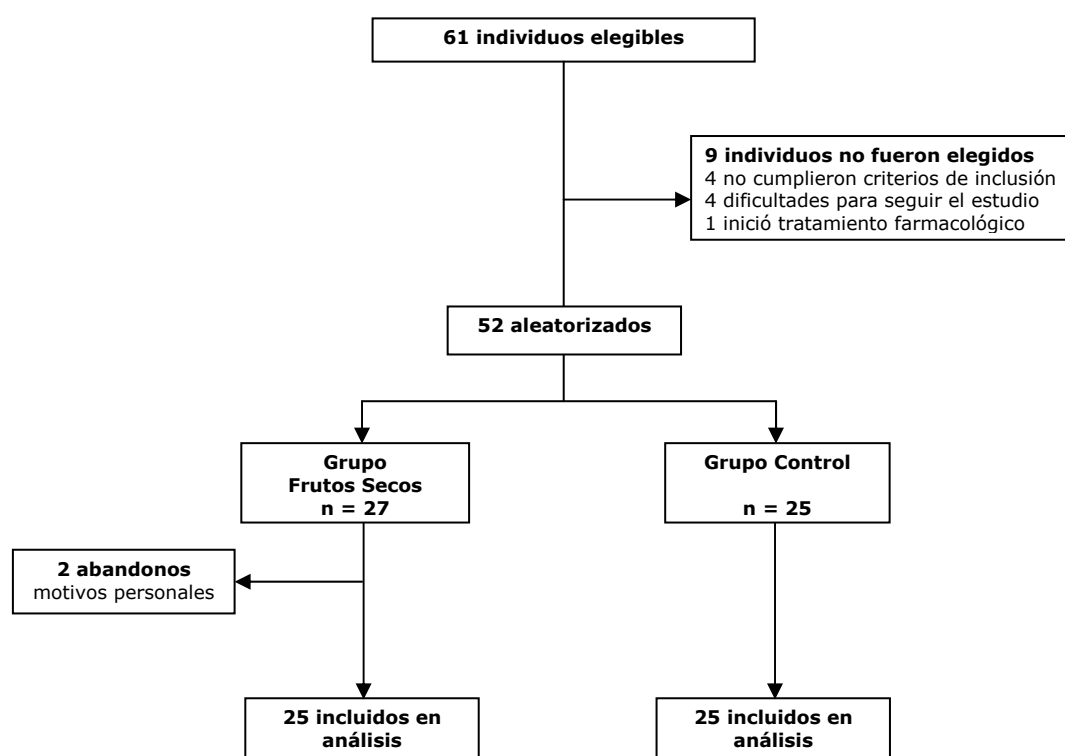


Figura 6.5. Diagrama de flujo de los individuos del estudio.

2.2. Características generales de los sujetos de estudio

En la Tabla 6.2. se resumen las características generales de la población de estudio. No se observaron diferencias significativas ni en la edad ni en la distribución de sexos entre grupos.

Tampoco se observaron diferencias significativas en la prevalencia de los distintos componentes del síndrome metabólico entre grupos.

Tabla 6.2. Características generales de los sujetos al inicio del estudio.

Variable	Grupo Frutos Secos (n=25)	Grupo Control (n=25)	P
Edad (años)	52,9 (8,4)	50,6 (8,4)	0,316
Sexo [n (%) hombres]	15 (60)	13 (52)	0,569
IMC (kg/m ²)	31,6 (30,5 a 32,8)	30,0 (28,6 a 31,4)	0,065
Componentes del síndrome metabólico			
Obesidad abdominal, n (%)	22 (88)	20 (80)	0,440
Hipertensión arterial, n (%)	24 (96)	22 (88)	0,297
Colesterol HDL bajo, n (%)	10 (40)	8 (32)	0,556
Triglicéridos elevados, n (%)	18 (72)	17 (68)	0,758
Glucosa en ayunas elevada, n (%)	19 (76)	17 (68)	0,529
Actividad física (kcal/d)	449 (231 a 668)	380 (249 a 511)	0,578

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidad.

Los valores se expresan como promedio (DE) o (IC 95%).

Significancia estadística determinada por t-Student y chi-cuadrada, según el tipo de variable.

2.3. Adherencia a las recomendaciones dietéticas

El cumplimiento del consumo de frutos secos se evaluó mediante el recuento del número de bolsas vacías de frutos secos devueltos por los voluntarios y la información de los registros alimentarios. Al finalizar el estudio se obtuvo un 94% de cumplimiento con el consumo de la mezcla de frutos secos proporcionados a los individuos asignados a este grupo. Además, en un subgrupo de 27 sujetos seleccionados al azar (n=14 del grupo frutos secos y n=13 del grupo control) se les determinó las concentraciones plasmáticas de ácido α -linolénico, como un indicador indirecto del consumo de frutos secos. En la tabla 6.3. se observa que aquellos sujetos que consumieron la mezcla de frutos secos aumentaron significativamente las concentraciones plasmáticas de ácido α -linolénico respecto a su valor basal (P=0,019), mientras que los individuos del grupo control no mostraron cambios significativos entre el inicio y final de la intervención (P=0,143). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los cambios de ácido α -linolénico ocurridos entre los dos grupos durante la intervención (P=0,423).

Tabla 6.3. Porcentaje de ácido α -linolénico plasmático de los sujetos del estudio

% de ácido α -linolénico	Grupo Frutos Secos (n=14)	Grupo Control (n=13)	P
Basal	0,26 \pm 0,07	0,21 \pm 0,06	0,081
Final	0,36 \pm 0,13	0,27 \pm 0,13	0,082
Cambio	0,10 \pm 0,14 ^a	0,06 \pm 0,13	0,423

Los valores se expresan como promedio (DE). Significancia estadística determinada por t-Student.

^a Cambio significativo respecto al valor basal

2.4. Ingesta de energía, nutrientes, fibra y alcohol

En la Tabla 6.4. se muestran los valores basales de ingesta total de energía (kcal/día), la distribución energética de los macronutrientes y alcohol (%) y el consumo de colesterol (mg/día) y fibra (g/día) que presentaron los individuos de ambos grupos. No se observaron diferencias significativas en el consumo de alimentos entre los grupos de intervención al inicio del estudio.

Tabla 6.4.- Ingesta basal de macronutrientes, colesterol, fibra y alcohol de la dieta.

Variable	Grupo Frutos Secos (n=25)	Grupo Control (n=25)	P
Energía (kcal/día)	2094 (1865 a 2322)	1993 (1801 a 2186)	0,493
% de energía aportada por:			
Hidratos de carbono	41,3 (38,5 a 44,1)	42,4 (40,0 a 45,0)	0,533
Proteínas	18,9 (18,0 a 20,2)	18,6 (17,2 a 20,0)	0,748
Grasa total	35,5 (33,1 a 38,0)	35,7 (33,2 a 38,1)	0,933
AGS	10,5 (9,4 a 11,5)	10,5 (9,4 a 11,7)	0,931
AGPI	5,4 (4,7 a 6,1)	5,0 (4,4 a 5,5)	0,353
AGMI	16,6 (14,5 a 18,4)	17,0 (15,6 a 18,5)	0,708
Alcohol	4,3 (2,0 a 6,6)	3,3 (0,9 a 5,7)	0,546
Colesterol (mg/día)	344 (307 a 381)	306 (271 a 341)	0,132
Fibra (g/día)	20,5 (17,3 a 23,7)	19,5 (15,9 a 23,1)	0,679

Abreviaturas: AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos poliinsaturados.

Los valores se expresan como promedio (IC 95%). Significancia estadística determinada por t-Student.

En la tabla 6.5. se observa que tras 12 semanas de intervención, los individuos de los dos grupos de intervención redujeron significativamente la ingesta diaria de energía (kcal/día) y de AGS (%), respecto a sus valores basales. Además se muestra en esta misma tabla, que el grupo control aumentó significativamente la ingesta de proteínas y disminuyó de manera significativa la ingesta de grasas totales y de AGMI en relación a los valores basales; mientras que los individuos del grupo frutos secos aumentaron significativamente la ingesta de AGPI durante el estudio. No se observaron diferencias significativas entre grupos de intervención en cuanto a los cambios ocurridos durante el estudio en cuanto a ingesta de energía o energía en forma de hidratos de carbono o alcohol, colesterol y fibra de la dieta (Tabla 6.5.). Sin embargo, los sujetos del grupo de frutos secos mostraron un aumento significativo del consumo de AGMI y AGPI, así como una reducción significativa del consumo de proteínas y colesterol en comparación a los individuos que consumieron sólo la dieta baja en grasa (dieta control).

Tabla 6.5. Efecto de la intervención sobre la ingesta de energía, macronutrientes, colesterol, fibra y alcohol de la dieta.

Variable	Grupo Frutos Secos	Grupo Control	Efecto del tratamiento ^a	
	Cambios	Cambios	Diferencia de los cambios entre grupos	P
Energía (kcal/día)	-209 (376 a -41) ^b	-393 (-552 a -234) ^b	184 (-41 a 409)	0,106
% de energía aportada por:				
Hidratos de carbono	0,2 (-2,2 a 2,7)	3,5 (-0,1 a 6,9)	-3.2 (-7.4 a 0.9)	0,130
Proteínas	0,3 (-1,2 a 1,8)	2,6 (0,8 a 4,3) ^b	-2,3 (-4,5 a -0,0)	0,046
Grasa total	0,8 (-1,6 a 3,2)	-4,6 (-7,4 a -1,8) ^b	5,4 (1,8 a 8,9)	0,004
AGS	-2,1 (-3,6 a -0,7) ^b	-2,4 (-3,6 a -1,2) ^b	0,3 (-1,5 a 2,1)	0,748
AGPI	2,1 (1,1 a 3,0) ^b	-0,2 (-0,9 a 0,5)	2,3 (1,1 a 3,5)	<0,001
AGMI	0,6 (-0,6 a 1,9)	-2,1 (-3,5 a 0,8) ^b	2,8 (1,0 a 4,6)	0,003
Alcohol	-1,3 (2,3 a -0,4) ^b	-1,4 (3,9 a 1,0)	- 0,1 (-2,5 a 2,7)	0,923
Colesterol (mg/día)	-101 (-151 a -52) ^b	-28 (-85 a 28)	-73 (-147 a -0)	0,050
Fibra (g/día)	2,1 (1,4 a 5,6)	1,9 (7,4 a 11,2)	0.1 (-9,7 a 10,0)	0,977

Abreviaturas: AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI, ácidos grasos polinsaturados.

Los valores se expresan como promedio (IC 95%). Significancia estadística determinada por t-Student.

^a Diferencia de los cambios entre grupos (frutos secos vs control). ^b Cambio significativo respecto al valor basal.

2.5. Adiposidad, presión arterial y perfil lipídico

En cuanto a los parámetros que evaluaron el grado de adiposidad, la presión arterial, así como los diferentes parámetros del perfil lipídico, tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de intervención al inicio del estudio (Tabla 6.6.).

Tabla 6.6. Características basales de adiposidad, presión arterial y perfil lipídico.

Variable	Grupo Frutos Secos (n=25)	Grupo Control (n=25)	P
Peso corporal (kg)	86,4 (80,8 a 92,0)	79,9 (75,5 a 84,4)	0,069
Circunferencia de cintura (cm)	105,6 (102,44 a 108,83)	101,3 (97,7 a 105,0)	0,074
Presión arterial sistólica (mmHg)	145 (138 a 151)	137 (129 a 145)	0,137
Presión arterial diastólica (mmHg)	86 (83 a 89)	82 (78 a 86)	0,119
Colesterol total (mmol/L)	5,38 ± 0,79	5,82 ± 1,29	0,152
Colesterol LDL (mmol/L)	3,45 ± 0,71	3,79 ± 1,03	0,173
Colesterol HDL (mmol/L)	1,17 ± 0,29	1,12 ± 0,26	0,466
Triglicéridos (mmol/L)	1,53 ± 0,69	1,69 ± 0,95	0,500

Abreviaturas: LDL, colesterol de baja densidad; HDL, colesterol de alta densidad.

Los valores se expresan como promedio (IC 95%) o (DE).

Significancia estadística determinada por t-Student.

Durante el estudio ambos grupos de pacientes redujeron tanto el peso corporal como la circunferencia de cintura (Tabla 6.7.), sin que la diferencia de los cambios entre grupos alcanzara la significación estadística.

Tabla 6.7. Efecto de la intervención sobre la adiposidad, la presión arterial y el perfil lipídico

Variable	Grupo Frutos Secos (n=25)	Grupo Control (n=25)	P
Peso corporal (kg)	84,2 (78,86 a 89,60)	78,4 (74,07 a 82,81)	0,363
Circunferencia de cintura (cm)	101,81 (98,24 a 105,37)	98,64 (95,43 a 101,85)	0,362
Presión arterial sistólica (mmHg)	138 (132 a 145)	126 (121 a 133)	0,238
Presión arterial diastólica (mmHg)	83 (79 a 87)	78 (73 a 82)	0,466
Colesterol total (mmol/L)	5,22 ± 0,67	5,34 ± 1,18	0,124
Colesterol LDL (mmol/L)	3,32 ± 0,61	3,43 ± 1,06	0,154
Colesterol HDL (mmol/L)	1,15 ± 0,25	1,09 ± 0,27	0,910
Triglicéridos (mmol/L)	1,50 ± 0,71	1,62 ± 0,98	0,836

Abreviaturas: LDL, colesterol de baja densidad; HDL, colesterol de alta densidad.

Los valores se expresan como promedio (IC 95%) o (DE).

Significancia estadística determinada por t-Student.

En este mismo sentido se observó que los sujetos de ambos grupos de intervención tendieron a disminuir las concentraciones periféricas de CT y c-LDL, aunque la diferencia de los cambios entre grupos no fue tampoco significativa. Finalmente, tampoco se presentaron cambios significativos entre grupos de intervención en cuanto a la fracción c-HDL, las concentraciones de triglicéridos ni en las cifras de presión arterial durante el estudio.

2.6. Marcadores de estrés oxidativo

En la tabla 6.8. se resumen los valores de capacidad antioxidante plasmática (ORAC) y los marcadores de estrés oxidativo determinando en plasma (las LDL oxidadas, el *lag time*, la *Vmax*, y la *Cmax*), y en orina (la excreción de isoprostanos y el 8-oxodG), tanto al inicio como tras 12 semanas de intervención. Al inicio del estudio no se observaron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros entre los grupos de intervención. Después de las 12 semanas de intervención, casi todos los marcadores oxidativos evaluados, mostraron una tendencia similar de mejoría en los dos grupos de intervención, aunque la diferencia de los cambios entre grupos no fue estadísticamente significativa (capacidad antioxidante, LDL-ox, *lag time*, *Vmax*, *Cmax*, isoprostanos) (Tabla 6.8.). El único cambio significativo ocurrió en las concentraciones urinarias de 8-oxodG, cuyos valores difirieron significativamente entre ambos grupos de intervención, mostrando que los sujetos adscritos al grupo de intervención con frutos secos, presentaron una mayor reducción de este marcador de daño oxidativo al ADN. Como se observa en la tabla 6.9. estos resultados se mantuvieron incluso tras ajustar por los cambios ocurridos en el peso corporal durante el estudio ($P < 0.001$).

2.7. Marcadores de la función endotelial

En la tabla 6.10. se muestran los valores de los marcadores de función endotelial analizados (ICAM-1, VCAM-1, índice PAT) al inicio y el efecto de la intervención entre los dos grupos de intervención. Como puede observarse, al inicio y después de la intervención no se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos. Al finalizar el estudio, a pesar de que los sujetos del grupo que consumieron los frutos secos mostraron una disminución significativa en la concentración plasmática del ICAM-1 ($P = 0,038$) en comparación a su valor basal, la diferencia de los cambios entre grupos no fue significativa. En cuanto a los parámetros VCAM-1 y el

índice PAT, los cambios que experimentaron los individuos de los dos grupos de intervención no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a sus valores basales (dentro de grupo), ni tampoco entre grupos.

Tabla 6.8. Valores basales y efecto de la intervención sobre los marcadores de estrés oxidativo.

Variable	Grupo Frutos Secos (n=25)	P ^b	Grupo Control (n=25)	P ^b	Efecto de la intervención	
					Diferencias de los cambios ^c	P ^d
Capacidad antioxidante del plasma (ORAC) (μmol TE/mL)						
Basal	25,46 (22,82 a 28,12)		26,00 (23,13 a 28,88)			
Cambio ^a	0,84 (-1,92 a 3,60)	0,535	-0,29 (-2,79 a 2,19)	0,807	1,13(-2,48 a 4,76)	0,530
Marcadores de estrés oxidativo						
LDL-ox plasmática (U/I)						
Basal	70,67 (61,50 a 79,85)		67,64 (57,11 a 78,19)			
Cambio ^a	-7,59 (-15,72 a 0,53)	0,066	-1,87 (-9,39 a 5,63)	0,611	-5,71 (-16,50 a 5,06)	0,292
Dienos conjugados en plasma						
<i>lag time</i> (min)						
Basal	15,76 (12,36 a 19,16)		14,50 (11,25 a 17,76)			
Cambio ^a	0,71 (-2,16 a 3,60)	0,612	2,70 (0,32 a 5,07)	0,028	-1,98 (-5,62 a 1,65)	0,278
Vmax(nmol/min/mL)						
Basal	23,8 (21,3 a 26,2)		26,5 (24,1 a 29,0)			
Cambio ^a	-0,4 (-2,3 a 1,6)	0,690	-0,6 (-2,7 a 1,5)	0,575	-0,2 (-2,6 a 3,0)	0,885
Cmax (nmol/mL)						
Basal	1088 [976 a 1346]		1193 [958 a 1555]			
Cambio ^a	-71 [-278 a 134]	0,109	-28 [-249 a 136]	0,330	-30 [-247,5 a 134]	0,603
Isoprostanos en orina (ng/mmol creatinina)						
Basal	221,29 (169,74 a 272,84)		225,28 (198,39 a 252,16)			
Cambio ^a	-138,01 (-190,49 a -85,54)	0,000	-121,06 (-150,56 a -91,54)	0,000	-16,95 (-76,26 a 42,34)	0,568
8-oxodG en orina (nmol/mmol creatinina)						
Basal	11,90 (11,06 a 12,73)		11,96 (11,25 a 12,66)			
Cambio ^a	-6,35 (-7,20 a -5,51)	0,000	-3,93 (-4,78 a -3,09)	0,000	-2,42 (-3,58 a -1,25)	0,000

Abreviaturas: LDL-ox, lipoproteína de baja densidad oxidada; *lag time*, período de retraso para el inicio de la oxidación; Vmax, velocidad máxima de producción de dienos; Cmax, producción máxima de dienos; 8-oxodG, 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.

Los valores se expresan como promedio (IC 95%) o mediana [rango intercuartil]. ^a Cambios entre valores basales y finales. ^b Valor P para cambios dentro de grupos. ^c Diferencias de cambios entre grupos. ^d Valor P para cambios entre grupos.

Tabla 6.9. Valores basales, efecto de la intervención y ajuste del efecto de la intervención del 8-oxodG por el cambio de peso corporal.

Grupo Frutos Secos (n=25)		P ^a	Grupo Control (n=25)		P ^a	Efecto del tratamiento	P ^b	Efecto del tratamiento ajustado	P ^c
Basal	Cambio		Basal	Cambio					
11,90 ± 2,02	-6,35 (-7,20 a -5,51)	0,000	11,96 ± 1,66	-3,93 (-4,78 a -3,09)	0,000	-2,42 (-3,58 a -1,25)	0,000	-2,49 (-3,65 a -1,34)	0,000

Los valores se expresan como media (DE) o (IC 95%). Significancia estadística determinada por t-test.

^a Valor P para cambios dentro de grupos. ^b Cambios entre grupos. ^c Cambios entre grupos ajustada por el cambio del peso corporal (ANCOVA).

Tabla 6.10. Valores basales y efecto de la intervención sobre los marcadores de la función endotelial.

Variable	Grupo Frutos Secos (n=25)	P ^b	Grupo Control (n=25)	P ^b	Efecto de la intervención	
					Diferencias de los cambios ^c	P ^d
VCAM-1 (µg/L)						
Basal	1082,4 (921,13 a 1242,95)		1179,25 (905,15 a 1453,34)			
Cambio ^a	-42,91 (-220,47 a 134,65)	0,622	56,81 (-86,40 a 200,03)	0,421	-99,72 (-321,96 a 122,51)	0,371
ICAM-1 (µg/L)						
Basal	609,1 (523,2 a 696,5)		566,9 (476,4 a 657,4)			
Cambio ^a	-91,98 (-178,29 a -5,68)	0,038	-11,35 (-116,23 a 93,53)	0,824	-80,63 (-211,1 a 50,72)	0,222
Índice PAT						
Basal	1,82 (1,65 a 1,99)		1,92 (1,69 a 2,14)			
Cambio ^a	-0,11 (-0,28 a 0,05)	0,165	-0,13 (-0,36 a 0,09)	0,231	0,02 (0,25 a 0,29)	0,890

Abreviaturas: VCAM, molécula de adhesión celular vascular -1; ICAM, molécula de adhesión intercelular -1; LDL-ox, lipoproteína de baja densidad oxidada.

Los valores se expresan como media (IC 95%). Significancia estadística determinada por t-test. ^a Cambios entre valores basales y finales. ^b Valor P para cambios dentro de grupos. ^c Diferencias de los cambios entre grupos ^d Valor P para cambios entre grupos.

DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

VI. DISCUSIÓN

1. Efecto del consumo crónico de nuez entera y extracto de piel de nuez sobre el estado oxidativo en ratones

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron, por vez primera, que los ratones alimentados con pienso enriquecido con nueces o con extracto de piel de nuez presentaban una menor capacidad antioxidante plasmática en comparación al grupo control. No obstante, la oxidabilidad de las LDL de los ratones no se modificó.

Los efectos beneficiosos del consumo de nueces sobre la salud humana se atribuyen, entre otros mecanismos, a su importante capacidad antioxidante, debida al elevado contenido en polifenoles distribuidos principalmente en la piel, así como por su contenido en fibra. Sin embargo, la mayoría de estudios que evalúan el efecto de las nueces sobre la oxidación han sido realizados *in vitro* o mediante estudios *in vivo*, evaluando el efecto de un único componente antioxidante proveniente de las nueces, pero no el efecto de la nuez entera. Puesto que la nuez entera es un producto rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados, y el grado de insaturación determina la susceptibilidad de los ácidos grasos a la oxidación, estos frutos secos podrían ser *per se* más fácilmente oxidables a pesar de su elevado contenido en sustancias con capacidad antioxidante.

Sólo dos estudios han evaluado, hasta el momento, el efecto del consumo agudo de frutos secos sobre el estado oxidativo en modelos animales. En ellos se observó un aumento de la capacidad antioxidante plasmática postprandial en ratas alimentadas con nueces en relación al grupo control (Reiter et al, 2005), así como un aumento del *lag time* en partículas LDL de hámsters, tras la administración, vía sonda gástrica, de 40 μ M de equivalentes de ácido gálico obtenidos de la piel de almendras (Chen et al, 2005).

Sin embargo, los estudios clínicos realizados en humanos para evaluar el efecto del consumo crónico de frutos secos sobre el estado oxidativo muestran resultados contradictorios. Así pues,

mientras algunos estudios observan una disminución significativa de algunos marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído o los isoprostanos tras el consumo de frutos secos (Jia et al, 2006; Jenkins et al, 2008), otros no encuentran ningún efecto positivo sobre la síntesis de dienos conjugados en partículas LDL o en la actividad enzimática antioxidante (Muñoz et al, 2001; Iwamoto et al, 2002; Davis et al, 2007).

En nuestro estudio, a pesar de que los piensos enriquecidos con nueces enteras o con piel de nuez mostraron una mayor capacidad antioxidante *in vitro*, los ratones alimentados con los piensos enriquecidos con nueces o el extracto de piel de nuez, disminuyeron significativamente la capacidad antioxidante total del plasma en comparación a los ratones del grupo control. Además, la formación total de dienos conjugados (Cmax) del plasma fue significativamente mayor en los dos grupos de ratones alimentados con nueces, en donde aquellos ratones alimentados con nueces enteras presentaron una mayor concentración de dienos conjugados, que los ratones del grupo piel de nuez. Estas diferencias observadas entre ambos grupos de ratones alimentados con nueces enteras o con el extracto de obtenida de la piel de nuez podría explicarse en parte, porque aunque las nueces son una fuente importante de compuestos antioxidantes, también contienen una elevada cantidad de ácidos grasos susceptibles de oxidarse, y de esta manera, los animales que consumían mayores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados n-6 derivados de las nueces, mostrarían una mayor formación de productos oxidados. Resultados similares habían sido previamente observados en cuatro ensayos clínicos realizados en humanos. Únicamente uno de estos estudios observó un aumento significativo de la Vmax en el grupo tratado en comparación al grupo control (Zambón et al, 2000; Muñoz et al, 2001, Iwamoto et al, 2002; Ros et al, 2004).

En nuestro estudio, se observaron también menores concentraciones de GSH y un mayor cociente GSSG/GSH en los ratones alimentados con nueces o extracto de piel de nuez en comparación al grupo control. Estos resultados demuestran que la capacidad antioxidante enzimática también es modulada tras el consumo crónico de nueces. Debido a que observamos una menor capacidad antioxidante total plasmática en los ratones que consumieron el pienso con piel de nuez en relación a los ratones alimentados con nueces enteras, se ha sugerido que los tratamientos con elevadas cantidades de compuestos fenólicos mantenidos a largo plazo podrían ejercer un efecto prooxidante. Nuestros resultados apoyan los obtenidos en estudios

previos que habían evaluado el efecto de compuestos fenólicos sobre el estado oxidativo en conejos (Wilson et al, 1996), hamsters golden-Syrian (Auger et al, 2004) y ratones knock-out deficientes de apolipoproteína-E (Acín et al, 2006). En todos estos estudios, el consumo de una mayor cantidad de compuestos fenólicos se asociaba a un mayor estado oxidativo y a la progresión de la aterosclerosis. La pérdida de protección de los antioxidantes provenientes de las nueces podría atribuirse en parte, a una menor biodisponibilidad cuando son consumidos de manera aislada, que en forma de nuez entera. Aunque la biodisponibilidad de determinados componentes flavonoides en su forma simple ha sido ampliamente reportada (Shimoi et al, 2003; Lesser et al, 2004), existe escasa información acerca de la absorción simultánea de compuestos antioxidantes a partir de nueces enteras.

Los resultados de nuestro estudio sugieren que el consumo de nueces enteras y de la piel de las nueces no tiene ningún efecto perjudicial sobre la oxidación de las partículas LDL de los ratones, a pesar del elevado contenido en ácidos grasos de la serie n-6 que contienen las nueces y de la disminución de la capacidad antioxidante plasmática observada tanto en los sistemas enzimáticos como no enzimáticos de los ratones.

ESTUDIO 2. Efecto del consumo de frutos secos sobre el estado oxidativo y la función endotelial en individuos con síndrome metabólico.

Los resultados de este ensayo clínico muestran que, a pesar del efecto prooxidante de los AGPI de los frutos secos (particularmente elevados en las nueces), el consumo de 30 g de una mezcla de frutos secos en el contexto de una dieta saludable mantenido durante 12 semanas no tuvo ningún efecto deletéreo sobre la capacidad antioxidante, las concentraciones circulantes de marcadores de estrés oxidativo y de función endotelial en sujetos con síndrome metabólico en comparación al grupo control. Además, el daño oxidativo al ADN, determinado mediante la excreción urinaria de 8-oxodG, se redujo significativamente en el grupo de individuos que consumieron frutos secos en comparación al grupo control.

Diversos ensayos clínicos han analizado el efecto del consumo de frutos secos sobre marcadores de estrés oxidativo en individuos sanos, en sujetos hipercolesterolémicos o con elevado riesgo cardiovascular obteniendo resultados contradictorios. Así, mientras que algunos estudios observaron efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo, otros no encontraron ninguno efecto (Ros *et al*, 2010). Cabe destacar que ninguno de ellos observó un empeoramiento del estatus oxidativo en comparación a las dietas control exentas de frutos secos (Ros *et al*, 2010). Es destacable que la mayoría de estos estudios no fueron diseñados con el objetivo de evaluar el efecto de los frutos sobre parámetros de oxidación (Lopez-Uriarte P, *et al*. 2009) y además no fueron realizados en pacientes con síndrome metabólico. La mayoría de los estudios que observaron un efecto beneficioso sobre el estrés oxidativo atribuible al consumo de frutos secos fueron realizados con almendras (Jenkins DJ, *et al*. 2002, Jenkins DJ, *et al*. 2006, Jia X, *et al*. 2006, Li N, *et al*. 2007, Berry SE, *et al*. 2008, Torabian S, *et al*. 2009), pistachos, (Kocyigit A, *et al*. 2006, Kay CD, *et al*. 2010) pecanas (Haddad E, *et al*. 2006) o cacahuetes (Hargrove RL, *et al*. 2001), todos ellos ricos en AGMI. Sin embargo, este efecto beneficioso sobre el estrés oxidativo no se observa en los ensayos clínicos que evalúan el efecto de las nueces sobre la oxidación, y la mayoría de ellos muestran una tendencia a empeorar el estatus oxidativo, al sustituir otras fuentes de AGMI por nueces (Zambon D, *et al*. 2000, Munoz S, *et al*. 2001, Iwamoto M, *et al*. 2002, Ros E, *et al*. 2004).

Los frutos secos son alimentos ricos en ácidos grasos insaturados, particularmente en forma de AGMI, pero también con un elevado contenido en AGPI, especialmente las nueces (USDA, 2009). Los AGPI son el principal sustrato de oxidación de las partículas LDL (Reaven PD, *et al*. 1996), lo que sugiere que el consumo de frutos secos podría activar la oxidación de las LDL. Sin embargo, el principal contenido graso de las almendras y las avellanas son los AGMI, los cuales se asocian a una menor susceptibilidad a la oxidación. Estas diferencias en el tipo y la cantidad de ácidos grasos de los diferentes tipos de frutos secos, podrían explicar en parte, el por qué las almendras, las avellanas, los pistachos y otros frutos secos ricos en AGMI presentan una mayor capacidad de mejorar la oxidación en comparación con las nueces, ricas en grasa polinsaturada.

Las nueces son también una fuente importante de tocoferoles y otros componentes fenólicos con capacidad antioxidante, que se localizan principalmente en la piel (Blomhoff R, *et al*.

2006). Por tanto, se ha sugerido que estos compuestos podrían contrarrestar el efecto prooxidante de los AGPI de las nueces sobre la oxidación de las partículas LDL (Anderson KJ, *et al.* 2001), así como disminuir el daño oxidativo al ADN (Sudheer AR, *et al.* 2007). La capacidad moduladora de los extractos de frutos secos sobre el estrés oxidativo que se ha observado en estudios *in vitro* no se ha reproducido en ensayos realizados en animales o en humanos (revisado por Lopez-Uriarte P, *et al.* 2009). Ello podría deberse a la presencia de un mecanismo sinérgico y aditivo entre los compuestos fenólicos y fitoesteroles con otros constituyentes de los frutos secos (Blomhoff R, *et al.* 2006), lo que podría contribuir a explicar la disminución de los marcadores de estrés oxidativo observada en nuestro estudio.

De entre los diferentes marcadores de estrés oxidativo, el 8-oxodG ha sido uno de los más estudiados, posiblemente por su relevancia patogénica (Valavanidis A, *et al.* 2009). La presencia de 8-oxodG en las moléculas de ADN condiciona para una importante inestabilidad genómica. La oxidación de la guanina favorece la formación de radicales hidroxilo con efecto mutagénico y carcinogénico (Ames BN. 1989). La oxidación provoca la incorporación de un grupo hidroxilo en la posición C8 de la guanina, y como consecuencia se produce el 8-oxodG. Este subproducto es un importante biomarcador de estrés oxidativo a nivel celular y también de reparación de daño oxidativo (Cooke MS, *et al.* 2000). Además, los niveles elevados de 8-oxodG se han relacionado con la iniciación y la progresión tumoral en estudios experimentales con diversos modelos animales y también en estudios con humanos (Oliva MR, *et al.* 1997, Kalliomaki TM, *et al.* 2009). Los productos de reparación del daño oxidativo al ADN se excretan en la orina en cantidades proporcionales a la tasa de daño celular superior a 10^4 modificaciones en cada célula por día. El producto más abundante que se ha identificado en las lesiones oxidativas al ADN es el 8-oxodG, por lo que se ha considerado un marcador válido para el análisis del estrés oxidativo en diversas patologías y que podría ser utilizado para monitorear el efecto del consumo de antioxidantes en estudios de intervención dietética (Valavanidis A, *et al.* 2009).

Como se ha mencionado anteriormente, en nuestro estudio se observó una notable mejoría en los niveles de 8-oxodG excretados en orina en aquellos individuos con síndrome metabólico que consumieron el suplemento de la mezcla de frutos secos en comparación con el grupo control. El 8-oxodG, además de su relación con la carcinogénesis, se ha relacionado también

con la presencia de enfermedades degenerativas asociadas al envejecimiento, la aterosclerosis (Valavanidis A, *et al.* 2009) o la diabetes (Wu LL, *et al.* 2004). Así pues, concentraciones elevadas de 8-oxodG han sido reportadas en sujetos hipertensos, debido a un aumento del daño al ADN nuclear y al ADN mitocondrial (Espinosa O, *et al.* 2007, Saez GT, *et al.* 2004). También se ha observado un mayor estrés oxidativo y un aumento de los niveles de 8-oxodG en otras alteraciones metabólicas asociadas con enfermedades cardiovasculares, como la hiperlipidemia combinada (Martinez-Hervas S, *et al.* 2008). Los dos únicos estudios de intervención que han evaluado el efecto del consumo de frutos secos sobre marcadores del daño oxidativo al ADN han sido realizados sobre individuos sanos con hábito tabáquico o no, tras la ingesta de almendras, observando una mejoría en el grupo de fumadores sanos que habían ingerido los frutos secos (Jia X, *et al.* 2006; Li *et al.*, 2007)).

La disfunción endotelial, uno de los primeros indicios en la patogénesis de la aterosclerosis, que se caracteriza por una disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (vasodilatador endógeno) y un aumento en la expresión de moléculas de adhesión celular, se ha relacionado con alteraciones en la perfusión vascular y la etiología de eventos isquémicos (Hansson GK. 2005). Las nueces son una importante fuente de compuestos bioactivos, como el ácido α -linolénico o los ácidos grasos n-3 de origen vegetal que pueden influir favorablemente sobre la función endotelial (Brown AA, *et al.* 2001). Únicamente dos ensayos clínicos (uno crónico y otro agudo) han evaluado, hasta el momento, el efecto del consumo de nueces sobre la disfunción endotelial (Ros E, *et al.* 2004, Cortes B, *et al.* 2006). Ambos estudios mostraron que la función endotelial evaluada mediante la vasodilatación de la arteria braquial, mejoraba significativamente tras el consumo de nueces. Uno de ellos mostró además una disminución significativa de la VCAM-1 tras el consumo de nueces (Ros E, *et al.* 2004). Los autores sugirieron que estos efectos beneficiosos podrían ser debidos al elevado contenido de ácido α -linolénico de las nueces. Sin embargo, evidencias científicas muestran que algunas vitaminas u otras sustancias con actividad antioxidante, como el ácido fólico o la L-arginina (también presente en los frutos secos) podrían contribuir también a explicar en parte este efecto beneficioso del consumo de frutos secos sobre la función endotelial (Ros E. 2009). Puesto que el sistema EndoPAT parece ser un método prometedor para la evaluación *in vivo* de la función endotelial y con la ventaja de que puede utilizarse a nivel clínico (Kuvin JT, *et al.* 2003, Bonetti PO, *et al.* 2004, Kuvin JT, *et al.* 2007), en nuestro estudio además de evaluar el efecto del

consumo de los frutos secos sobre la función endotelial mediante la determinación plasmática de células de adhesión endotelial (VCAM-1 y ICAM-1), utilizamos también el sistema EndoPAT. Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre los dos grupos de intervención ni en la función endotelial medida con el EndoPAT, ni en ninguno de los marcadores de función endotelial analizados.

Cabe considerar que nuestro estudio se llevó a cabo en sujetos con síndrome metabólico, con lo cual los resultados podrían no ser extrapolables a poblaciones sanas o con otras patologías. Por otra parte, aunque los individuos de los dos grupos de intervención recibieron las mismas recomendaciones dietéticas cardiosaludables según la *American Heart Association*, no se descarta la posibilidad de que parte del efecto observado sobre la oxidación se deba a un efecto residual secundario debido a la sustitución inconsciente de otros nutrientes por parte de los individuos aleatorizados al grupo con frutos secos.

En conclusión, el consumo crónico de una porción diaria de 30 g de frutos secos (15 g nueces + 7,5 almendras + 7,5 avellanas) en el contexto de una dieta cardiosaludable, no ejerce ningún efecto deletéreo sobre la capacidad antioxidante, la oxidación lipídica, o la función endotelial. La disminución del daño oxidativo al ADN observada en el presente estudio, contribuiría a explicar los efectos beneficiosos del consumo regular de frutos secos sobre algunos de los componentes del síndrome metabólico observados en otros estudios. Estos hallazgos son consistentes con los efectos beneficiosos observados por el consumo de frutos secos en individuos con enfermedades cardiovasculares (Salas-Salvado J, *et al.* 2008). Sin embargo, son necesarios más estudios que exploren cualquier posible interacción entre los compuestos antioxidantes y otros componentes de los frutos secos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

VII. CONCLUSIONES

- El consumo de piensos enriquecidos con nueces enteras y con piel de nuez, no tiene efectos perjudiciales sobre la oxidación de las partículas LDL en ratones, a pesar del elevado contenido en ácidos grasos de la serie omega 6 de las nueces y de la disminución observada en la capacidad antioxidante plasmática, tanto en los sistemas enzimáticos como no enzimáticos.

- El consumo crónico de una ración diaria de una mezcla de frutos secos dentro del contexto de una dieta cardiosaludable, no tuvo ningún efecto deletéreo en la capacidad antioxidante, la peroxidación lipídica o la función endotelial cuando se comparó con el efecto del consumo de la misma dieta cardiosaludable exenta de nueces. No obstante, la disminución del daño oxidativo al ADN observada en nuestro estudio, podría ayudar a explicar los efectos beneficiosos del consumo regular de frutos secos sobre algunos componentes del síndrome metabólico y algunas enfermedades crónico-degenerativas.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

BIBLIOGRAFIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abia R, Perona JS, Pacheco YM, Montero E, Muriana FJ, Ruiz-Gutierrez V. Postprandial triacylglycerols from dietary virgin olive oil are selectively cleared in humans. *J Nutr* 1999;129(12):2184-2191.

Acin S, Navarro MA, Arbones-Mainar JM, Guillen N, Sarria AJ, Carnicer R, Surra JC, Orman I, Segovia JC, Torre R de L, Covas MI, Fernandez-Bolanos J, Ruiz-Gutierrez V, Osada J. Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice. *J Biochem* 2006;140(3):383-391.

ADA. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S11-61.

Agudo A, Cabrera L, Amiano P, Ardanaz E, Barricarte A, Berenguer T, et al. Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrients, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain). *Am J Clin Nutr* 2007;85(6):1634-1642.

Akkus I, Kalak S, Vural H, Caglayan O, Menekse E, Can G, et al. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1996;244(2):221-227.

Aksoy N, Aksoy M, Bagci C, Gergerlioglu HS, Celik H, Herken E, et al. Pistachio intake increases high density lipoprotein levels and inhibits low-density lipoprotein oxidation in rats. *Tohoku J Exp Med* 2007;212(1):43-48.

Albert CM, Gaziano JM, Willett WC, Manson JE. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med* 2002;62(12):1382-1387.

Ambring A, Friberg P, Axelsen M, Laffrenzen M, Taskinen MR, Basu S, et al. Effects of a Mediterranean-inspired diet on blood lipids, vascular function and oxidative stress in healthy subjects. *Clin Sci (Lond)* 2004;106(5):519-525.

Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* 1989;7(3-6):121-128.

Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J Nutr* 2001;131(11):2837-2842.

Araya J, Rodrigo R, Orellana M, Rivera G. Red wine raises plasma HDL and preserves long-chain polyunsaturated fatty acids in rat kidney and erythrocytes. *Br J Nutr* 2001;86(2):189-195.

Auger C, Gerain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissedre PL, Rouanet JM. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *J Agric Food Chem* 2004;52(16):5297-5302.

Bachem MG, Wendelin D, Schneiderhan W, Haug C, Zorn U, Gross HJ, et al. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(3):319-326.

Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl* 1992;10(2):S43-50.

Banel DK, Hu FB. Effects of walnut consumption on blood lipids and other cardiovascular risk factors: a meta-analysis and systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009;90(1):56-63.

Baroni SS, Amelio M, Sangiorgi Z, Gaddi A, Battino M. Solid monounsaturated diet lowers LDL unsaturation trait and oxidisability in hypercholesterolemic (type IIb) patients. *Free Radic Res* 1999;30(4):275-285.

Bartolome B, Monagas M, Garrido I, Gomez-Cordoves C, Martin-Alvarez PJ, Lebron-Aguilar R, et al. Almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) polyphenols: From chemical characterization to targeted analysis of phenolic metabolites in humans. *Arch Biochem Biophys* 2010;501(1):124-33.

Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 2001 27;103(12):1618-1623.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998;78(2):547-581.
Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;239(1):70-76.

Berry EM, Eisenberg S, Haratz D, Friedlander H, Norman Y, Kaufmann NA, Stein Y. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins--the Jerusalem Nutrition Study: high MUFAs vs high PUFAs. *Am J Clin Nutr* 1992;56:(2):394-403

Berry SE, Tydeman EA, Lewis HB, Phalora R, Rosborough J, Picout DR, et al. Manipulation of lipid bioaccessibility of almond seeds influences postprandial lipemia in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr* 2008;88(4):922-929.

Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;2:CD007176.

Bleys J, Miller ER 3rd, Pastor-Barriuso R, Appel LJ, Guallar E. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2006;84(4):880-887.

- Blomhoff R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005;16(1):47-54.
- Blomhoff R, Carlsen MH, Andersen LF, Jacobs DR, Jr. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *Br J Nutr* 2006;96 Suppl 2:S52-S60.
- Blum S, Aviram M, Ben-Amotz A, Levy Y. Effect of a Mediterranean meal on postprandial carotenoids, paraoxonase activity and C-reactive protein levels. *Ann Nutr Metab* 2006;50(1):20-24.
- Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafer U, Iaina A, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2000;356(9237):1213-1218.
- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. Elevated "hydroxyl radical" generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1998;71(3):1321-1324.
- Bolling BW, McKay DL, Blumberg JB. The phytochemical composition and antioxidant actions of tree nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2010;19(1):117-123.
- Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M, et al. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb* 1992;12(4):529-533.
- Bonetti PO, Barsness GW, Keelan PC, Schnell TI, Pumper GM, Kuvin JT, et al. Enhanced external counterpulsation improves endothelial function in patients with symptomatic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2003a;41(10):1761-1768.
- Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? *Eur Heart J* 2003b;24(3):225-248.
- Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR, Jr, Kuvin JT, Lerman A. Noninvasive identification of patients with early coronary atherosclerosis by assessment of digital reactive hyperemia. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(11):2137-2141.
- Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001;73(4):673-686.
- Brown ED, Morris VC, Rhodes DG, Sinha R, Levander OA. Urinary malondialdehyde-equivalents during ingestion of meat cooked at high or low temperatures. *Lipids* 1995;30(11):1053-1056.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414(6865):813-820.
- Bruckdorfer KR. Antioxidants and CVD. *Proc Nutr Soc* 2008;67(2):214-222.
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1993;90(14):6434-6438.

Buckland G, Salas-Salvado J, Roure E, Bullo M, Serra-Majem L. Sociodemographic risk factors associated with metabolic syndrome in a Mediterranean population. *Public Health Nutr* 2008;11(12):1372-1378.

Buijsse B, Feskens EJ, Schlettwein-Gsell D, Ferry M, Kok FJ, Kromhout D, et al. Plasma carotene and alpha-tocopherol in relation to 10-y all-cause and cause-specific mortality in European elderly: the Survey in Europe on Nutrition and the Elderly, a Concerted Action (SENECA). *Am J Clin Nutr* 2005;82(4):879-886.

Bullo M, Amigo-Correig P, Marquez-Sandoval F, Babio N, Martinez-Gonzalez MA, Estruch R, et al. Mediterranean diet and high dietary acid load associated with mixed nuts: effect on bone metabolism in elderly subjects. *J Am Geriatr Soc* 2009;57(10):1789-1798.

Bullo M, Lamuela-Raventós R, Salas-Salvadó J. Mediterranean diet and oxidation: nuts and olive oil as important sources of fat and antioxidants. *Curr Top Med Chem*. Forthcoming 2010.

Burton GW, Ingold KU. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 1984;224(4649):569-573.

Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch Biochem Biophys* 1983;221(1):281-290.

Cadenas E. Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 1997;6(4):391-397.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87(10):840-844.

Canales A, Benedi J, Nus M, Librelotto J, Sanchez-Montero JM, Sanchez-Muniz FJ. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *J Am Coll Nutr* 2007;26(3):225-232.

Cangemi R, Angelico F, Loffredo L, Del Ben M, Pignatelli P, Martini A, et al. Oxidative stress-mediated arterial dysfunction in patients with metabolic syndrome: Effect of ascorbic acid. *Free Radic Biol Med* 2007;43(5):853-859.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;14(3):303-311.

Carbonell i Roura E, Pastó-Marín I. Plantas, frutos secos y evolución de los homínidos. In: Salas-Salvado J, Ros E, Sabate J, editors. *Frutos secos, salud y culturas mediterráneas*. 1º ed. Barcelona, España: Glosa; 2005. p.55-64.

Carbonneau MA, Leger CL, Monnier L, Bonnet C, Michel F, Fouret G, et al. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu²⁺-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *Eur J Clin Nutr* 1997;51(10):682-690.

Castilla P, Echarri R, Davalos A, Cerrato F, Ortega H, Teruel JL, et al. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both haemodialysis patients and healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2006;84(1):252-262.

Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Lizzio S, Catone B, Assaloni R, et al. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur J Clin Invest* 2001a;31(4):322-328.

Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001b;44(7):834-838.

Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(5):816-823.

Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* 2002;25(8):1439-1443.

Chandalia M, Garg A, Lutjohann D, von Bergmann K, Grundy SM, Brinkley LJ. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000;342(19):1392-1398.

Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem Toxicol* 1999;37(9-10):949-962.

Chen CY, Blumberg JB. Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;17 Suppl 1:329-332.

Chen CY, Milbury PE, Chung SK, Blumberg J. Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation. *J Nutr Biochem* 2007;18(12):785-794.

Chen CY, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr* 2005;135(6):1366-1373.

Cherubini A, Vigna GB, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R. Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Curr Pharm Des* 2005;11(16):2017-2032.

Chihuailaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet Mex* 2002;33(3):265-283.

Chisolm GM, Ma G, Irwin KC, Martin LL, Gunderson KG, Linberg LF, et al. 7 β -Hydroperoxycholest-5-en-3 β -ol, a component of human atherosclerotic lesions, is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994;91(24):11452-11456.

Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 2000;28(12):1815-1826.

Choi J, Levey AI, Weintraub ST, Rees HD, Gearing M, Chin LS, et al. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* 2004;279(13):13256-13264.

Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J Biol Chem* 2005;280(12):11648-11655.

Chopra M, O'Neill ME, Keogh N, Wortley G, Southon S, Thurnham DI. Influence of increased fruit and vegetable intake on plasma and lipoprotein carotenoids and LDL oxidation in smokers and nonsmokers. *Clin Chem* 2000;46(11):1818-1829.

Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 2000;80(7):1118-1125.

Coates AM, Howe PR. Edible nuts and metabolic health. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(1):25-30.

Colaric M, Veberic R, Solar A, Hudina M, Stampar F. Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *J Agric Food Chem* 2005;53(16):6390-6396.

Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements. *Free Radic Res* 2000;32(5):381-397.

Cortes B, Nunez I, Cofan M, Gilabert R, Perez-Heras A, Casals E, et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006;48(8):1666-1671.

Covas MI, Gambert P, Fito M, de la Torre R. Wine and oxidative stress: up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. *Atherosclerosis* 2010;208(2):297-304.

Covas MI, Nyyssonen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJ, Kiesewetter H, et al. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2006;145(5):333-341.

Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251(4995):788-791.

Dai J, Miller AH, Bremner JD, Goldberg J, Jones L, Shallenberger L, et al. Adherence to the Mediterranean diet is inversely associated with circulating interleukin-6 among middle-aged men: a twin study. *Circulation* 2008;117(2):169-175.

Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52(4):601-623.

Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F2 α and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999;99(2):224-229.

Davis L, Stonehouse W, Loots du T, Mukuddem-Petersen J, van der Westhuizen FH, Hanekom SM, et al. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *Eur J Nutr* 2007;46(3):155-164.

Davis P, Valacchi G, Pagnin E, Shao Q, Gross HB, Calo L, et al. Walnuts reduce aortic ET-1 mRNA levels in hamsters fed a high-fat, atherogenic diet. *J Nutr* 2006;136(2):428-432.

De la Torre-Carbot K, Jauregui O, Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM, Lopez-Sabater MC. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 2005;53(11):4331-4340.

De Waart FG, Schouten EG, Stalenhoef AF, Kok FJ. Serum carotenoids, alpha-tocopherol and mortality risk in a prospective study among Dutch elderly. *Int J Epidemiol* 2001;30(1):136-143.

Dedoussis GV, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Pitsavos C, Zampelas A, Choumerianou D, et al. Effect of interaction between adherence to a Mediterranean diet and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C T mutation on homocysteine concentrations in healthy adults: the ATTICA Study. *Am J Clin Nutr* 2004;80(4):849-854.

Deleuze IP. Legislación Alimentaria: Código Alimentario Español y disposiciones complementarias. 7^o ed. Madrid: Ed. Tecnos;2006.

Devaraj S, Leonard S, Traber MG, Jialal I. Gamma-tocopherol supplementation alone and in combination with alpha-tocopherol alters biomarkers of oxidative stress and inflammation in subjects with metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med* 2008;44(6):1203-1208.

Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004;52:794-804.

Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G. Meta-analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation* 2002;105(24):2836-2844.

Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997;337(6):408-416.

Dierckx N, Horvath G, van Gils C, Vertommen J, van de Vliet J, De Leeuw I, et al. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(8):999-1008.

Doll R, Peto R, Hall E, Wheatley K, Gray R. Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1994;309(6959):911-918.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998;102(1):145-152.

Dowling DK, Simmons LW. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc Biol Sci* 2009;276(1663):1737-1745.

Ellis PR, Kendall CW, Ren Y, Parker C, Pacy JF, Waldron KW, et al. Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *Am J Clin Nutr* 2004;80(3):604-613.

Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am J Epidemiol* 1994;139(12):1197-1209.

Espinosa O, Jimenez-Almazan J, Chaves FJ, Tormos MC, Clapes S, Iradi A, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res* 2007;41(5):546-554.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res* 2004;567(1):1-61.

Everse J, Coates PW. Neurodegeneration and peroxidases. *Neurobiol Aging* 2009;30(7):1011-1025.

Faxon DP, Fuster V, Libby P, Beckman JA, Hiatt WR, Thompson RW, et al. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation* 2004;109(21):2617-2625.

FDA, Food and Drug Administration. Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion - Nuts and Coronary Heart Disease. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/ghcnuts2.html>. Accessed 09/19, 2008.

Ferrari R, Bachetti T, Agnoletti L, Comini L, Curello S. Endothelial function and dysfunction in heart failure. *Eur Heart J* 1998;19 Suppl G:G41-7.

Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(2):247-254.

Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408(6809):239-247.

Fito M, Cladellas M, de la Torre R, Marti J, Alcantara M, Pujadas-Bastardes M, et al. Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis* 2005;181(1):149-158.

Fito M, Guxens M, Corella D, Saez G, Estruch R, de la Torre R, et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007;167(11):1195-1203.

Flores-Mateo G, Carrillo-Santistevé P, Elosua R, Guallar E, Marrugat J, Bleys J, et al. Antioxidant enzyme activity and coronary heart disease: meta-analyses of observational studies. *Am J Epidemiol* 2009;170(2):135-147.

Ford ES. The metabolic syndrome and mortality from cardiovascular disease and all-causes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey II Mortality Study. *Atherosclerosis* 2004;173(2):309-314.

Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003;52(9):2346-2352.

Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990;87(12):4533-4537.

Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008;266(1):6-11.

Frankel EN. *Antioxidants in food and biology: facts and fiction*. 1^o ed. Bridgwater, U.K.: The Oily Press; 2007.

Frankel EN. *Lipid oxidation*. 2^o ed. Bridgwater, U.K.: The Oily Press; 2005.

Fraser GE, Sabate J, Beeson WL, Strahan TM. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. The Adventist Health Study. *Arch Intern Med* 1992;152(7):1416-1424.

Frostegard J, Wu R, Lemne C, Thulin T, Witztum JL, de Faire U. Circulating oxidized low-density lipoprotein is increased in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 2003;105(5):615-620.

Fuchs CS, Stampfer MJ, Colditz GA, Giovannucci EL, Manson JE, Kawachi I, et al. Alcohol consumption and mortality among women. *N Engl J Med* 1995;332(19):1245-1250.

Fujita K, Nishizawa H, Funahashi T, Shimomura I, Shimabukuro M. Systemic oxidative stress is associated with visceral fat accumulation and the metabolic syndrome. *Circ J* 2006;70(11):1437-1442.

Fukushi S, Merola LO, Kinoshita JH. Altering the course of cataracts in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1980;19(3):313-315.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114(12):1752-1761.

Gaede P, Poulsen HE, Parving HH, Pedersen O. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2001;18(9):756-760.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, et al. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007;49(4):403-414.

Gaziano JM, Gaziano TA, Glynn RJ, Sesso HD, Ajani UA, Stampfer MJ, et al. Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the Physicians' Health Study enrolment cohort. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(1):96-105.

Genkinger JM, Platz EA, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ. Fruit, vegetable, and antioxidant intake and all-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a community-dwelling population in Washington County, Maryland. *Am J Epidemiol* 2004;160(12):1223-1233.

Gentile C, Tesoriere L, Butera D, Fazzari M, Monastero M, Allegra M, et al. Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *J Agric Food Chem* 2007;55(3):643-648.

German JB, Walzem RL. The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr* 2000;20:561-593.

Gimeno E, de la Torre-Carbot K, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Fito M, de la Torre R, et al. Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *Br J Nutr* 2007;98(6):1243-1250.

Gimeno E, Fito M, Lamuela-Raventos RM, Castellote AI, Covas M, Farre M, et al. Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *Eur J Clin Nutr* 2002;56(2):114-120.

Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* 1995;25(1):25-65.

Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(4):431-438.

Goor DA, Sheffy J, Schnall RP, Arditti A, Caspi A, Bragdon EE, et al. Peripheral arterial tonometry: a diagnostic method for detection of myocardial ischemia induced during mental stress tests: a pilot study. *Clin Cardiol* 2004;27(3):137-141.

Gopaul NK, Anggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 α levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995;368(2):225-229.

Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, et al. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. *Ann Intern Med* 2000;133(6):411-419.

Grundy SM. Metabolic syndrome scientific statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(11):2243-2244.

Haddad EH, Sabate J, Whitten CG. Vegetarian food guide pyramid: a conceptual framework. *Am J Clin Nutr* 1999;70(3 Suppl):615S-619S.

Haddad E, Jambazian P, Karunia M, Tanzman J, Sabaté J. A pecan-enriched diet increases γ -tocopherol/cholesterol and decreases thiobarbituric acid reactive substances in plasma of adults. *Nutr Res* 2006;26(8):397-402.

Haldar S, Rowland IR, Barnett YA, Bradbury I, Robson PJ, Powell J, et al. Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores. *Eur J Clin Nutr* 2007;61(8):1011-1022.

Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009;46(5):531-542.

Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997;55(1 Pt 2):S44-S49.

Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996;25(1):57-74.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52(8 Pt 1):253-265.

Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 1987;1(5):358-364.

Halliwell B, Gutteridge JM. Lipid peroxidation in brain homogenates: the role of iron and hydroxyl radicals. *J Neurochem* 1997;69(3):1330-1331.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3^o ed. Oxford, UK: Oxford University Press; 1999.

Hamburg NM, Keyes MJ, Larson MG, Vasan RS, Schnabel R, Pryde MM, et al. Cross-sectional relations of digital vascular function to cardiovascular risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008;117(19):2467-2474.

Hansel B, Giral P, Nobecourt E, Chantepie S, Bruckert E, Chapman MJ, et al. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(10):4963-4971.

Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352(16):1685-1695.

Hargrove RL, Etherton TD, Pearson TA, Harrison EH, Kris-Etherton PM. Low fat and high monounsaturated fat diets decrease human low density lipoprotein oxidative susceptibility in vitro. *J Nutr* 2001;131(6):1758-1763.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91(3A):7A-11A.

Hatipoglu A, Kanbagli O, Balkan J, Kucuk M, Cevikbas U, Aykac-Toker G, et al. Hazelnut oil administration reduces aortic cholesterol accumulation and lipid peroxides in the plasma, liver, and aorta of rabbits fed a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68(10):2050-2057.

Hininger I, Chopra M, Thurnham DI, Laporte F, Richard MJ, Favier A, et al. Effect of increased fruit and vegetable intake on the susceptibility of lipoprotein to oxidation in smokers. *Eur J Clin Nutr* 1997;51(9):601-606.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74(1):214-226.

Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, et al. The metabolic syndrome, circulating oxidized LDL, and risk of myocardial infarction in well-functioning elderly people in the health, aging, and body composition cohort. *Diabetes* 2004;53(4):1068-1073.

Holvoet P, Lee DH, Steffes M, Gross M, Jacobs DR, Jr. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA* 2008;299(19):2287-2293.

Hori O, Yan SD, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D, et al. The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11 Suppl 5:13-16.

Hu FB. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3 Suppl):544S-551S.

Hu FB, Stampfer MJ. Nut consumption and risk of coronary heart disease: a review of epidemiologic evidence. *Curr Atheroscler Rep* 1999;1(3):204-209.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm EB, Colditz GA, Rosner BA, et al. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *BMJ* 1998;317(7169):1341-1345.

Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 2002;288:2569-2578.

Huber A, Stuchbury G, Burkle A, Burnell J, Munch G. Neuroprotective therapies for Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2006;12(6):705-717.

Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(1-2):1-8.

Hyson DA, Schneeman BO, Davis PA. Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women. *J Nutr* 2002;132(4):703-707.

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 2003;10(23):2495-2505.

Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, Hirooka Y, Sakai K, Takeshita A, et al. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur J Clin Nutr* 2002a;56(7):629-637.

Iwamoto M, Kono M, Kawamoto D, Tomoyori H, Sato M, Imaizumi K. Differential effect of walnut oil and safflower oil on the serum cholesterol level and lesion area in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002b;66(1):141-146.

Jain MG, Hislop GT, Howe GR, Ghadirian P. Plant foods, antioxidants, and prostate cancer risk: findings from case-control studies in Canada. *Nutr Cancer* 1999;34(2):173-184.

Jakulj F, Zernicke K, Bacon SL, van Wielingen LE, Key BL, West SG, et al. A high-fat meal increases cardiovascular reactivity to psychological stress in healthy young adults. *J Nutr* 2007;137(4):935-939.

Jenkins DJ, Kendall CW, Josse AR, Salvatore S, Brighenti F, Augustin LS, et al. Almonds decrease postprandial glycemia, insulinemia, and oxidative damage in healthy individuals. *J Nutr* 2006;136(12):2987-2992.

Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Josse AR, Nguyen TH, Faulkner DA, et al. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *J Nutr* 2008;138(5):908-913.

Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Parker TL, Connelly PW, Qian W, et al. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation* 2002;106(11):1327-1332.

Jia X, Li N, Zhang W, Zhang X, Lapsley K, Huang G, et al. A pilot study on the effects of almond consumption on DNA damage and oxidative stress in smokers. *Nutr Cancer* 2006;54(2):179-183.

Jiang R, Manson JE, Stampfer MJ, Liu S, Willett WC, Hu FB. Nut and peanut butter consumption and risk of type 2 diabetes in women. *JAMA* 2002;288(20):2554-2560.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 1990;268(1):69-71.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 2005;4(1):5.

Johnson RC, Chapman SM, Dong ZM, Ordovas JM, Mayadas TN, Herz J, et al. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 1997;99(5):1037-1043.

Johnson RK, Kennedy E. The 2000 Dietary Guidelines for Americans: what are the changes and why were they made? The Dietary Guidelines Advisory Committee. *J Am Diet Assoc* 2000;100(7):769-774.

Johnston C. Functional Foods as Modifiers of Cardiovascular Disease. *Am J Lifestyle Med* 2009;3(1 Suppl):39S-43S.

Joshi KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, et al. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *JAMA* 1999;282(13):1233-1239.

Joshi KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, et al. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med* 2001;134(12):1106-1114.

Kalliomaki TM, McCallum G, Wells PG, Hill RP. Progression and metastasis in a transgenic mouse breast cancer model: effects of exposure to in vivo hypoxia. *Cancer Lett* 2009;282(1):98-108.

Kay CD, Gebauer SK, West SG, Kris-Etherton PM. Pistachios increase serum antioxidants and lower serum oxidized-LDL in hypercholesterolemic adults. *J Nutr* 2010;140(6):1093-1098.

Keaney JF, Jr, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(3):434-439.

Kelly JH, Jr, Sabate J. Nuts and coronary heart disease: an epidemiological perspective. *Br J Nutr* 2006;96 Suppl 2:S61-7.

Key TJ, Appleby PN, Davey GK, Allen NE, Spencer EA, Travis RC. Mortality in British vegetarians: review and preliminary results from EPIC-Oxford. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3 Suppl):533S-538S.

Khan BV, Sola S, Lauten WB, Natarajan R, Hooper WC, Menon RG, et al. Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2004;27(7):1712-1715.

Kirkinezos IG, Bacman SR, Hernandez D, Oca-Cossio J, Arias LJ, Perez-Pinzon MA, et al. Cytochrome c association with the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. *J Neurosci* 2005;25(1):164-172.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-267.

Kleinfeld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1992;38(10):2066-2072.

Klipstein-Grobusch K, den Breeijen JH, Grobbee DE, Boeing H, Hofman A, Witteman JC. Dietary antioxidants and peripheral arterial disease: the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 2001;154(2):145-149.

Knekt P, Reunanen A, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Aromaa A. Antioxidant vitamin intake and coronary mortality in a longitudinal population study. *Am J Epidemiol* 1994;139(12):1180-1189.

Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 2000;35:1-62.

Kocyigit A, Koylu AA, Keles H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutr Metab Cardiovasc.Dis* 2006;16(3):202-209.

Kornsteiner M, Wagner KH, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem* 2006;98(2):381-387.

Kovanen PT. The mast cell-a potential link between inflammation and cellular cholesterol deposition in atherogenesis. *Eur Heart J* 1993;14 Suppl K:105-117.

Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000;102(18):2284-2299.

Kregel KC, Zhang HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;292(1):R18-36.

Krinsky NI. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 1989;7(6):617-635.

Kris-Etherton PM, Pearson TA, Wan Y, Hargrove RL, Moriarty K, Fishell V, et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am J Clin Nutr* 1999;70(6):1009-1015.

Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992;26(7):641-655.

Kumagai S, Shibata H, Watanabe S, Suzuki T, Haga H. Effect of food intake pattern on all-cause mortality in the community elderly: a 7-year longitudinal study. *J Nutr Health Aging* 1999;3(1):29-33.

Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334(18):1156-1162.

Kuvin JT, Mammen A, Mooney P, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Assessment of peripheral vascular endothelial function in the ambulatory setting. *Vasc Med* 2007;12(1):13-16.

Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, Pandian NG, Sheffy J, Schnall RP, et al. Assessment of peripheral vascular endothelial function with finger arterial pulse wave amplitude. *Am Heart J* 2003;146(1):168-174.

Lavie P, Shlitner A, Sheffy J, Schnall RP. Peripheral arterial tonometry: a novel and sensitive non-invasive monitor of brief arousals during sleep. *Isr Med Assoc J* 2000;2(3):246-247.

Leighton F, Cuevas A, Guasch V, Perez DD, Strobel P, San Martin A, et al. Plasma polyphenols and antioxidants, oxidative DNA damage and endothelial function in a diet and wine intervention study in humans. *Drugs Exp Clin Res* 1999;25(2-3):133-141.

Lerma-Garcia MJ, Simo-Alfonso EF, Chiavaro E, Bendini A, Lercker G, Cerretani L. Study of chemical changes produced in virgin olive oils with different phenolic contents during an accelerated storage treatment. *J Agric Food Chem* 2009;57(17):7834-7840.

Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 1993;13(2):197-204.

Li N, Jia X, Chen CY, Blumberg JB, Song Y, Zhang W, et al. Almond consumption reduces oxidative DNA damage and lipid peroxidation in male smokers. *J Nutr* 2007;137(12):2717-2722.

Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K. Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Lab Invest* 2001;81(6):845-861.

Lintas C, Cappelloni M. Dietary fiber content of Italian fruit and nuts. *J Food Comp Anal* 1992;5(2):146-151.

Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM, Liu RM. Glutathione metabolism during aging and in Alzheimer disease. *Ann N.Y. Acad Sci* 2004;1019:346-349.

Liu XQ, Li YH. Epidemiological and nutritional research on prevention of cardiovascular disease in China. *Br J Nutr* 2000;84 Suppl 2:S199-203.

Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zinman B, et al. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care* 2002;25(11):1919-1927.

Lopez-Miranda J, Gomez P, Castro P, Marin C, Paz E, Bravo MD, et al. Mediterranean diet improves low density lipoprotein susceptibility to oxidative modifications. *Med Clin (Barc)* 2000;115(10):361-365.

Lopez-Miranda J, Perez-Jimenez F, Ros E, De Caterina R, Badimon L, Covas MI, et al. Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20(4):284-294.

Lopez-Uriarte P, Bullo M, Casas-Agustench P, Babio N, Salas-Salvadó J. Nuts and oxidation: a systematic review. *Nutr Rev* 2009 67(9):497-508.

Machlin LJ, Bendich A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1987;1(6):441-445.

Makino A, Skelton MM, Zou A, Roman RJ, Cowley AW, Jr. Increased Renal Medullary Oxidative Stress Produces Hypertension. *Hypertension* 2002;39(2):667-672.

Mallika V, Goswami B, Rajappa M. Atherosclerosis pathophysiology and the role of novel risk factors: a clinicobiochemical perspective. *Angiology* 2007;58(5):513-522.

Mandalari G, Faulks RM, Rich GT, Lo Turco V, Picout DR, Lo Curto RB, et al. Release of protein, lipid, and vitamin E from almond seeds during digestion. *J Agric Food Chem* 2008;56(9):3409-3416.

Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;827(1):65-75.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(1):24-38.

Marks JB, Raskin P. Cardiovascular risk in diabetes: a brief review. *J Diabetes Complications* 2000;14(2):108-115.

Márquez-Sandoval F, Bullo M, Vizmanos B, Casas-Agustench P, Salas-Salvado J. Un patrón de alimentación saludable: la dieta Mediterránea tradicional. 2008;16:11-22.

Marrugat J, Covas MI, Fito M, Schroder H, Miro-Casas E, Gimeno E, et al. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation -a randomized controlled trial. *Eur J Nutr* 2004;43(3):140-147.

Martinez-Hervas S, Fandos M, Real JT, Espinosa O, Chaves FJ, Saez GT, et al. Insulin resistance and oxidative stress in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2008;199(2):384-389.

Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto R, Coni E, Volpe R, et al. Effects of dietary virgin olive oil phenols on low density lipoprotein oxidation in hyperlipidemic patients. *Lipids* 2001;36(11):1195-1202.

Mataix J y Ros E. Composición en ácidos grasos de los frutos secos: implicaciones para la salud. In: Salas-Salvadó J, Ros E, Sabaté J, editores. *Frutos secos, salud y culturas mediterráneas*. Barcelona: Glosa; 2005. p 145.

Mataix J, Mañás M, Llopis J, Martínez E, Sánchez J, Borregón A. *Tablas de composición de alimentos españoles (Spanish food composition tables)*. 4º ed. España: Universidad de Granada; 2003.

McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91(6):2470-2478.

Meaney E, Vela A, Samaniego V, Meaney A, Asbun J, Zempoalteca JC, et al. Metformin, arterial function, intima-media thickness and nitrooxidation in metabolic syndrome: the MEFISTO study. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35(8):895-903.

Mente A, de Koning L, Shannon HS, Anand SS. A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2009;169(7):659-669.

Milbury PE, Chen CY, Dolnikowski GG, Blumberg JB. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *J Agric Food Chem* 2006;54(14):5027-5033.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8(1):95-108.

Mills PK, Beeson WL, Phillips RL, Fraser GE. Dietary habits and breast cancer incidence among Seventh-day Adventists. *Cancer* 1989;64(3):582-590.

Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999;55(2):389-399.

Moreno JA, Lopez-Miranda J, Perez-Martinez P, Marin C, Moreno R, Gomez P, et al. A monounsaturated fatty acid-rich diet reduces macrophage uptake of plasma oxidised low-density lipoprotein in healthy young men. *Br J Nutr* 2008;100(3):569-575.

Moreno JJ, Mitjavila MT. The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review). *J Nutr Biochem* 2003;14(4):182-195.

Morrissey PA, O'Brien NM. Dietary Antioxidants in Health and Disease. *Int Dairy J* 1998;8(5-6):463-472.

Mullan A, Sattar N. More knocks to the oxidation hypothesis for vascular disease? *Clin Sci (Lond)* 2009;116(1):41-43.

Munoz S, Merlos M, Zambon D, Rodriguez C, Sabate J, Ros E, et al. Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells. *J Lipid Res* 2001;42(12):2069-2076.

Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* 2008;40(3):180-196.

Nakamura Y, Horii Y, Nishino T, Shiiki H, Sakaguchi Y, Kagoshima T, et al. Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol* 1993;143(6):1649-1656.

Nourooz-Zadeh J, Liu EH, Yhlen B, Anggard EE, Halliwell B. F4-isoprostanes as specific marker of docosahexaenoic acid peroxidation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999;72(2):734-740.

Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 1995;44(9):1054-1058.

Nus M, Frances F, Librelotto J, Canales A, Corella D, Sanchez-Montero JM, et al. Arylesterase activity and antioxidant status depend on PON1-Q192R and PON1-L55M polymorphisms in subjects with increased risk of cardiovascular disease consuming walnut-enriched meat. *J Nutr* 2007;137(7):1783-1788.

Obrosova I, Faller A, Burgan J, Ostrow E, Williamson JR. Glycolytic pathway, redox state of NAD(P)-couples and energy metabolism in lens in galactose-fed rats: effect of an aldose reductase inhibitor. *Curr Eye Res* 1997;16(1):34-43.

O'Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *AM J Clin Nutr* 2002;76(6):1367-1374.

Odetti P, Garibaldi S, Noberasco G, Aragno I, Valentini S, Traverso N, et al. Levels of carbonyl groups in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus subjects. *Acta Diabetol* 1999;36(4):179-183.

O'Keefe JH, Gheewala NM, O'Keefe JO. Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 2008;51(3):249-255.

OMS. Enfermedades Cardiovasculares. 2009; Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html>. Accessed Octubre/17, 2009.

Oliva MR, Ripoll F, Muniz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, et al. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog* 1997;18(4):232-243.

Osler M, Heitmann BL, Gerdes LU, Jorgensen LM, Schroll M. Dietary patterns and mortality in Danish men and women: a prospective observational study. *Br J Nutr* 2001;85(2):219-225.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49(10):4619-4626.

Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. *J Nutr* 2006;136(12):3022-3026.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Skoumas J, Stefanadis C. Status and management of blood lipids in Greek adults and their relation to socio-demographic, lifestyle and dietary factors: the ATTICA Study. *Blood lipids distribution in Greece. Atherosclerosis* 2004;173(2):353-361.

Panagiotakos DB, Pitsavos C, Skoumas Y, Stefanadis C. The association between food patterns and the metabolic syndrome using principal components analysis: The ATTICA Study. *J Am Diet Assoc* 2007;107(6):979-87; quiz 997.

Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Mol Nutr Food Res* 2006;50(11):1030-1038.

Peppas M, Stavroulakis P, Raptis SA. Advanced glycoxidation products and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen* 2009;17(4):461-472.

Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Grape products and cardiovascular disease risk factors. *Nutr Res Rev* 2008;21(2):158-173.

Perluigi M, Fai Poon H, Hensley K, Pierce WM, Klein JB, Calabrese V, et al. Proteomic analysis of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice-a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005;38(7):960-968.

Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal* 2009;11(11):2851-2897.

Phillips KM, Ruggio DM, Ashraf-Khorassani M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J Agric Food Chem* 2005;53(24):9436-9445.

Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, et al. Adherence to the Mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr* 2005;82(3):694-699.

Poon HF, Hensley K, Thongboonkerd V, Merchant ML, Lynn BC, Pierce WM, et al. Redox proteomics analysis of oxidatively modified proteins in G93A-SOD1 transgenic mice-a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med* 2005;39(4):453-462.

Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999;58(4):1025-1033.

Pratico D, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Rokach J, et al. Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100(8):2028-2034.

Ramana KV, Chandra D, Srivastava S, Bhatnagar A, Srivastava SK. Nitric oxide regulates the polyol pathway of glucose metabolism in vascular smooth muscle cells. *FASEB J* 2003;17(3):417-425.

Ramirez-Tortosa MC, Suarez A, Gomez MC, Mir A, Ros E, Mataix J, et al. Effect of extra-virgin olive oil and fish-oil supplementation on plasma lipids and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative alteration in free-living spanish male patients with peripheral vascular disease. *Clin Nutr* 1999;18(3):167-174.

Rattan V, Shen Y, Sultana C, Kumar D, Kalra VK. Diabetic RBC-induced oxidant stress leads to transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells. *Am J Physiol* 1997;273(2 Pt 1):E369-E375.

Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993;91(2):668-676.

Reaven PD, Witztum JL. Oxidized low density lipoproteins in atherogenesis: role of dietary modification. *Annu Rev Nutr* 1996;16:51-71.

Redon J, Coca A. Guidelines for the diagnosis, evaluation and treatment of hypertension: the point of view of the Spanish Society of Hypertension. *Med Clin (Barc)* 2003;121(19):739-740.

Rehman A, Nourooz-Zadeh J, Moller W, Tritschler H, Pereira P, Halliwell B. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1999;448(1):120-122.

Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition* 2005;21(9):920-924.

Reljanovic M, Reichel G, Rett K, Lobisch M, Schuette K, Moller W, et al. Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid): a two year multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial (ALADIN II). *Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Free Radic Res* 1999;31(3):171-179.

Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328(20):1450-1456.

Rissanen TH, Voutilainen S, Virtanen JK, Venho B, Vanharanta M, Mursu J, et al. Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *J Nutr* 2003;133(1):199-204.

Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism* 2006;55(7):928-934.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 2009;84(21-22):705-712.

Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, Webb D, Brooks C, Jackson KG, et al. Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998;68(3):552-560.

Rodrigo R, Rivera G, Orellana M, Araya J, Bosco C. Rat kidney antioxidant response to long-term exposure to flavonol rich red wine. *Life Sci* 2002;71(24):2881-2895.

Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212(2):167-178.

Roman B, Carta L, Martinez-Gonzalez MA, Serra-Majem L. Effectiveness of the Mediterranean diet in the elderly. *Clin Interv Aging* 2008;3(1):97-109.

Romani A, Lapucci C, Cantini C, Ieri F, Mulinacci N, Visioli F. Evolution of minor polar compounds and antioxidant capacity during storage of bottled extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2007;55(4):1315-1320.

Ros E. Health Benefits of Nut Consumption. *Nutrients* 2010;2(7):652-682.

Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *Am Clin Nutr* 2009;89(5):1649S-1656S.

Ros E. Nuts: consumption, composition, health benefits and safety. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 2008;3(70):1-12.

Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilibert R, Casals E, et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* 2004;109(13):1609-1614.

Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002;22:19-34.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362(6423):801-809.

Rubinshtein R, Kuvin JT, Soffler M, Lennon RJ, Lavi S, Nelson RE, et al. Assessment of endothelial function by non-invasive peripheral arterial tonometry predicts late cardiovascular adverse events. *Eur Heart J* 2010;31(9):1142-1148.

Ruiz-Gutierrez V, Morgado N, Prada JL, Perez-Jimenez F, Muriana FJ. Composition of human VLDL triacylglycerols after ingestion of olive oil and high oleic sunflower oil. *J Nutr* 1998;128(3):570-576.

Ruiz-Larrea MB, Ruiz-Sanz JI. Fitoestrógenos y salud. 2008; Available at: <http://www.antioxidantes.com.ar/Art211.htm>. Accessed Julio/1, 2010.

Sabate J, Haddad E, Tanzman JS, Jambazian P, Rajaram S. Serum lipid response to the graduated enrichment of a Step I diet with almonds: a randomized feeding trial. *Am J Clin Nutr* 2003;77(6):1379-1384.

Sabate J, Radak T, Brown JJ. The role of nuts in cardiovascular disease prevention. In: Wildman R, editor. Handbook of nutraceutical and functional foods. Boca Ratón,USA: CRC Press; 2001. p 486-491.

Saez GT, Tormos C, Giner V, Chaves J, Lozano JV, Iradi A, et al. Factors related to the impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. *Am J Hypertens* 2004;17(9):809-816.

Salas-Salvado J, Fernandez-Ballart J, Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Fito M, Estruch R, et al. Effect of a Mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med* 2008;168(22):2449-2458.

Salas-Salvado J, Bullo M, Perez-Heras A, Ros E. Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr* 2006;96 Suppl 2:S46-S51.

Salas-Salvadó J, Megías Rangil I, Arijal Val V, Cabré Cabré P, Masana Marín L, Riera I, et al. Frutos Secos. Guías Alimentarias para la Población Española. Recomendaciones para una dieta saludable. Sociedad Española de Nutrición Comunitaria ed. Madrid: International Marketing & Communication, S.A.; 2001. p 87.

Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C, et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2006;95(4):742-751.

Saura-Calixto F, Goni I. Definition of the Mediterranean diet based on bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009;49(2):145-152.

Sayre LM, Perry G, Atwood CS, Smith MA. The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46(4):731-741.

Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008;21(1):172-188.

Scott JA, King GL. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. *Ann N.Y. Acad Sci* 2004;1031:204-213.

Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18(9):567-579.

Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10(7):709-720.

Serra-Majem L, Trichopoulou A, Ngo de la Cruz J, Cervera P, Garcia Alvarez A, La Vecchia C, et al. Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated? *Public Health Nutr* 2004;7(7):927-929.

Shahidi F, Alasalvar C, Liyana-Pathirana CM. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *J Agric Food Chem* 2007;55(4):1212-1220.

Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, et al. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 1994;36(3):348-355.

Siekmeier R, Steffen C, Marz W. Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12(4):265-282.

Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1985;311(1152):617-631.

Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995;62(6 Suppl):1315S-1321S.

Skrha J, Hodinar A, Kvasnicka J, Hilgertova J. Relationship of oxidative stress and fibrinolysis in diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996;13(9):800-805.

Slavin J. Whole grains and human health. *Nutr Res Rev* 2004;17(1):99-110.

Sofi F. The Mediterranean diet revisited: evidence of its effectiveness grows. *Curr Opin Cardiol* 2009;24(5):442-446.

Souci SW, Fachmann W, Krauss RM. Fruits. In: Scherz H, Senser F, editors. Food composition and nutrition tables. 6^o revised and completed ed. Stuttgart, Germany: Medpharm Scientific Publishers & CRC Press; 2000. p 873-1071.

Spaccarotella KJ, Kris-Etherton PM, Stone WL, Bagshaw DM, Fishell VK, West SG, et al. The effect of walnut intake on factors related to prostate and vascular health in older men. *Nutr J* 2008;7:13.

Spranger T, Finckh B, Fingerhut R, Kohlschutter A, Beisiegel U, Kontush A. How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem Phys Lipids* 1998;91(1):39-52.

Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328(20):1444-1449.

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320(14):915-924.

Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherogenesis. Current concepts. *JAMA* 1990;264(23):3047-3052.

Steinhuibl SR. Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol* 2008;101(10A):14D-19D.

Stephens JW, Gable DR, Hurel SJ, Miller GJ, Cooper JA, Humphries SE. Increased plasma markers of oxidative stress are associated with coronary heart disease in males with diabetes mellitus and with 10-year risk in a prospective sample of males. *Clin Chem* 2006;52(3):446-452.

Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009;202(2):321-329.

Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347(9004):781-786.

Stocker R, Keaney JF, Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84(4):1381-1478.

Suarez Lopez MM, Kizlansky A, Lopez LB. Assessment of protein quality in foods by calculating the amino acids score corrected by digestibility. *Nutr Hosp* 2006;21(1):47-51.

Sudheer AR, Muthukumaran S, Devipriya N, Menon VP. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: With the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology* 2007;230(1):11-21.

Szasz T, Thakali K, Fink GD, Watts SW. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232(1):27-37.

Tapsell LC, Gillen LJ, Patch CS, Batterham M, Owen A, Bare M, et al. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(12):2777-2783.

Taylor HL, Jacobs DR, Jr, Schucker B, Knudsen J, Leon AS, Debacker G. A questionnaire for the assessment of leisure time physical activities. *J Chronic Dis* 1978;31(12):741-755.

Teismann P, Fergert B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse* 2001;39(2):167-174.

Teismann P, Vila M, Choi DK, Tieu K, Wu DC, Jackson-Lewis V, et al. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N.Y.Acad Sci* 2003;991:272-277.

Telci A, Cakatay U, Kayali R, Erdogan C, Orhan Y, Sivas A, et al. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 2000;32(1):40-43.

Therond P, Abella A, Laurent D, Couturier M, Chalas J, Legrand A, et al. In vitro study of the cytotoxicity of isolated oxidized lipid low-density lipoproteins fractions in human endothelial cells: relationship with the glutathione status and cell morphology. *Free Radic Biol Med* 2000;28(4):585-596.

Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000;16(7-8):716-718.

Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 2006;54(2):184-201.

Thomson CD, Chisholm A, McLachlan SK, Campbell JM. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr* 2008;87(2):379-384.

Thorpe SR, Baynes JW. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino Acids* 2003;25(3-4):275-281.

Thun MJ, Peto R, Lopez AD, Monaco JH, Henley SJ, Heath CW, Jr, et al. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N Engl J Med* 1997;337(24):1705-1714.

Tokusoglu O, Unal MK, Yemis F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem* 2005;53(12):5003-5009.

Torabian S, Haddad E, Rajaram S, Banta J, Sabate J. Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *J Hum Nutr Diet* 2009;22(1):64-71.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2008;10(8):1343-1374.

Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 2003;348(26):2599-2608.

Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D. Traditional Greek diet and coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 1994;1(1):9-15.

Tsang C, Higgins S, Duthie GG, Duthie SJ, Howie M, Mullen W, et al. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. *Br J Nutr* 2005;93(2):233-240.

Turko IV, Marcondes S, Murad F. Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(6):H2289-H2294.

Tyrovolas S, Panagiotakos DB. The role of Mediterranean type of diet on the development of cancer and cardiovascular disease, in the elderly: a systematic review. *Maturitas* 2010;65(2):122-130.

Urpi-Sarda M, Garrido I, Monagas M, Gomez-Cordoves C, Medina-Remon A, Andres-Lacueva C, et al. Profile of plasma and urine metabolites after the intake of almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] polyphenols in humans. *J Agric Food Chem* 2009;57(21):10134-10142.

USDA. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 22. 2009; Available at: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl. Accessed Enero 25, 2010.

USDA. Database for the flavonoid content of selected foods. 2007a; Available at: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/flav/flav.html>. Accessed Enero 25, 2010.

USDA. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) of Selected Foods-2007. 2007b; Available at: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl. Accessed Enero 25, 2010.

Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;27(2):120-139.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):37-56.

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

Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity* 2006;14(12):2127-2131.

Van Hoydonck PG, Temme EH, Schouten EG. A dietary oxidative balance score of vitamin C, beta-carotene and iron intakes and mortality risk in male smoking Belgians. *J Nutr* 2002;132(4):756-761.

Vepa S, Scribner WM, Parinandi NL, English D, Garcia JG, Natarajan V. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1999;277(1 Pt 1):L150- L158.

Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001;156(1):67-72.

Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G, et al. Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr* 2005;44(2):121-127.

Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(6):955-965.

Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003;361(9374):2017-2023.

Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol* 2009;50(5):402-409.

Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J* 2000;14(2):271-278.

Weinbrenner T, Fito M, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, et al. Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *J Nutr* 2004;134(9):2314-2321.

Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998;338(15):1042-1050.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115(5):1111-1119.

Wijeratne SS, Abou-Zaid MM, Shahidi F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J Agric Food Chem* 2006;54(2):312-318.

Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44(4):275-295.

Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* 1996;59(1): PL15-PL21.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;339(1-2):1-9.

Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem* 2004;52(12):4026-4037.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994;74(1):139-162.

Zahler S, Kupatt C, Becker BF. ACE-inhibition attenuates cardiac cell damage and preserves release of NO in the postischemic heart. *Immunopharmacology* 1999;44(1-2):27-33.

Zambon D, Sabate J, Munoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, et al. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med* 2000;132(7):538-546.

Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001;286(17):2136-2142.

Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Hasche H, Lobisch M, Schutte K, et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. *Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy*. *Diabetes Care* 1999;22(8):1296-1301.

Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Meissner HP, Lobisch M, Schutte K, et al. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 1995;38(12):1425-1433.

Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* 2004;21(2):114-121.

Zoukourian C, Wautier MP, Chappey O, Dosquet C, Rohban T, Schmidt AM, et al. Endothelial cell dysfunction secondary to the adhesion of diabetic erythrocytes. Modulation by iloprost. *Int Angiol* 1996;15(3):195-200.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011

Lead Article

Nuts and oxidation: a systematic review

Patricia López-Uriarte, Mònica Bulló, Patricia Casas-Agustench, Nancy Babio, and Jordi Salas-Salvadó

In recent years, nuts have received special attention because of their potential role in preventing cardiovascular disease. Because nuts are very rich in total fat that can potentially be oxidized and their skins contain several antioxidants, studies have been conducted to evaluate the potential effect of nut consumption on oxidative stress. This review evaluates the in vitro and in vivo studies conducted in animals or humans to analyze the effect of nuts on oxidation.

© 2009 International Life Sciences Institute

INTRODUCTION

Epidemiological studies have associated frequent nut consumption with a reduced risk of coronary heart disease (CHD), type 2 diabetes, or death by all-cause mortality.¹ Several clinical trials conducted in healthy, hypercholesterolemic, or diabetic individuals, using different types of nuts and study designs, showed improvement in the plasma lipid profile after nut consumption.² The favorable fatty acid profile of nuts means that nut consumption has a beneficial effect on plasma lipids and lipoproteins (Table 1). This appears to be one of the main mechanisms accounting for cardiovascular benefits.³ However, it has been suggested that other mechanisms also contribute to the observed reduction in CHD risk,³ for example, a decrease in the susceptibility to low-density lipoprotein (LDL) oxidation, a decrease in the inflammatory process, or improvement of endothelial function.⁴ Because of their healthy effects, nuts have been included in dietary guidelines published by the United States, Canada, and Spain.⁵⁻⁹ Likewise, the United States Food and Drug Administration (FDA) issued a claim that nuts and nut-containing products protect cardiovascular health.¹⁰

A plethora of physiological disorders and degenerative diseases have been related to oxidative stress,¹¹⁻¹³ which has a key role in atherosclerosis and coronary heart disease.¹⁴ Oxidative modification of LDL is thought to play an important role in the development of

atherosclerosis.¹⁴⁻¹⁶ Of the fats, polyunsaturated fatty acids (PUFA) are the most susceptible to oxidation^{17,18} and the PUFA content of nuts (principally walnuts) may lead to an increase in LDL oxidation.¹⁹ However, emerging evidence indicates that some bioactive compounds in nuts can probably counteract the pro-oxidant effect of PUFA on LDL.²⁰⁻²² This is important because nuts are a rich source of many antioxidants that may protect PUFA in vivo against oxidative modification.²³

Several methods have been used to assess the total antioxidant capacity (TAC) of nuts: for example, FRAP (ferric-reducing plasma ability),²⁴⁻²⁷ ORAC (oxygen radical absorbance capacity),²⁸ TRAP (total radical antioxidant parameter) or TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) assays.²⁷ TEAC and ORAC are based on the antioxidant's ability to react with or neutralize free radicals generated in the assay systems, whereas FRAP measures the reduction of Fe³⁺ (ferric iron) to Fe²⁺ (ferrous iron) in the presence of antioxidants. In contrast, the TRAP assay is based on the protection provided by antioxidants during a controlled peroxidation reaction.²⁷ The TAC measure was considered appropriate for assessing the cumulative antioxidant properties of plant foods.²⁷ However, the impossibility of comparing results obtained with different methodologies has seriously limited understanding of the role of TAC in disease prevention.²⁹ The FRAP assay showed that walnuts have the highest antioxidant capacity (more than 20 mmol/100 g) followed by pecans, chestnuts, peanuts, and pistachios (between 8.3

Affiliations: *P López-Uriarte* and *P Casas-Agustench* are with the Human Nutrition Unit, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. *M Bulló*, *N Babio* and *J Salas-Salvadó* are with the Human Nutrition Unit, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, and the CIBER 06/03, Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain.

Correspondence: *J Salas-Salvadó*, Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, C/Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Spain. E-mail: jordi.salas@urv.cat, Phone: +34-977-75-93-12, Fax: +34-977-75-93-22.

Key words: antioxidant capacity, nut, oxidation, oxidative stress

doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00223.x

Nutrition Reviews® Vol. 67(9):497-508

Table 1 Fatty acid composition of nuts.

Nut	SFA	MUFA	PUFA
	(g/100g)	(g/100g)	(g/100g)
Almonds	3.73	30.89	12.07
Cashews	7.78	23.80	7.84
Hazelnuts	4.46	45.65	7.92
Peanuts	6.83	24.43	15.56
Chestnuts	0.42	0.78	0.89
Walnuts	6.13	8.93	47.17
Brazil nuts	15.14	24.55	20.58
Macadamia nuts	12.06	58.88	1.50
Pecans	6.18	40.80	21.61
Pine nuts	9.38	22.94	25.67
Pistachios	5.44	23.32	13.45

Abbreviations: MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SFA, saturated fatty acids. Data from US Department of Agriculture Nutrient Database for Standard Reference, Release 21.⁶⁹

and 1.3 mmol/100 g) and then hazelnuts, almonds, Brazil nuts, macadamias, pine kernels, and cashews (between 0.3 and 0.7 mmol/100 g).²⁵

Nuts have different types of antioxidants (Table 2). For instance, almonds contain flavonoids such as catechins, flavonols, and flavonones in their aglycone and glycoside form,³⁰ while peanuts and pistachios contain flavonoids and have the highest concentration of resveratrol in comparison with the other nuts.³¹ Walnuts contain a wide range of polyphenols and tocopherols²⁰ and cashews have alkyl phenols as the principal antioxidant.³² The phytochemicals contained in nuts could work in synergy with other important nut constituents to promote antioxidant activities.³³

In recent years, ambiguous results have been published about the possible effect of nuts on oxidative stress status. The purpose of this article is to review human trials, studies conducted on animals, and studies conducted using in vitro assays to evaluate the effect of nuts on oxidative stress parameters.

Effects of tree nut extracts on oxidative stress in in vitro studies

All of the six studies using in vitro assays that were analyzed in this review showed an improvement in most of the oxidative stress biomarkers assessed with several types of tree nut extracts on human plasma or LDL particles, bovine liver microsomal membranes, or plasmid DNA. Four studies that evaluated lipid peroxidation as the conjugated diene (CD) formation on human LDL particles after incubation with walnut extracts,³⁴ almond-skin flavonoids³⁵ or polyphenols,³⁶ or pistachio hydrophilic extracts³⁷ found a significant increase in the lag time and therefore greater inhibition of lipid peroxidation in LDL. Anderson et al.³⁴ also found a significant

Table 2 Phytochemical compounds of nuts with antioxidant effects.

Nut*	Phytoesterol†	Phenols	Flavonoids‡	Resveratrol*	Carotenoid§	Vitamin Et	β-tocopherol	γ-tocopherol
	(mg/100 g)	Proanthocyanidins‡	(mg/100 g)	(μg/100 g)	(μg/100g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)
Almonds	141	184.02	15.24	NA	2	26.22	0.29	0.65
Cashews	NA	8.68	1.98**	NA	22	0.90	0.03	5.31
Hazelnuts	96	500.66	11.74	NA	106	15.03	0.33	0.00
Peanuts	220	15.62**	0.66	84	0	8.33	NA	NA
Chestnuts	22	0.05**	0.02	NA	NA	NA	NA	NA
Walnuts	72	67.25	2.71	NA	21	0.70	0.15	20.83
Brazil nuts**	NA	0.00	0.00	NA	0	5.73	0.00	7.87
Macadamia nuts	116	0.00**	0.00	NA	NA	0.54	0.00	0.00
Pecans	102	494.05	34.01	NA	55	1.40	0.39	24.44
Pine nuts**	NA	0.00	0.49	NA	NA	NA	NA	NA
Pistachios	214	237.34	14.37	115	332	2.30	0.00	22.60

* Nuts are raw unless indicated otherwise.

† Data from US Department of Agriculture Nutrient Database for Standard Reference, Release 21.⁶⁹

‡ Data from US Department of Agriculture Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods.⁷⁰ Total nut carotenoids are the sum of β-carotene, α-carotene, β-cryptoxanthin, lycopene, and lutein + zeaxanthin.

§ Data from US Department of Agriculture Database for the Flavonoid Content of Selected Foods.⁷¹ Total nut flavonoids are the sum of anthocyanidins, flavan-3-ols, flavanones, flavones, and flavonols.

¶ Data from Tokusoglu et al. (2005).⁷²

** Nuts are not raw. Cashews are "cashew-oil-roasted, without salt added"; peanuts are "all types, oil-roasted, with salt"; chestnuts are "dried, unpeeled"; Brazil nuts are "dried, unblanched"; Macadamia nuts are "dry roasted, without salt added"; pine nuts are "Pinyon, dried" in the corresponding USDA Database.

Abbreviations: NA, not available.

reduction in the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) after 4 h of human plasma incubation in the presence of 100 and 150 $\mu\text{mol/L}$ gallic acid equivalents of walnut phenolic extracts.

By inhibiting CD formation, two studies assessed lipid peroxidation in human LDL; one study used whole almonds, the brown skin of almonds, or extracts of the green shell cover of almonds,³⁸ while the other used whole hazelnuts or byproducts of hazelnuts.³⁹ Wijeratne et al.³⁸ observed effective inhibition of human LDL oxidation with extracts of whole almond seed, brown skin, or green shell cover at 10, 50, and 100 ppm quercetin equivalent doses after 20 h of incubation in comparison to quercetin, which was used as the reference control compound. Shaihidi et al.³⁹ also observed that extracts of hazelnut byproducts (skin, shell, green leafy cover, tree leaf) significantly decreased lipid peroxidation after 22 h of incubation compared to hazelnut kernel by increasing the percentage of inhibition of CD formation in human LDL.

Gentile et al.³⁷ investigated how the lipophilic and hydrophilic extract of a Sicilian variety of pistachio protected against lipid peroxidation in a study that evaluated TBARS formation on bovine liver microsomes. The results showed that, in the presence of hydrophilic pistachio extract, TBARS formation decreased significantly in bovine liver microsomes compared to those microsomes incubated in the absence of pistachio extract.

Finally, two *in vitro* studies evaluated the oxidative damage of DNA by monitoring the percentages of retention of supercoiled DNA with a tree-nut extract on plasmid DNA of *Escherichia coli*.^{38,39} Both studies showed that incubation for 1 h with whole almonds, brown skin of almonds, or green shell extracts of almonds,³⁸ or with the kernel (with skin), the skin, the hard shell, the green leafy cover, or leaf extracts of hazelnuts³⁹ had a greater protective effect against strand breaking in supercoiled DNA than incubation with the control compounds quercetin or catechin.

All six of these studies suggest that tree-nut extracts possess an *in vitro* antioxidant capacity and are an excellent source of natural antioxidants with potential capacity for modulating oxidative stress.

Effect of nuts on oxidation in animal studies

Few studies have evaluated the effect of nut consumption on oxidation in animal models. In fact, only six experimental studies (four chronic and two acute) have analyzed the effect of nuts on lipid peroxidation, antioxidant enzymatic activity, and cholesterol oxidation products. Of these, five were conducted in rodents and one in rabbits.

Similar non-significant chronic effects were observed in two animal studies that measured lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activities in aortic

tissues after animals had been fed with diets enriched with walnuts. In male Golden Syrian hamsters, Davis et al.⁴⁰ assessed how 12 experimental high-fat atherogenic diets with increasing concentrations of whole walnuts (61–150 g/kg of feed) or α -tocopherol (8.1–81 mg/kg), and single diets with either walnut oil (32 g/kg) or pure γ -tocopherol (81 mg/kg), affected some atherosclerosis-related markers. The content of carbohydrates, proteins, fat, fiber, vitamin, and mineral for each diet was maintained at a constant level throughout the 12 experimental diets. No significant differences in aortic Mn and Cu/Zn superoxide dismutase or biliverdin reductase protein levels were observed after 26 weeks between hamsters fed with walnuts and those fed with α -tocopherol- or γ -tocopherol-enriched diets. However, the increase in dietary walnuts was associated with a significant inverse, dose-dependent effect in the aortic endothelin (ET-1) levels, while they were not affected by dietary α -tocopherol. The authors suggested that the beneficial effects on CVD risk observed in this study after walnut consumption were not due to changes in oxidative stress but were partly due to ET-1-related effects on the endothelial processes. Likewise, Iwamoto et al.⁴¹ observed no significant changes in the levels of cholesterol oxidation endproducts in the abdominal or thoracic aorta of apolipoprotein-E (apo-E)-deficient mice after consumption of a walnut-oil-enriched diet compared to mice fed with a high-linoleic safflower oil-enriched diet. However, female mice that were fed the walnut oil-enriched diet had a greater lesion area in the aortic root than those on the safflower oil diet. These observations have been attributed by the authors to the high α -linolenic content in walnuts and the specificity of the apo-E-deficient mice model studied.

In contrast, Aksoy et al.⁴² evaluated the effect of pistachio consumption on serum paraoxonase-1 (PON1) and arylesterase activities. A total of 36 rats were randomly allocated to one of three diets for 10 weeks: a diet enriched with 2.5 g/day of pistachios (20% of the total caloric intake), a diet enriched with 5 g/day of pistachios (40% of the total caloric intake), or a control diet. The rats that consumed 20% of their daily energy in the form of pistachios exhibited a significant increase in PON1 and arylesterase activities compared to controls. However, increased antioxidant activity was mitigated when pistachio intake was increased to 40% of daily caloric intake, but it was still higher than that of the control group. Hatipoglu et al.⁴³ demonstrated that hazelnut oil has an effect on lipid peroxidation in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. After 14 weeks of nut consumption, plasma, liver, and aorta lipid peroxidation (measured by malondialdehyde [MDA] levels and CD formation) were significantly lower than in rabbits that did not consume

hazelnuts. However, no differences were observed in glutathione, glutathione peroxidase, or glutathione transferase activities in liver between diets that contained hazelnut oil and those that did not. The authors suggested that hazelnut oil may have antiatherogenic potential, which could be related to its reducing effect on oxidative stress biomarkers and, especially, on LDL oxidation.

Both acute studies showed that oxidative stress biomarkers improved after rodents consumed walnuts⁴⁴ or flavonoid extracts from almond skin.³⁵ In hamsters, a significant postprandial increase in the plasma concentrations of catechin, epicatechin, and flavonoids was associated with a longer lag time of the LDL oxidation 120 min after the ingestion of 40 μ M of gallic acid equivalents (6.8 mg of an almond skin flavonoid extract) than in hamsters that did not ingest the almond extract.³⁵ These results suggest that this flavonoid extract is bioavailable and acts in synergy with vitamins C and E to protect LDL against oxidation.³⁵ The second acute study was carried out with rats.⁴⁴ After a fasting period, animals in the control group were given access to rodent chow, whereas the nut group was given walnut bulk. After 5.5 h of walnut consumption, the postprandial serum antioxidant capacity (measured by TEAC and FRAP) increased significantly in comparison to that of the control group. This beneficial effect was related to the increased levels of blood melatonin secondary to the ingestion of walnuts.

SYSTEMATIC REVIEW OF THE EFFECT OF NUTS ON BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS IN CONTROLLED FEEDING TRIALS OF HUMANS

Literature search method

The data for this review were obtained from articles identified through the PubMed⁴⁵ and Web of Science⁴⁶ databases (from January 1990 to January 2009) and from reference lists of other relevant publications selected for review. Search terms used included MeSH terms (PubMed): “nuts” [Mesh] AND “humans” [Mesh] refined by the type of article (controlled clinical trial, randomized controlled trial) in “All Fields” as tag terms. The key words used in Web of Science were: (oxidat*) AND (almond* OR cashew* OR hazelnut* OR macadamia* OR peanut* OR pistachio* OR walnut* OR chestnut* OR pecan* OR pine nut OR Brazil nut OR filbert* OR hickory*), refined by: document type, subject areas, and publication period.

Studies were selected using the following criteria: 1) They had to be randomized, controlled, clinical feeding trials. 2) The intervention diet had to be supplemented with at least one of the following types of nut: almond, cashew, hazelnut, macadamia, peanut, pistachio, walnut, chestnut, pecan, pine nut, and Brazil nut. 3) They

had to be published in a scientific journal between January 1990 and January 2009. 4) They had to be original. 5) They had to evaluate the effects of nuts on at least one of the following oxidative stress biomarkers: in vivo antioxidant capacity, oxidized LDL, MDA concentrations, plasma or urine isoprostane concentrations, CD formation, antioxidant non-enzymatic and enzymatic activities or DNA damage were the primary or secondary objectives.

Of the 681 articles identified by Web of Science,⁴⁶ 72 were excluded because of document type (review, note, letter, proceedings paper, or meeting abstract), 343 because of subject area, and nine because of time span. Of the 257 articles screened (titles and abstracts), 235 were excluded for the following reasons: 155 were irrelevant to the topic, 24 assessed the antioxidant or lipid content of nuts, 20 used animal models, and 36 were in vitro studies. The 22 remaining studies were conducted in humans. Of these 22 studies, five did not meet the inclusion criteria. Therefore, 17 studies from this database were included in our review.

Of the 45 human studies identified by PubMed,⁴⁵ 37 did not meet the inclusion criteria. After six duplicates were removed, two studies from this database were included in the review.

The reference lists of other relevant publications selected for review revealed five publications. Of these, two were not included in the review because they were not randomized studies^{47,48} and two were not included because nuts were not used as a simple food but as part of a whole diet and the amount of nuts used was not specified.^{49,50} Consequently, 20 clinical trials were identified that were suitable for inclusion in the present systematic review. Of these, five evaluated antioxidant capacity, 16 evaluated parameters related to lipid peroxidation, five evaluated antioxidant enzymatic and non-enzymatic activities, and two evaluated markers related to DNA damage.

Once the articles had been selected, the following significant data were extracted: author and year of publication, number and gender of the participants, type of individuals studied (i.e., healthy, hypercholesterolemic, smokers, non-smokers, high CHD risk, type 2 diabetes, or metabolic syndrome patients), type of study, length of the interventions (weeks), interventions used, dose of nuts administered (g/day), and the results in relation to the oxidative stress biomarkers evaluated.

Results of the studies reviewed

Individuals studied. Almost all the 20 studies analyzed were carried out in small population samples that were heterogeneous as far as gender, age, and health status were concerned (Tables 3 and 4). The two studies that contained the highest numbers of individuals were by Davis

Table 3 Clinical trials evaluating the chronic effect of nut consumption on oxidative stress biomarkers.

Reference	N (M/F) Type of individuals	Type of study, length of the intervention)	Control group	Intervention groups	Dose of nut (g/day)	Lipid peroxidation		Conjugated diene formation in LDL	Antioxidant non- enzymatic and enzymatic activity	DNA damage
						Serum oxidized LDL	MDA			
Zambón et al. (2000) ²⁰	49 (23/26) HC	Crossover (6 wk each period)	Mediterranean diet	Mediterranean diet + walnuts	41-56	NE	NE	↓ lag time (NS)	NE	NE
Hargrove et al. (2001) ⁵³	22 (9/13) Healthy	Crossover (3.5 wk each period)	American diet	a) Low-fat, step-II diet b) High MUFA (olive oil) c) High MUFA (peanut oil) d) High MUFA (peanuts + peanut butter)	c) 17.0 d) 18.3 + 18.0	NE	NE	↑ lag time in peanut oil (NS) and in peanut + peanut butter (P < 0.05) = Vmax in peanut oil (NS) and in peanut + peanut butter (NS) ↑ Cmax in both peanut treatments (NS)	NE	NE
Muñoz et al. (2001) ⁶²	6 (6/0) HC	Crossover (6 wk each period)	Mediterranean diet	Mediterranean diet + walnuts	41-56	NE	NE	↓ lag time (NS) ↑ Vmax (P = 0.012) ↑ Cmax (NS)	NE	NE
Hyson et al. (2002) ⁵⁴	22 (10/12) Healthy	Crossover (6 wk each period)	Control diet	a) Control diet + almond oil replacing other sources of fat b) Control diet + almonds replacing other sources of fat	66 ± 5	NE	NE	↑ lag time (NS) ↓ Vmax (NS) ↑ Cmax (NS)	NE	NE
Iwamoto et al. (2002) ²¹	40 (20/20) Healthy	Crossover (4 wk each period)	Japanese diet	Japanese diet + walnuts	44-58	NE	NE	↓ lag time (NS)	NE	NE
Jenkins et al. (2002) ⁶³	27 (15/12) HC	Crossover (4 wk each period)	Low-fat, step-II diet	a) Low-fat diet + almonds b) Low-fat diet + half-dose of almonds	a) 73 b) 37	NE	NE	↓ Cmax (P ≤ 0.01)	NE	NE
Ros et al. (2004) ²²	20 (8/12) HC	Crossover (4 wk each period)	Mediterranean diet	Mediterranean diet + walnuts	40-65	↓ (NS)	↓ in plasma (NS)	↓ lag time (NS)	NE	NE
Haddad et al. (2006) ⁵⁹	24 (14/10) Healthy	Crossover (4 wk each period)	Isocaloric, step-I diet	Isocaloric, step-I diet + pecans	72	NE	↓ in plasma (P < 0.014)	NE	NE	NE
Jia et al. (2006) ⁶¹	30 (30/0) Smokers	Parallel (4 wk)	Chinese diet	a) Chinese diet + low-dose of almond powder b) Chinese diet + high-dose of almond powder	a) 84 b) 168	NE	↓ in plasma (P < 0.05) in both doses	NE	↑ in plasma SOD (NS) in both doses ↑ in plasma GSH-Px (NS) in both doses	↓ urine 8-OHdG (P < 0.05) in both doses ↓ % tail DNA (P < 0.05) in high dose
Kocyligit et al. (2006) ⁵⁵	44 (24/20) Healthy	Parallel (3 wk)	Isocaloric low-fat diet	Isocaloric low-fat diet + pistachio	65-75	NE	↓ in plasma (P < 0.05)	NE	NE	NE

Table 3 Continued

Reference	N (M/F) Type of individuals	Type of study, (length of the intervention)	Control group	Intervention groups	Dose of nut (g/day)	Lipid peroxidation		Antioxidant non-enzymatic activity	DNA damage
						Serum oxidized LDL	Conjugated diene formation in LDL		
Canales et al. (2007) ⁶⁶	22 (12/10) High CHD risk	Crossover (5 wk each period)	Control diet	Control diet + walnut-paste-enriched meat and sausage	21.4	NE	↓ in erythrocytes (P = 0.05)	↑ catalase* (P = 0.05) ↑ SOD* (NS) ↑ PONI* (NS) ↑ total glutathione* (P < 0.001) ↑ GSH* (NS) ↑ GSSG* (P < 0.01) ↓ GSH/GSSG* (P < 0.05)	NE
Davis et al. (2007) ⁵¹	64 (29/35) MetS	Parallel (8 wk)	South African isocaloric diet (SAID)	a) SAID supplemented with walnuts b) SAID supplemented with cashews	63–108	NE	NE	↓ plasma GSH (NS) ↓ plasma GSSG (NS) ↑ plasma GSH/GSSG (NS)	NE
Li et al. (2007) ⁵²	60 (60/0) Smokers and non-smokers	Crossover (4wk each period)	Chinese diet + pork meat	Chinese diet + almond powder supplement	84	NE	↓ in urine (P < 0.05) in smokers	↑ plasma SOD (P < 0.05) in smokers ↑ plasma GPx (P < 0.05) in smokers ↓ plasma Catalase (NS) in smokers	In smokers: ↓ urine 8-OHdG (P < 0.05) ↓ % tail DNA (P < 0.05)
Nus et al. (2007) ⁶⁷	23 (14/9) High CHD risk	Crossover (5 wk each period)	Control diet	Control diet + walnut-paste-enriched meat and sausage	21.4	(NS)	↓ in erythrocytes (P = 0.031) of PONI-192R polymorphism carriers ↓ in serum (P = 0.04) in full dose	NE	NE
Jenkins et al. (2008) ⁶⁴	27 (15/12) HC	Crossover (4 wk each period)	Low-fat diet	a) Low-fat diet + full-dose almond b) Low-fat diet + half-dose almond	a) 73 b) 37	NE	NE	NE	NE
Thomson et al. (2008) ³⁸	59 (30/29) Healthy	Parallel (12 wk)	Normal diet	Normal diet + Brazil nuts	8	NE	NE	↑ GPx in whole blood (P < 0.001) ↑ GPx in plasma (P = 0.002)	NE

* Measured in erythrocytes.

Abbreviations: 8 OH dG, 8-hydroxy-deoxyguanosine; % tail DNA, DNA strand breaks; CHD, coronary heart disease; Cmax, maximum concentration; F, female; GPx, glutathione peroxidase activity; GSH, reduced glutathione concentration; GSH:GSSG, reduced glutathione/oxidized glutathione ratio; GSH-Px, glutathione peroxidase activity; GSSG, oxidized glutathione; HC, hypercholesterolemia; LDL, low density lipoprotein; M, male; MDA, malondialdehyde; MetS, metabolic syndrome; MUFA, monounsaturated fatty acid; N, number; NE, non-evaluated; NS, non-significant; P, value of the difference between nuts and control diet; PONI1, paraoxonase-1; PONI1-192R, subjects carrying arginine at least in one allele of position 192; polymorphism; SOD, superoxide dismutase activity; Vmax, maximum velocity; wk, weeks.

Table 4 Clinical trials evaluating the acute effect of nut consumption on oxidative stress biomarkers.

Reference	N (M/F), type of individuals	Type of study (length of intervention)	Control group	Intervention groups	Dose of nuts (g/day)	Antioxidant capacity		Lipid peroxidation		Conjugated diene formation in LDL	
						NE	↓ (NS)	Serum oxidized LDL	MDA	Plasma total isoprostanes	Lag time
Cortés et al. (2006) ⁵⁶	24 (20/4) Healthy and HC	Crossover (1 day each test meal)	High-fat meal + olive oil	High-fat meal + walnut	40	NE	↓ (NS)	NE	NE	(NS)	(NS)
Jenkins et al. (2006) ⁵⁷	15 (7/8) Healthy	Crossover (1 day each test meal)	97 g of white bread	97 g of white bread + almonds	60	Serum postprandial TAC (NS)	NE	NE	NE	NE	NE
Berry et al. (2008) ⁶⁰	20 (20/0) Healthy	Crossover (1 day each test meal)	Muffins with 50 g of sunflower oil blend	Muffins with whole almond seed macroparticles Muffins with almond oil + defatted almond flour	96.5 50.0 + 47.0	NE	NE	NE	(NS)	NE	NE

Abbreviations: Cmax, maximum concentration; F, female; HC, hypercholesterolemic; LDL, low density lipoprotein; M, male; MDA, malondialdehyde; N, number; NE, non-evaluated; NS, non-significant; P, value of the difference between nuts and control diet; TAC, total antioxidant capacity; Vmax, maximum velocity.

et al.,⁵¹ who investigated the effect of walnut and cashew consumption on the antioxidant status of 64 subjects with metabolic syndrome, and by Li et al.,⁵² who investigated the effect of almonds on 60 male smokers and non-smokers. In total, these 20 studies included a total of 656 individuals (400 men and 256 women). Some of the studies were performed on healthy individuals,^{21,53-60} while others were performed on smokers^{52,61} and non-smokers,⁵² hypercholesterolemic,^{20,22,56,62-64} type 2 diabetic⁶⁵ or metabolic syndrome patients,⁵¹ or individuals at high risk of CHD.^{66,67}

Study design and length. Most of the studies were cross-over clinical trials ($n = 15$), but five used a parallel design.^{51,55,58,61,65} The two types of clinical trials were of varying duration. In the crossover studies, the intervention period lasted between 3.5 and 6 weeks. In the parallel studies, the longest intervention period was 24 weeks⁶⁵ and the shortest was 3 weeks.⁵⁵ Three crossover studies (Table 4) evaluated the acute effect of a meal containing nuts, so the intervention was conducted in a single day.^{56,57,60}

Intervention and control treatments. Nuts were administered in different types, doses, and presentations. The nuts evaluated were walnuts,^{20-22,51,56,62,65-67} peanuts,⁵³ almonds,^{52,54,57,60,61,63,64} pistachios,⁵⁵ cashews,⁵¹ pecans,⁵⁹ and Brazil nuts.⁵⁸ The total dose of nuts used in most clinical trials was between 17 and 168 g/day, except in the study by Thomson et al.,⁵⁸ which evaluated the effect of only 8 g of Brazil nuts per day. In most studies, raw nuts were administered in the context of a meal or diet ($n = 15$), although in some, the nuts were dry roasted ($n = 1$), cooked ($n = 3$), or in the form of butter ($n = 1$), oil ($n = 3$), flour ($n = 1$), or powder ($n = 2$). Comparisons were made with control diets or meals in which the individuals were asked not to consume nuts, nut butter, or nut oil of any kind. Some studies compared the effect of different doses of nuts.^{53,60,61,63,64}

In six trials, the diet was totally controlled and meals were provided in a canteen or a metabolic kitchen.^{21,51-53,59,61} In five of these trials, both the control and the intervention diets were isocaloric.^{21,51-53,59} In seven studies, patients received dietary recommendations so that the intervention group and the control group received isocaloric diets.^{20,22,53-55,62} This was achieved by replacing energy from monounsaturated fatty acids (MUFA) or total fat in the control group by nuts or nut oil in the intervention group. In eight studies, both the control group and the intervention group received the usual diet or a low-fat diet. However, only the intervention group received nuts as a supplement; the control group was given instructions to avoid them.^{52,58,59,61,63,64,66,67} Basal diets were quite different among the studies: in three studies, a Mediterranean

diet was administered,^{20,22,62} in eight cases, the diet was Asian or low-fat,^{21,52,55,59,61,63-65} and in all others, the diet was a habitual or Western type.^{51,53,54,58,66,67} In the trials that evaluated the acute effect of nut consumption, nuts were administered in the context of a meal. In two studies, the fat content in the control meal (olive⁵⁶ or sunflower oil⁶⁰) was replaced by fat in the form of nuts. In another study, almonds were administered as a supplement to the meal in the intervention group.⁵⁷

Effect of nuts on the antioxidant capacity. The results from studies evaluating the effect of nuts on antioxidant capacity are mixed. In the parallel-design study by Kocyigit et al.,⁵⁵ 44 healthy individuals were randomly assigned to either an isocaloric regular diet or a whole-pistachio diet for 3 weeks. In the pistachio group, the authors observed a significant increase in the plasma antioxidant potential, measured as the capacity to inhibit TBARS production. Using the ORAC method, another chronic study showed no significant effect on the plasma antioxidant capacity after the whole-walnut or cashew diet interventions in subjects with metabolic syndrome.⁵¹ In a parallel, randomized, controlled trial, Tapsell et al.⁶⁵ assessed the total plasma antioxidant capacity in type 2 diabetes patients and found no significant difference in total plasma antioxidant capacity after 24 weeks of walnut consumption as a supplement in the context of a low-fat diet.⁶⁵ The postprandial serum total antioxidant capacity was also evaluated by using an acute clinical trial with a randomized crossover design.⁵⁷ In this study, the postprandial antioxidant capacity of serum was not significantly influenced by the consumption of 60 g of raw, unblanched almonds added as a supplement to the basal meal.

Effect of nuts on serum oxidized LDL. All of the studies evaluating lipid peroxidation by measuring the oxidized LDL in serum observed that nut consumption induced no significant changes.^{22,56,67} Using a crossover design, Ros et al.²² evaluated the effect of walnut consumption in 20 hypercholesterolemic patients. Patients were randomly allocated to two isocaloric dietary interventions in which nuts replaced other sources of MUFA in the context of a Mediterranean diet. Although levels of oxidized LDL particles in serum showed a non-significant decrease after 4 weeks of a walnut-diet intervention, no significant differences in oxidized LDL were observed between the two intervention diets. The same non-significant tendency to lower the serum oxidized LDL levels was observed by Cortés et al.⁵⁶ in healthy and hypercholesterolemic individuals. They used a crossover study to compare the postprandial effect of one high-fat meal with another in which fat content in the form of olive oil was replaced by walnuts.

Finally, Nus et al.⁶⁷ used a crossover design study in which walnut-enriched restructured steaks and sausages were added to the regular diets of patients at high risk for CHD for 5 weeks. They observed no significant changes in oxidized LDL.

Effect of nuts on malondialdehyde concentration. Lipid peroxidation, measured by the mean of MDA concentrations, decreased in almost all the studies (7/8) that evaluated the effect of dietary nut consumption on this oxidation parameter. In these studies, MDA concentrations were measured in four biologically different samples: plasma, urine, serum, and erythrocytes. This favorable effect on MDA concentrations was observed not only in subjects with metabolic stress,^{52,61,64-67} but also in healthy individuals.^{55,59}

Only two studies have evaluated the effect of almond consumption on smokers. In one study with a parallel design, 30 male smokers were randomly assigned to a standard diet or a diet enriched with 84 or 168 g/day of powdered almonds. All the patients on an almond-enriched diet experienced a significant decrease in plasma MDA concentrations and a better response in other oxidation parameters.⁶¹ This beneficial effect on lipid MDA urine concentrations was also observed by the same group of researchers using a crossover study in another series of 60 smokers.⁵²

The effect of nuts was also analyzed in hypercholesterolemic patients⁶⁴ and in subjects at high risk of CHD.^{66,67} In a crossover study, the serum MDA concentrations of hypercholesterolemic patients decreased significantly more when the patients consumed 73 g of whole almonds than when they consumed half this amount or no almonds at all.⁶⁴

Two studies measured MDA concentrations in erythrocytes to evaluate the effect of walnut consumption.^{66,67} Both clinical trials were conducted by the same group of investigators on patients at high risk of CHD, and both studies used the same crossover design. In periods of 5 weeks, patients received walnut-enriched restructured steaks and sausages in the context of their usual diet, or steaks and sausages without walnuts. In both studies, erythrocyte MDA concentrations decreased significantly during the walnut-enriched-meat-diet period compared to the period without walnuts. It should be pointed out that in the study conducted by Nus et al.⁶⁷ this decrease in lipid peroxidation was only observed in patients with the PON1-192R polymorphism, suggesting that this polymorphism modulates the effect of walnut consumption on lipid peroxide in LDL and, therefore, probably the risk of CHD by this mechanism.

Effect of nuts on urine isoprostane concentrations. Only two of the 20 studies analyzed in this review evaluated

lipid peroxidation by measuring the 24-h urine isoprostane concentration. In a crossover clinical trial carried out in 27 hypercholesterolemic men and women, Jenkins et al.⁶⁴ showed that this biomarker of fat oxidation was significantly lower when patients received the almond supplement in the context of a low-fat diet than when they did not receive it. It should be noted that after creatinine correction, urinary isoprostane outputs during almond supplementation were lower than during the control diet.

However, using an acute, randomized, crossover design, postprandial total 8-isoprostane- $F_2\alpha$ plasma concentrations were not significantly influenced by the consumption of almond test muffins baked with either 96.5 g of almond seeds or with 50 g of almond oil and 47 g of defatted almond flour.⁶⁰

Effect of nuts on lipid peroxidation measured by CD formation in LDL particles. Several indexes can be used to measure the kinetics of the CD formation and thus describe the potential of the LDL particles to oxidate: the lag time, defined as the interval between the intercept of the linear least-square slope of the curve with the initial-absorbance axis; the maximal rate of oxidation (V_{max}) index, calculated from the slope of the absorbance curve during the propagation phase; and the maximal amount of dienes (C_{max}) formed.⁶⁸

Of the 20 articles selected, eight focused on the lag time, V_{max} , and/or C_{max} formation to evaluate the effect of nut consumption on lipid peroxidation in LDL particles. All the studies were conducted on healthy and hypercholesterolemic patients, and all used a crossover clinical trial to analyze the effect of consuming different types of nut-enriched diets. Four of these studies measured the three CD indexes in LDL particles,^{53,54,56,62} whereas three other studies evaluated lipid peroxidation by measuring only the lag time.²⁰⁻²² Only one measured the C_{max} index.⁶³

Some of these studies found an improvement in CD formation, whereas others failed to find any significant effects. Yet others have described a worse response after nut consumption. The equivocal effects observed in these studies are largely dependent on the type of nuts investigated.

Four chronic clinical trials studied the effect of walnut consumption on CD formation using a crossover design. Three of these studies were conducted by the same group of investigators on hypercholesterolemic patients^{20,22,62} and they analyzed the effect of two Mediterranean isocaloric diets in which MUFA-rich foods were replaced by walnuts. Iwamoto et al.,²¹ however, studied a group of healthy women and compared the effect of two isocaloric Japanese diets in which other sources of fat were replaced by walnuts. In all of these

studies, response tended to be worse during the walnut consumption period. Muñoz et al.⁶² described a significant increase in the V_{max} associated with a non-significant increase in the C_{max} index during the Mediterranean diet with walnuts period. The effect of walnut consumption was also studied under acute conditions in hypercholesterolemic patients by Cortés et al.⁵⁶ The lag time and V_{max} indexes showed no significant differences in lipid peroxidation after meals containing walnuts and isocaloric meals containing the same amount of fat in the form of olive oil.

Mixed results were also observed when the effect of almond consumption on healthy and hypercholesterolemic patients was analyzed. Lipid peroxidation decreased significantly in hypercholesterolemic patients after a low-fat diet supplemented with 73 or 37 g of almonds in comparison with a control, low-fat diet.⁶³ In contrast, Hyson et al.⁵⁴ showed a non-significant effect on CD kinetics of a whole-almond diet compared to a diet containing the same calories in the form of almond oil or after the control diet (without almonds).

Hargrove et al.⁵³ evaluated how a low-fat or various monounsaturated-enriched diets (with olive oil, peanut oil, and peanuts plus peanut butter) affected LDL oxidative susceptibility in vitro. In comparison to a typical American diet, a significant increase in LDL lag time was reported in healthy subjects after they had consumed a low-fat diet or high-MUFA diets containing different sources of MUFA.

Effect of nuts on antioxidant non-enzymatic and enzymatic activity. The effect of nut consumption on antioxidant non-enzymatic or enzymatic activity was measured in five studies. Positive effects were observed in three of them and no statistically significant effect in two. In one crossover study, antioxidant defense mechanisms in male smokers increased significantly after the subjects consumed almond powder.⁵² The same study also reported an increase in superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymatic activities when subjects consumed the almond-powder supplement. Canales et al.⁶⁶ also showed general improvement in the antioxidant status (an increase in the erythrocyte catalase activity and a decrease in the glutathione/oxidized glutathione ratio) of high-coronary-risk patients after they consumed a diet containing walnut-enriched meat. These beneficial effects on antioxidant enzymatic activities were also reported in the parallel study conducted by Thomson et al.⁵⁸ In comparison with the control groups (one of which was receiving a seleniomethionine tablet and the other a placebo), a significant increase in total blood and plasma glutathione peroxidase activities was reported in healthy subjects after their diet was supplemented with small amounts of Brazil nuts for a 12-week period.

Finally, no differences in the plasma glutathione or oxidized glutathione levels were observed in metabolic syndrome patients after they had consumed a control diet or an isocaloric diet with or without a walnut or a cashew supplement.⁵¹ Similar results were reported by Jia et al.⁶¹ in a parallel study analyzing the effect of an almond-powder supplement in smokers.

Effect of nuts on oxidative DNA damage. Oxidative DNA damage was analyzed in only two studies, which were conducted in healthy male smokers after they had consumed a supplement of whole-almond powder. Both parameters analyzed in these studies – the percentage of DNA strand breaks in lymphocytes and 8-hydroxydeoxyguanosine urine concentrations – decreased significantly after subjects had consumed a diet containing almonds. This finding suggests almonds can help decrease the oxidative stress mediated by tobacco.^{52,61}

CONCLUSION

Nuts comprise a complex food group and are rich in bioactive constituents that can affect cardiovascular health. In vitro studies have shown that incubating cells with extracts from several tree nuts (some of them very rich in polyphenols) can inhibit oxidative susceptibility. This may be due to the phytochemical compounds they contain. However, in experimental studies conducted with animals, or in human clinical trials, the consumption of several types of nuts as a whole food was not observed to have any consistent positive effects on oxidation status. Most of the studies that showed a potential beneficial effect of nuts on oxidation focused on almonds, pistachios, Brazil nuts, or peanuts, all rich sources of MUFAs. This beneficial effect on oxidation was not found consistently in walnut trials performed on humans. However, no deleterious effects on oxidation were reported in any of the published studies. All in all, the studies suggest that, although some whole nuts are susceptible to oxidation because of their PUFA content – which is particularly high in walnuts – the potential antioxidant activity of the polyphenols, phytosterols, and other antioxidants contained in nuts, particularly in the skin, may counteract the pro-oxidant effects of fat, thus preventing potentially adverse effects on oxidation.

Further studies on nuts fully characterizing the antioxidant content, bioaccessibility, bioavailability, metabolism, and elimination in humans will be necessary in the future. The possible interactions between different nut antioxidant products and other important nut constituents that promote antioxidant activities also need to be explored. Such studies may help elucidate the mecha-

nisms explaining the effect of consuming nuts or their byproducts on oxidative stress status in humans.

Acknowledgments

The authors would like to thank Carles Munné for manuscript preparation.

Funding. This study was supported by the Ministry of Education and Science (CICYT-AGL2005-03605) and the Ministry of Health (Instituto Carlos III, RTIC RD06/0045). CIBEROBN is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III, Spain. *PL-U* is a recipient of a predoctoral fellowship from the Government of Catalonia's Department of Universities, Research and the Information Society.

Declaration of Interest. *JS-S* is an unpaid member of the Scientific Advisory Board of the International Nut Council. *PL-U, MB, PC-A,* and *NB* have no relevant interests to declare.

REFERENCES

1. Kelly JH Jr, Sabaté J. Nuts and coronary heart disease: an epidemiological perspective. *Br J Nutr.* 2006;96(Suppl 2):S61–S67.
2. Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Jerling JC. A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *J Nutr.* 2005;135:2082–2089.
3. Kris-Etherton PM, Zhao G, Binkoski AE, Coval SM, Etherton TD. The effects of nuts on coronary heart disease risk. *Nutr Rev.* 2001;59:103–111.
4. Salas-Salvadó J, Casas-Agustench P, Murphy MM, López-Uriarte P, Bulló M. The effect of nuts on inflammation. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008;17(Suppl 1):S333–S336.
5. Haddad EH, Sabaté J, Whitten CG. Vegetarian food guide pyramid: a conceptual framework. *Am J Clin Nutr.* 1999;70(3 Suppl):S615–S619.
6. Johnson RK, Kennedy E. The 2000 dietary guidelines for Americans: what are the changes and why were they made? The dietary guidelines advisory committee. *J Am Diet Assoc.* 2000;100:769–774.
7. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, et al. AHA dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American Heart Association. *Circulation.* 2000;102:2284–2299.
8. Health Canada. *Canada's Food Guide to Healthy Eating.* Public Works and Government Services Canada. 2005; Available at: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/food-guide-aliment/index-eng.php>. Accessed 19 September 2008.
9. Salas-Salvadó J, Megías Rangil I, Arijá Val V, et al. Frutos secos. In: Española Sociedad de Nutrición Comunitaria, ed. *Guías alimentarias para la población española. Recomendaciones para una dieta saludable.* Madrid, Spain: IM&C, S.A.; 2001:87–94.
10. US Food and Drug Administration. *Qualified Health Claims: Letter of Enforcement Discretion – Nuts and Coronary Heart Disease.* US Food and Drug Administration, 2003; Docket No 02P-0505. Available at: <http://www.fda.gov/Food/>

- Labeling/Nutrition/LabelClaims/QualifiedHealthClaims/
ucm072926.htm. Accessed 31 July 2009.
11. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994;344:793–795.
 12. Weinbrenner T, Cladellas M, Isabel Covas M, et al. High oxidative stress in patients with stable coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2003;168:99–106.
 13. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*. 2005;4:5.
 14. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915–924.
 15. Reaven PD. Mechanisms of atherosclerosis: role of LDL oxidation. *Adv Exp Med Biol*. 1994;366:113–128.
 16. Steinberg D, Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997;95:1062–1071.
 17. Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, et al. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:529–533.
 18. Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest*. 1993;91:668–676.
 19. Mataix J, Ros E. Composición en ácidos grasos de los frutos secos: Implicaciones para la salud. In: Salas-Salvadó J, Ros E, Sabaté J, ed. *Frutos Secos, Salud y Culturas Mediterráneas*. Barcelona, Spain: Glosa; 2005:145–156.
 20. Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, et al. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med*. 2000;132:538–546.
 21. Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, et al. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56:629–637.
 22. Ros E, Nuñez I, Perez-Heras A, et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation*. 2004;109:1609–1614.
 23. Kris-Etherton PM, Hu FB, Ros E, Sabaté J. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *J Nutr*. 2008;138(Suppl):S1746–S1751.
 24. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC, et al. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *J Nutr*. 2002;132:461–471.
 25. Blomhoff R, Carlsen MH, Andersen LF, Jacobs DR Jr. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *Br J Nutr*. 2006;96(Suppl 2):S52–S60.
 26. Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, et al. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2006;84:95–135.
 27. Pellegrini N, Serafini M, Salvatore S, Del Rio D, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Mol Nutr Food Res*. 2006;50:1030–1038.
 28. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem*. 2004;52:4026–4037.
 29. Serafini M. Back to the origin of the “antioxidant hypothesis”: the lost role of the antioxidant network in disease prevention. *J Sci Food Agric*. 2006;86:1989–1991.
 30. Sang S, Lapsley K, Jeong WS, Lachance PA, Ho CT, Rosen RT. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem*. 2002;50:2459–2463.
 31. Lou H, Yuan H, Yamazaki Y, Sasaki T, Oka S. Alkaloids and flavonoids from peanut skins. *Planta Med*. 2001;67:345–349.
 32. Trevisan MT, Pfundstein B, Haubner R, et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food Chem Toxicol*. 2006;44:188–197.
 33. Chen CY, Blumberg JB. Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;17(Suppl 1):S329–S332.
 34. Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J Nutr*. 2001;131:2837–2842.
 35. Chen CY, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr*. 2005;135:1366–1373.
 36. Chen CY, Milbury PE, Chung SK, Blumberg J. Effect of almond skin polyphenolics and quercetin on human LDL and apolipoprotein B-100 oxidation and conformation. *J Nutr Biochem*. 2007;18:785–794.
 37. Gentile C, Tesoriere L, Butera D, et al. Antioxidant activity of sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. var. bronte) nut extract and its bioactive components. *J Agric Food Chem*. 2007;55:643–648.
 38. Wijeratne SS, Abou-Zaid MM, Shahidi F. Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J Agric Food Chem*. 2006;54:312–318.
 39. Shahidi F, Alasalvar C, Liyana-Pathirana CM. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *J Agric Food Chem*. 2007;55:1212–1220.
 40. Davis P, Valacchi G, Pagnin E, et al. Walnuts reduce aortic ET-1 mRNA levels in hamsters fed a high-fat, atherogenic diet. *J Nutr*. 2006;136:428–432.
 41. Iwamoto M, Kono M, Kawamoto D, Tomoyori H, Sato M, Imaizumi K. Differential effect of walnut oil and safflower oil on the serum cholesterol level and lesion area in the aortic root of apolipoprotein E-deficient mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66:141–146.
 42. Aksoy N, Aksoy M, Bagci C, et al. Pistachio intake increases high density lipoprotein levels and inhibits low-density lipoprotein oxidation in rats. *Tohoku J Exp Med*. 2007;212:43–48.
 43. Hatipoglu A, Kanbagli O, Balkan J, et al. Hazelnut oil administration reduces aortic cholesterol accumulation and lipid peroxides in the plasma, liver, and aorta of rabbits fed a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004;68:2050–2057.
 44. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition*. 2005;21:920–924.
 45. PubMed. *US National Library of Medicine*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Accessed 25 February 2009.
 46. Web of Science. *Thomson Reuters*. Available at: http://sauwok.fecyt.es/apps/WOS_GeneralSearch_input.do?highlighted_tab=WOS&product=WOS&last_prod=WOS&SID=Z1dEEDFcfkgkfa6g4D&search_mode=GeneralSearch. Accessed 26 February 2009.

47. Durak I, Koksak I, Kacmaz M, Buyukkocak S, Cimen BM, Ozturk HS. Hazelnut supplementation enhances plasma antioxidant potential and lowers plasma cholesterol levels. *Clin Chim Acta*. 1999;284:113–115.
48. Garg ML, Blake RJ, Wills RB, Clayton EH. Macadamia nut consumption modulates favourably risk factors for coronary artery disease in hypercholesterolemic subjects. *Lipids*. 2007;42:583–587.
49. Berry EM, Eisenberg S, Haratz D, et al. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins – the Jerusalem nutrition study: high MUFAs vs high PUFAs. *Am J Clin Nutr*. 1991;53:899–907.
50. Berry EM, Eisenberg S, Friedlander Y, et al. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins – the Jerusalem nutrition study. II. Monounsaturated fatty acids vs carbohydrates. *Am J Clin Nutr*. 1992;56:394–403.
51. Davis L, Stonehouse W, Loots du T, et al. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *Eur J Nutr*. 2007;46:155–164.
52. Li N, Jia X, Chen CY, et al. Almond consumption reduces oxidative DNA damage and lipid peroxidation in male smokers. *J Nutr*. 2007;137:2717–2722.
53. Hargrove RL, Etherton TD, Pearson TA, Harrison EH, Kris-Etherton PM. Low fat and high monounsaturated fat diets decrease human low density lipoprotein oxidative susceptibility in vitro. *J Nutr*. 2001;131:1758–1763.
54. Hyson DA, Schneeman BO, Davis PA. Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women. *J Nutr*. 2002;132:703–707.
55. Kocyigit A, Koylu AA, Keles H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16:202–209.
56. Cortés B, Nuñez I, Cofan M, et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1666–1671.
57. Jenkins DJ, Kendall CW, Josse AR, et al. Almonds decrease postprandial glycemia, insulinemia, and oxidative damage in healthy individuals. *J Nutr*. 2006;136:2987–2992.
58. Thomson CD, Chisholm A, McLachlan SK, Campbell JM. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr*. 2008;87:379–384.
59. Haddad E, Jambazian P, Karunia M, Tanzman J, Sabaté J. A pecan-enriched diet increases γ -tocopherol/cholesterol and decreases thiobarbituric acid reactive substances in plasma of adults. *Nutr Res*. 2006;26:397–402.
60. Berry SE, Tydeman EA, Lewis HB, et al. Manipulation of lipid bioaccessibility of almond seeds influences postprandial lipemia in healthy human subjects. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:922–929.
61. Jia X, Li N, Zhang W, et al. A pilot study on the effects of almond consumption on DNA damage and oxidative stress in smokers. *Nutr Cancer*. 2006;54:179–183.
62. Muñoz S, Merlos M, Zambón D, et al. Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells. *J Lipid Res*. 2001;42:2069–2076.
63. Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, et al. Dose-response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation*. 2002;106:1327–1332.
64. Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, et al. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *J Nutr*. 2008;138:908–913.
65. Tapsell LC, Gillen LJ, Patch CS, et al. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27:2777–2783.
66. Canales A, Benedi J, Nus M, Librelotto J, Sanchez-Montero JM, Sanchez-Muñiz FJ. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra CHD-risk factor. *J Am Coll Nutr*. 2007;26:225–232.
67. Nus M, Frances F, Librelotto J, et al. Arylesterase activity and antioxidant status depend on PON1-Q192R and PON1-L55M polymorphisms in subjects with increased risk of cardiovascular disease consuming walnut-enriched meat. *J Nutr*. 2007;137:1783–1788.
68. Kleinveld HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem*. 1992;38:2066–2072.
69. US Department of Agriculture. *Agricultural Research Service 2008*. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. Available at: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. Accessed 18 February 2009.
70. US Department of Agriculture. *Agricultural Research Service 2004*. USDA Database for the Proanthocyanidin Content of Selected Foods. Available at: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=5843>. Accessed 18 February 2009.
71. US Department of Agriculture. *Agricultural Research Service 2007*. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1. Available at: <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>. Accessed 18 February 2009.
72. Tokuşoglu O, Unal MK, Yemiş F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem*. 2005;53:5003–5009.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: www.nutritionjrn.com

Basic nutritional investigation

Effect of whole walnuts and walnut-skin extracts on oxidant status in mice

Mónica Bulló Ph.D.^{a,b,*}, M. Rosa Nogués Ph.D.^c, Patricia López-Uriarte B.Sc.^a,
Jordi Salas-Salvadó Ph.D.^{a,b,d}, Marta Romeu Ph.D.^c^a Human Nutrition Unit, Department of Biochemistry and Biotechnology, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, ISPV, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain^b CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Santiago de Compostela, Spain^c Unit of Pharmacology, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain^d Nutrition and Dietetics Unit, Internal Medicine Department, Hospital Universitari de Sant Joan, Reus, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2009

Accepted 2 September 2009

Keywords:

Nuts

Plasma antioxidant capacity

Oxidative markers

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of the intake of whole walnuts and walnut fractions on the oxidant status in mice.**Methods:** Thirty-six C57BL/6J male mice were randomized to be fed one of three diets: 1) a standard diet (control group), 2) a standard diet with 10% of whole walnuts (walnut-diet group), or 3) a standard diet with 2% of walnut skins (walnut-skin-diet group) for 8 wk. The plasma antioxidant capacity was measured by oxygen radical-absorbance capacity and plasma ferric-reducing antioxidant potential. Conjugated diene formation and reduced glutathione levels were also analyzed. **Results:** We observed no changes in plasma oxidation capability between the walnut and walnut-skin groups with the exception of conjugated dienes. Plasma total antioxidant capacity and the ratio between reduced and oxidized forms of glutathione were lower in the walnut and walnut-skin groups than in the control group.**Conclusion:** The decrease in the antioxidant burden observed in enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems after sustained consumption of a whole-walnut or a walnut-skin diet in mice may be related to the plasma oxidation capability being maintained in the groups consuming the walnut diets.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cardiovascular disease is the major cause of death in the developed world. Since Goldstein et al. [1] established the oxidative hypothesis for atherosclerosis, oxidative stress has been considered to be one of the major risk factors for atherosclerosis and cardiovascular disease. Therefore, improving the whole-body antioxidant capacity may help to prevent many chronic and age-related diseases, including cardiovascular disease.

Antioxidants are derived from intrinsic and extrinsic antioxidant systems and are constitutively present in human blood and tissue. Diet is a natural source of such extrinsic antioxidants as vitamins, flavonoids, carotenoids, or proteins and, in recent years, greater interest has been paid to the involvement of

nutritional compounds in the development or progression of oxidative diseases. Several epidemiologic studies have supported the dietary antioxidant hypothesis and demonstrated that high consumption of plant foods or nutritional factors derived from plants protect against cardiovascular disease because of the numerous phytochemical compounds they contain [2]. Recently, nuts have been included in this group of potentially healthy foodstuffs. In this respect, many observational studies in large cohorts have consistently shown a negative and dose-dependent association between nut intake and the risk of cardiovascular disease, which suggests that regular nut consumption reduces the risk of cardiovascular disease by 30–60% in several population groups, independently of other confounding lifestyle factors. The US Food and Drug Administration has supported these findings and claimed that walnuts have a role in reducing the risk of heart disease.

The healthy benefits of nuts, especially walnuts, are mainly attributed to their high content of ω -3 fatty acids and low saturated fatty acids, and their favorable effects on lipid profiles. Moreover, their high content of vitamin E, polyphenols, flavonoids, arginine, and fiber means that they can have

Patricia López-Uriarte is the recipient of a predoctoral fellowship from the Catalan government's Department of Universities, Research, and the Information Society.

* Corresponding author. Tel.: +34-977-75-93-12; fax: +34-977-75-93-22.

E-mail address: monica.bullo@urv.cat (M. Bulló).

0899-9007/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

doi:10.1016/j.nut.2009.09.002

Please cite this article in press as: Bulló Mónica, et al., Effect of whole walnuts and walnut-skin extracts on oxidant status in mice, Nutrition (2009), doi:10.1016/j.nut.2009.09.002

a considerable modulatory effect on the antioxidant system because they decrease the oxidative damage caused by lipids and lipoproteins and thus help prevent the evolution of atherosclerotic plaque. However, the unsaturated fatty acids in nuts are highly susceptible to oxidation. Thus, the effect of nut consumption on the balance between the pro-oxidant and antioxidant capacities in the body could be crucial to determining the real effect of nuts on cardiovascular health.

Because antioxidant bioavailability depends on the amount of food ingested and the food matrix, it should be taken into account when the antioxidant effects of nuts or nuts extracts are tested. For this reason, the aim of the present study was to evaluate the effect of the consumption of whole walnuts and walnut-skin fractions on oxidant status in mice.

Materials and methods

Animals and diets

Thirty-six C57BL/6J male mice 5 wk of age (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were housed and maintained in an environmentally controlled room (20–22°C, 12-h alternating light/dark cycle, and a relative humidity of 60%). Twelve mice were fed a standard diet (control group), another group of 12 was fed a standard diet with 10% of whole walnuts (walnut-diet group), and a third group of 12 was fed a standard diet with 2% of walnut skins (walnut-skin-diet group). A total of 10% of nuts in the diet is the caloric equivalent of the daily nutritional recommendations of nuts in humans (30 g/d). Nuts were mechanically crushed and added to the standard feed. Walnut skins were removed from the walnut by hot water blanching while the walnuts were being prepared and they are generally treated as a waste product. The percentage of 2% was calculated using the normal ratio between whole nuts and the cover fraction so that the amount of antioxidant consumption was the same. The diets were administered *ad libitum* for 8 wk (Panlab, Barcelona, Spain). Borges S.A. (Reus, Spain) donated the walnuts and walnut-skin extracts used in the study.

Food consumption was measured twice a week and animal weight once a week. Nutritional differences between diets are presented in Table 1.

At the end of this period, and after an overnight fast, the mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine-xylazine (100–10 mg/kg, respectively) dissolved in 0.9% saline. Blood was obtained by heart puncture and was collected in tubes containing ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) as an anticoagulant and antioxidant. Plasma was obtained and stored at –80°C until use.

All procedures applied in the study were approved by the ethics committee of animal research of the Rovira i Virgili University (Tarragona, Spain) and they were carried out according to the Spanish and the European Community Guides for animal care.

From the plasma samples, the following parameters were determined: 1) conjugated dienes, 2) reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, 3) plasma antioxidant capacity (ORAC), and 4) plasma ferric-reducing antioxidant potential (FRAP). Also, the antioxidant capacity of the solid sample preparations (walnuts, walnut skins, standard diet, walnut diet, and walnut-skin diet) was determined.

Conjugated dienes

PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) were used to remove EDTA from the plasma. Cu^{+2} was used to oxidize plasma lipids and conjugated diene formation was measured at 234 nm, at 37°C for 5 h, as described by Spranger et al. [3]. A total of 50 μL of plasma was eluted through the column with

phosphate buffered saline up to a final dilution of 1:75. The oxidation was then started in a spectrophotometric cuvette with 1.5 mL of the eluted sample, 1.47 mL of phosphate buffered saline, and 30 μL of 5 mM CuCl_2 solution. From the kinetic profile of each sample measured, several indexes describing the plasma oxidation capability were determined. The lag phase, defined as the interval (minutes) between the intercept of the linear least-square slope of the curve and the initial-absorbance axis, was measured. The maximal rate of oxidation was calculated from the slope of the absorbance curve during the propagation phase (expressed as nanomoles per minute per milliliter of plasma) using the molar absorptivity for conjugated dienes ($E_{240} = 29500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). The same absorptivity value was used to determine the maximal amount of dienes formed. Conjugated dienes were measured as a marker of the amount of lipid peroxidation products.

GSH and GSSG

The GSH and GSSG were determined by Hissin and Hilf's [4] fluorimetric method using a Perkin Elmer LS 50B (Waltham, MA, USA) spectrofluorometer at an excitation of 350 nm and emission wavelengths of 420 nm. For GSH assay plasma samples were preserved in acid and frozen at –80°C. The samples were diluted 1:10 in phosphate-EDTA buffer, pH 8.0. The final assay mixture contained 100 μL of the diluted plasma, 1.8 mL of phosphate-EDTA buffer, and 100 μL of *o*-phthalaldehyde solution (Sigma Chemicals Co.). After thorough mixing and incubation at room temperature for 15 min, the solution was transferred to a cuvette. The GSSG assay was performed in 50 μL of plasma samples incubated with 20 μL of 0.04 M *N*-ethylmaleimide (Merck) for 25 min at room temperature. To this mixture, 430 μL of 0.1 N NaOH was added to obtain a pH of 12.0. A total of 100 μL of this mixture was taken to measure GSSG, using the procedure outlined above for the GSH assay, except that 0.1 N NaOH was used as diluent instead of phosphate-EDTA buffer (*o*-phthalaldehyde reacted with GSSG, yielding readily measurable fluorescent intensity at pH 12.0). The GSSG/GSH couple in plasma can respond to cellular and extracellular oxidative processes.

Plasma antioxidant capacity (ORAC assay)

Plasma samples were diluted 500-fold in 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) before analysis. The reaction mode used 20 μL of the sample and 370 μL of fluorescein 48 nM in a multiwell plate. The reagents were mixed and incubated for 10 s before the initial fluorescence was recorded. Peroxyl radicals were generated by 10 μL of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride reagent. Fluorescence readings were taken every minute for 120 min at 485-nm (λ excitation) and 538-nm (λ emission) wavelengths on a Fluoroskan Ascent fluorescence plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as standard. The final ORAC values were calculated by using a regression equation between the Trolox concentration and the net area under the fluorescein decay curve and were expressed as Trolox equivalents per liter of plasma (millimoles of Trolox equivalents per liter of plasma) [5,6].

Solid sample antioxidant capacity (ORAC Assay)

Total antioxidant capacity was measured in solid sample preparations (walnuts, walnut skins, control feed, walnut feed, and walnut-skin feed) as has been described previously [7]. For the lipophilic ORAC assay, 1 g of each triturated sample was extracted with hexane/dichloromethane (1/1). Extracts were dried under nitrogen flow in a 30°C water bath and residues were reconstituted in 1 mL of acetone. For the hydrophilic ORAC assay, samples were extracted with acetone/water/acetic acid (70/29.5/0.5). For lipophilic and hydrophilic ORACs, a 100-fold dilution was performed before the analysis. ORACs were expressed as Trolox equivalents per gram of sample (micromoles of Trolox equivalents per gram of sample).

Plasma FRAP assay

The FRAP assay was performed as described by Benzie and Strain [8]. Plasma antioxidants were evaluated as reductants of Fe^{3+} to Fe^{2+} , which is chelated by 2,4,6-tripyridyl-s-triazine to form a Fe^{2+} -2,4,6-tripyridyl-s-triazine complex absorbing at 593 nm. Absorbance was monitored by a UV-VIS spectrophotometer (Lambda 25, Perkin Elmer, Beaconsfield, UK), equipped with an eight-cell holder and a thermostatically controlled bath. In short, 1 mL of working pre-warmed 37°C FRAP reagent (10 vol of 300 mM acetate buffer, pH 3.6, + 1 vol of 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine in 40 mM HCl + 1 vol of 20 mM FeCl_3 + 1.2 vol of distilled H_2O) was mixed with 30 μL of test sample and standards. All measurements were made in duplicate after 4 min of reaction. Results were compared with a standard curve prepared with different concentrations of ferrous sulfate, and FRAP values were expressed as millimoles of Fe^{2+} per liter of plasma.

Table 1

Composition of experimental diets

	Control	Walnut	Walnut skins
Total energy (kcal/kg)	2900	3323	3264
Carbohydrates (%)	60	49.5	50.6
Fat (%)	3.1	9.6	6.8
Saturated (%)	12.9	13.5	15.6
Monounsaturated (%)	22.58	17.5	18.1
Polyunsaturated (%)	40.29	69.4	66.3
Protein (%)	16.1	15.8	15.7
Fiber (%)	15.1	15.1	16.3
Ash (%)	5.1	4.3	4.3
Others (%)	2	5.7	6.3

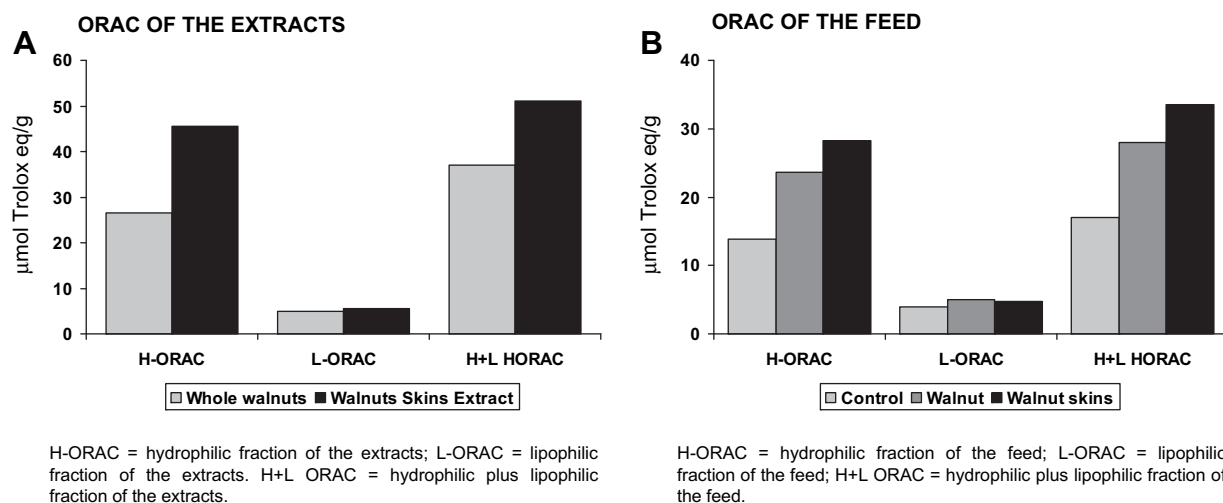


Fig. 1. (A) Values of the total antioxidant capacity of whole walnuts and walnut-skin extract measured by the ORAC assay. (B) Values of the total antioxidant capacity of the three diets measured by the ORAC assay. H-ORAC, hydrophilic fraction of extracts; L-ORAC, lipophilic fraction of extracts; H+L ORAC, hydrophilic plus lipophilic fractions of extracts.

Statistical analysis

The variable normal distribution was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. Analysis of variance was used to compare mean groups. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean. The level of statistical significance for all tests was $P < 0.05$. Statistical analyses were performed with SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Figure 1A shows the ORAC values of the walnut-skin extracts and the whole walnuts used to enrich the mice's diets. Walnut-skin extracts showed greater antioxidant capacity than whole-walnut extracts in their hydrophilic fraction, which indicates the presence of numerous potential antioxidant compounds in walnut skin. The ORAC values observed in the walnut and walnut-skin diets used in this study were higher than in the control diet, largely because of the hydrophilic fraction (Fig. 1B). No significant differences were observed in mouse growth and in the amount of food consumption among the three groups during the study (Table 2).

Figure 2 shows the results of the different plasma oxidation markers in the three groups of mice at the end of the interventions. The plasma antioxidant capacity in the groups fed with walnut-skin diets was significantly lower than in the control group. Mice fed with the walnut-skin diet showed significantly lower ORAC and FRAP values than the mice in the control group. In the mice on the walnut diet, only the plasma FRAP values significantly differed from the control group.

Plasma GSH concentrations were lower in the groups that received walnut or walnut-skin diets in comparison with the control group, although these differences were only statistically significant in the case of the mice fed with the walnut-skin diet ($P = 0.020$). No differences were observed in plasma concentrations of GSSG between groups. Therefore, the GSSG/GSH ratio was significantly higher in the walnut-skin group.

The diene oxidation rate and diene lag phase were not significantly different among groups. However, the mice fed with the walnut diet showed a plasma concentration of conjugated dienes that was significantly higher than that of the mice in the control and walnut-skin groups ($P < 0.03$).

Discussion

This is the first chronic study to evaluate the effect of whole-walnut and walnut-skin consumption on oxidative stress markers and the plasma antioxidant capacity in mice. The aim was to investigate whether the oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from nuts could be compensated for or not by the antioxidant properties attributed to their antioxidant compounds. Our results show that the antioxidant capacity at the plasma level was decreased in the mice on the walnut and walnut-skin diets in comparison with the control group. Despite this, the plasma oxidizing capability seemed to be preserved.

The putative health benefits of walnuts have been mainly attributed to their antioxidant capacity, which is associated with their content of flavonoids—mainly distributed in the skin—and fiber. However, most of the supportive evidence is based on in vitro experiments or in vivo feeding studies that measured the effect of a single potential antioxidant compound. Because the susceptibility of fatty acids to oxidation is thought to be directly dependent on their degree of unsaturation [9] and nuts are rich in monounsaturated fatty acids and PUFAs [10], nuts could per se be prone to easy oxidation independently of their content of antioxidant compounds. Therefore, the debate about whether whole nuts can or cannot improve oxidative status in vivo is still ongoing.

Only two studies have evaluated the acute effect of nut consumption on oxidative status in animals. In relation to control groups, an increase was observed in the postprandial plasma antioxidant capacity in walnut-fed rats [11] and the lag time of

Table 2
Characteristic of body weight and food consumption during the study*

	Control	Walnut	Walnut skins	P^{\dagger}
Body weight (g)				
Basal	22.18 \pm 0.51	21.68 \pm 0.26	21.39 \pm 0.41	0.419
After 8 wk	29.24 \pm 0.82	28.04 \pm 0.48	28.72 \pm 0.59	0.432
Differences	7.05 \pm 0.52	6.36 \pm 0.50	7.33 \pm 0.86	0.561
Food intake/mouse (g)				
Basal	2.84	4.02	4.04	
After 8 wk	4.08	6.21	3.55	

* Mean \pm SE.

\dagger Analysis of variance.

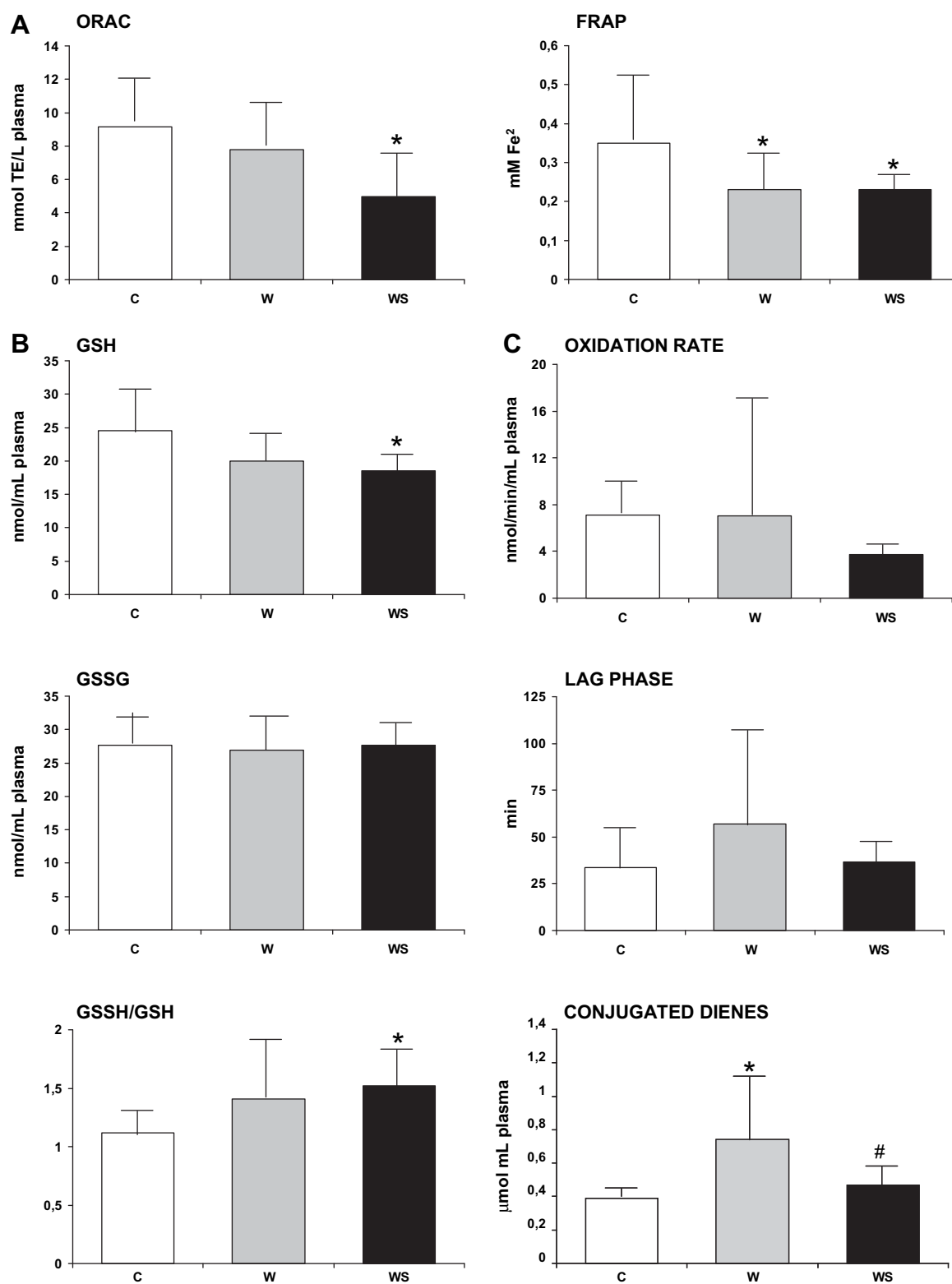


Fig. 2. Values of plasma oxidation markers in the three groups of mice at the end of the interventions. (A) Plasma antioxidant capacity measured by ORAC and FRAP. (B) Enzymatic antioxidant capacity related to glutathione. (C) Plasma conjugated diene formation. Results are expressed as mean \pm SE. * $P < 0.05$ versus control group, # $P < 0.03$ versus walnut diet group. The white bar represents the control group ($n = 12$), the gray bar the walnut-diet group ($n = 12$), and the black bar the walnut-skin diet group ($n = 12$). C, control diet; FRAP, ferric-reducing antioxidant potential; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; ORAC, plasma antioxidant capacity; TE, Trolox equivalent; W, walnut diet; WS, walnut-skin diet.

low-density lipoprotein (LDL) oxidation 180 min after administering 40 μ M of gallic acid equivalents from almonds by stomach gavage in hamsters [12].

In contrast, long-term clinical trials in humans evaluating the effect of nut consumption on oxidative status have produced controversial results. Although some studies have reported a significant decrease in such oxidative markers as plasma malondialdehyde and isoprostanes after nut consumption [13,14], others have failed to find any positive effect on conjugated diene synthesis in LDL or even in the antioxidant enzymatic activity [15–17].

Although the walnut and walnut-skin diets have shown a higher antioxidant capacity *in vitro*, in the present study we found that the total plasma antioxidant capacity, measured by ORAC and FRAP, was significantly lower in the animals that were chronically fed with a walnut diet or a walnut-skin diet in comparison with the control group. Although walnuts are very rich in antioxidant compounds, the total amount of fat to be oxidized is greater. Walnuts are also richer in ω -6 PUFAs than in monounsaturated fatty acids, which are present in larger amounts in other nuts. The ω -6 PUFAs are more easily oxidized than monounsaturated fatty acids [18–21] and ω -3 PUFAs [10,22]. These differences in oxidizing capacity between types of fats could partly explain our results in those mice fed with a walnut diet.

We also observed that, in comparison with the control group, the formation of total plasma-conjugated dienes was significantly higher, whereas no changes in the lag phase were observed between groups. Moreover, although the mice on the walnut-skin diet had higher levels of conjugated dienes than the control group, they had significantly lower levels than the mice on the walnut diet. Once again, those animals consuming larger amounts of ω -6 PUFAs derived from walnuts showed a higher synthesis of oxidized products. Similar negative results on conjugated diene formation in LDL were observed in four clinical trials performed in humans to evaluate the chronic effect of walnut consumption, although only one of them reported a significant increase in the maximal rate of oxidation of the treated group in comparison with the control group [15,16,23,24]. Lower concentrations of GSH and higher GSSG/GSH ratios were also observed in both walnut-diet groups in our study. The differences were significant in the mice fed with the walnut-skin diet. These results suggest that the antioxidant enzymatic capacity is also modulated after the chronic consumption of walnuts.

Because the total antioxidant capacity of blood was worse in mice on a walnut-skin diet than in mice on a walnut diet, it could be hypothesized that long-term treatments with larger amounts of phenolic compounds have a pro-oxidant capacity. Our results are in agreement with previous studies that evaluated the effect of phenolic compounds in rabbits [25], golden Syrian hamsters [26], and apolipoprotein E-deficient mice [27], which reported that larger amounts of potentially antioxidant compounds could have a harmful effect on oxidative status and the progression of atherosclerosis. The lack of protection provided by the antioxidant compounds consumed in walnuts may also be partly attributed to the fact that these compounds are less bioavailable when they are consumed as the whole nut than as alternative forms. Although the bioavailability of selected single flavonoid compounds has been widely reported [28,29], little information is available about the concurrent absorption of antioxidant compounds from whole nuts.

The results of our study suggest that the consumption of walnuts and walnut skins has no deleterious effect on LDL

oxidizing capability, despite their higher content of ω -6 PUFAs and the depletion of the antioxidant burden in enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in mice.

Conclusion

The decrease in the antioxidant burden observed in enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems after the sustained consumption of a whole-walnut or a walnut-skin diet in mice could be related to the plasma oxidizing capability being maintained in the groups consuming the walnut diets.

Acknowledgments

The authors thank M. Covas for her critical revision of the manuscript. Borges S.A. (Reus, Spain) donated the walnuts and walnut-skin extracts used in the study.

References

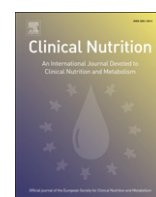
- [1] Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:333–7.
- [2] Willcox BJ, Curb JD, Rodriguez BL. Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies. *Am J Cardiol* 2008;101(suppl 10A):75D–86.
- [3] Spranger T, Finckh B, Fingerhut R, Kohlschütter A, Beisiegel U, Kontush A. How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem Phys Lipids* 1998;91:39–52.
- [4] Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976;74:214–26.
- [5] Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;14:303–11.
- [6] Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;49:4619–26.
- [7] Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Beecher G, Prior RL. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *J Food Comp Anal* 2004;17:407–22.
- [8] Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Ann Biochem* 1996;239:70–6.
- [9] Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P, Visioli F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol Res* 2008;57:451–5.
- [10] Ros E, Mataix J. Fatty acid composition of nuts—implications for cardiovascular health. *Br J Nutr* 2006;96(suppl 2):S29–35.
- [11] Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. *Nutrition* 2005;21:920–4.
- [12] Chen CY, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB. Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J Nutr* 2005;135:1366–73.
- [13] Jia X, Li N, Zhang W, Zhang X, Lapsley K, Huang G, et al. A pilot study on the effects of almond consumption on DNA damage and oxidative stress in smokers. *Nutr Cancer* 2006;54:179–83.
- [14] Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Josse AR, Nguyen TH, Faulkner DA, et al. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *J Nutr* 2008;138:908–13.
- [15] Muñoz S, Merlos M, Zambón D, Rodríguez C, Sabaté J, Ros E, Laguna JC. Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells. *J Lipid Res* 2001;42:2069–76.
- [16] Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, Hirooka Y, Sakai K, Takeshita A, Kono M. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:629–37.
- [17] Davis L, Stonehouse W, Loots du T, Mukuddem-Petersen J, van der Westhuizen FH, Hanekom SM, Jerling JC. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *Eur J Nutr* 2007;46:155–64.
- [18] Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Almazan F, Mattson FH, et al. Feasibility of using an oleate-rich diet to reduce the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification in humans. *Am J Clin Nutr* 1991;54:701–6.
- [19] Bonanome A, Pagnan A, Biffanti S, Opportuno A, Sorgato F, Dorella M, et al. Effect of dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on the

- susceptibility of plasma low density lipoproteins to oxidative modification. *Arterioscler Thromb* 1992;12:529–33.
- [20] Mata P, Alonso R, Lopez-Farre A, Ordovas JM, Lahoz C, Garces C, et al. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1347–55.
- [21] Hargrove RL, Etherton TD, Pearson TA, Harrison EH, Kris-Etherton PM. Low fat and high monounsaturated fat diets decrease human low density lipoprotein oxidative susceptibility in vitro. *J Nutr* 2001;131:1758–63.
- [22] Parthasarathy S, Khoo JC, Miller E, Barnett J, Witztum JL, Steinberg D. Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1990;87:3894–8.
- [23] Zambón D, Sabaté J, Muñoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, et al. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med* 2000;132:538–46.
- [24] Ros E, Núñez I, Pérez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* 2004;109:1609–14.
- [25] Wilson T, Knight TJ, Beitz DC, Lewis DS, Engen RL. Resveratrol promotes atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Life Sci* 1996;59:PL15–21.
- [26] Auger C, Gérain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, et al. Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *J Agric Food Chem* 2004;52:297–302.
- [27] Acín S, Navarro MA, Arbonés-Mainar JM, Guillén N, Sarría AJ, Carnicer R, et al. Hydroxytyrosol administration enhances atherosclerotic lesion development in apo E deficient mice. *J Biochem* 2006;140:383–91.
- [28] Shimoi K, Yoshizumi K, Kido T, Usui Y, Yumoto T. Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and alphaC-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. *J Agric Food Chem* 2003;51:2785–9.
- [29] Lesser S, Cermak R, Wolffram S. Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J Nutr* 2004;134:1508–11.



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/clnu>

Original Article

Effect of nut consumption on oxidative stress and the endothelial function in metabolic syndrome[☆]Patricia López-Uriarte^a, Rosa Nogués^b, Guillermo Saez^c, Mònica Bulló^{a,d}, Marta Romeu^b, Lluís Masana^e, Carmen Tormos^c, Patricia Casas-Agustench^a, Jordi Salas-Salvadó^{a,d,*}^aHuman Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Rovira i Virgili University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain^bPharmacology Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, Rovira i Virgili University, Reus, Spain^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology of the Medical School of Valencia, University of Valencia, Valencia, Spain^dCIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (06/03), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^eUnit of Lipids and Atherosclerosis, Faculty of Medicine and Health Sciences, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Rovira i Virgili University, Reus, Spain and CIBERDEM Diabetes and Associated Metabolic Diseases, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2009

Accepted 16 December 2009

Keywords:

Nuts

Antioxidant capacity

Lipid oxidation

DNA damage

Endothelial function

Metabolic syndrome

SUMMARY

Background & aims: Oxidative stress has a key role in atherosclerosis, cancer and other chronic diseases. Some bioactive compounds in nuts have been implicated in antioxidant activities.**Objective:** We assessed how nut consumption affected several markers of oxidation and endothelial function (EF) in metabolic syndrome (MetS) patients.**Patients and methods:** A randomized, controlled, parallel feeding trial was conducted on 50 MetS adults who were recommended a healthy diet supplemented or not with 30 g of mixed nuts (Nut and Control groups, respectively) every day for 12 weeks. The plasma antioxidant capacity (AC), oxidized LDL (oxLDL), conjugated diene (CD) formation, urine 8-isoprostanes, DNA damage assessed by yield of urine 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), and EF assessed by peripheral artery tonometry (PAT) and biochemical markers, were measured at baseline and the end of the intervention.**Results:** No significant differences in changes between groups were observed in AC, oxLDL, CD, 8-isoprostanes or EF during the intervention, whereas the reduction in DNA damage was significant in the Nut group compared to Control group ($P < 0.001$).**Conclusion:** Nut consumption has no deleterious effect on lipid oxidation. The decrease in DNA damage observed in this study could contribute to explain the beneficial effects of regular nut consumption on some MetS features and several chronic diseases.

© 2009 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

Non-standard abbreviations: AC, antioxidant capacity; ATP III, Adult Treatment Panel; BMI, body mass index; CD, conjugated dienes; C_{max}, maximal amount of conjugated dienes production; CHD, coronary heart disease; EF, endothelial function; ENDOPAT index, Hyperaemic response; ICAM-1, inter-cellular adhesion molecule 1; MetS, metabolic syndrome; MUFA, monounsaturated fatty acid; ORAC, oxygen radical absorbance capacity; oxLDL, oxidized LDL; PAT, peripheral arterial tonometry; PUFA, polyunsaturated fatty acid; TC, total cholesterol; TG, triglycerides; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; 8-oxo-dG, 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.

[☆] Registered under www.controlled-trials.com Identifier no. ISRCTN36468613.

* Corresponding author at: Human Nutrition Unit, Faculty of Medicine and Health Sciences, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, IISPV, Rovira i Virgili University, Sant Llorenç 21, 43201 Reus, Tarragona, Spain. Tel.: +34 977 75 93 12; fax: +34 977 75 93 22.

E-mail address: jordi.salas@urv.cat (J. Salas-Salvadó).

1. Introduction

Epidemiological studies have consistently demonstrated that frequent nut consumption is associated with reduced risk of developing coronary heart disease (CHD), type 2 diabetes, or death by overall mortality causes.¹ It has been claimed that the favourable effects of nuts on the plasma lipoprotein profile is the main mechanism that explains the marked reduced risk of CHD observed in cohort studies.² However, it has been suggested that other mechanisms of action, such as decreasing inflammation or improving EF, are important for explaining the beneficial effect of nuts on cardiovascular health.

Because of their increasingly recognized healthy benefits, nuts are currently included in several dietary guidelines worldwide and have been proposed as a component of optimal diets for CHD prevention.^{3,4}

However, nuts are fatty foods and presumably for this reason, until recently, were ignored or treated with a great deal of caution on most dietary recommendations. One of the possible deleterious effects of chronic nut consumption may be because nuts, especially walnuts, very rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA).⁵ Of the various fatty acids, PUFA are the most susceptible to oxidation.⁶ In fact, a diet enriched with linoleic acid increases LDL oxidation in both human⁷ and animal experiments.⁸ This is important because current evidence indicates that oxidative damage plays a key role in atherosclerosis, cancer and other chronic diseases.⁹

However, emerging evidence indicates that some bioactive compounds in nuts probably counteract the pro-oxidant effect of PUFA on LDL^{10–12} and have elicited some cardioprotective effects.⁶ Several phytochemicals that have been shown to be common in nuts—e.g. polyphenols and phytoosterols—have a variety of bioactions that have been implicated in antioxidant activities. These phytochemicals may work in synergy with other important nut constituents such as antioxidant vitamins (α -tocopherol, γ -tocopherol) and minerals that decrease the oxidative damage to lipids, proteins, and lipoproteins and slow down the progression of the atherosclerosis plaque.¹³

However, the effect of nut consumption on oxidation has not been well studied. In fact, the effect of nut consumption on oxidative stress has been analyzed in only a few clinical trials, and only in eight was the main outcome related to oxidation. These studies have been conducted in different populations, using different types of nuts, and oxidative damage has been explored using different techniques and approaches, which explains the contradictory results obtained.¹⁴ The effect of nut consumption on EF has also been poorly studied and the results are contradictory.^{12,15}

Therefore, the aim of our study is to evaluate the effect of nut consumption on several steps of the cascade oxidation and endothelial dysfunction in a non diabetic MetS population. The lipid profile, the insulin resistance and the inflammatory responses from this feeding trial have been previously described.¹⁶

2. Material and methods

2.1. Subjects

Sixty-one male and female volunteers, aged between 18 and 65 y old with MetS from three Primary Care Centres (Alcover, Riudoms and Reus) of our zone and the University Hospital Sant Joan, Reus (Spain) were screened. To be enrolled the subjects had to have at least three of the following MetS components as defined by the updated Adult Treatment Panel (ATP III) criteria: (a) waist circumference ≥ 102 cm for men and ≥ 88 cm for women, (b) triglycerides (TG) ≥ 1.7 mmol/L or drug treatment for elevated TG, (c) HDL-cholesterol concentrations < 0.9 mmol/L in men and < 1.1 mmol/L in women or drug treatment for reduced HDL-cholesterol, (d) elevated systolic blood pressure ≥ 130 mmHg or elevated diastolic blood pressure ≥ 85 mmHg or treatment with antihypertensive drugs, and (e) fasting glucose ≥ 100 mg/dL or drug treatment for elevated glucose. Subjects were excluded if they had nut allergy, established type 2 diabetes mellitus with or without oral or insulin treatment, acute or chronic infection, inflammatory disease or cancer; leukocytosis at the beginning of the study (> 10.000 cells $\times 10^6$). Other reasons for exclusion were anti-inflammatory, corticosteroid hormonal or antibiotic drug treatment; alcoholism or active drug dependence; restrictive diet during the 3 mo prior to the study; body mass index (BMI) > 35 kg/m², or a recent weight change of > 5 kg in the previous three months.

The University Hospital Sant Joan of Reus Ethics Committee approved the protocol and all participants provided written

informed consent. All procedures were in compliance with the Helsinki Declaration principles.

2.2. Study design

A randomized, controlled, parallel, interventional feeding trial was designed for 12 wk. At the pre-inclusion visit, a medical clinical history was taken, a physical examination performed and biochemical analyses made to verify health status and compliance with the inclusion criteria. Subjects were stratified by sex and age (< 50 y or ≥ 50 y) and were randomly assigned to the Control group (qualitative recommendations according to the American Heart Association dietary guidelines) or the Nut group (the same dietary recommendations enriched with a daily supplement of 30 g of mixed raw nuts with skin [15, 7.5 and 7.5 g/d of walnuts, almonds and hazelnuts, respectively]), which were provided free. At wk 0, 4, 8 and 12 a dietician assessed all the subjects and provided dietetic support so that participants could comply with dietetic recommendations. They were also asked not to change their habitual physical activity or smoking level during the study period. Every 4 wk, both groups of patients filled in a 3-day food record to assess their compliance with the dietetic recommendations. In addition, the returned empty bags of nut and α -linolenic plasma concentrations were determined as markers of adherence for the nut group. Fasting blood samples were obtained and the endothelial function was evaluated at baseline and the end of the study.

The dietary recommendations given to the participants in both the Control and the Nut group were that they should eat a diet rich in vegetables and fruits; select whole-grain, high fiber foods; eat fish at least twice a week; limit saturated or trans food and cholesterol; select fat-free and low-fat dairy products; cut down on foods containing partially hydrogenated vegetable oils; cut down on soft drinks and foods with added sugar; choose and prepare foods with little or no salt; and limit alcohol intake.

2.3. Blood pressure, anthropometric measurements and body composition

Systolic and diastolic blood pressures were measured using a blood pressure monitor electronic device (Omron model 705IT). Body wt was measured using a Tanita TBF-300 weight scale electronic device (Tanita®, Tokyo, Japan) while the subjects were minimally clothed and not wearing shoes. Measurements were performed in standard conditions. Height was measured with a wall-mounted stadiometer in a standing position, without shoes or hair ornaments, and recorded to the nearest 0.1 cm. Waist circumference was measured midway between the lower rib margin and the iliac crest with the subject standing and wearing only underwear, at the end of gentle expiration. BMI was calculated.

2.4. Diet and physical activity

Total energy and macronutrient content were calculated using Spanish food composition tables. To evaluate the level of physical activity throughout the study the Minnesota Leisure Time Physical Activity questionnaire validated for Spanish population¹⁷ was applied.

2.5. Blood collection and biochemical measurements

At baseline and the end of the intervention, 12-h fast serum and plasma samples were collected into EDTA vacutainer tubes and separated by centrifugation at 2500 rpm for 10 min at 4 °C. Then samples were aliquoted into cryovials and stored at -80 °C until they were analyzed. Serum concentrations of TG, total cholesterol

(TC), and HDL-cholesterol were measured using standardized clinical laboratory techniques. LDL-cholesterol was calculated using the Friedewald equation ($\text{LDL-cholesterol (mmol/L)} = \text{TC-TG}/2.2\text{-HDL-cholesterol}$).

2.5.1. Plasma antioxidant capacity

Plasma samples were diluted 500-fold in 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) before analysis. The reaction mode used 20 μL of the sample and 370 μL of fluorescein, 48 nM in a multiwell plate. The reagents were mixed and incubated for 10 s before the initial fluorescence was recorded. Peroxyl radicals were generated by 10 μL of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) reagent. Fluorescence was taken every minute for 120 min at 485 nm (λ_{ex}) and 538 nm (λ_{em}) wavelength on a Fluoroskan Ascent fluorescence plate reader (Labsystems, Helsinki, Finland). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as standard. The final oxygen radical absorbance capacity (ORAC) values were calculated by using a regression equation between the Trolox concentration and the net area under the fluorescein decay curve and were expressed as Trolox Equivalents per litre of plasma (mmol TE/L plasma).^{18,19}

2.5.2. Plasma LDL oxidation

oxLDL was determined by a monoclonal antibody-based immunoassay commercially available ELISA kits (Mercodia, Uppsala, Sweden). The mean intra- and interassay coefficients of variation were 6.33 and 4.73% respectively.

2.5.3. Plasma conjugated diene formation

PD-10 desalting columns (GE Healthcare, Upsala, Sweden) were used to remove EDTA from the plasma. Cu^{+2} was used to oxidize plasma lipids and the CD formation was measured at 234 nm, at 37 °C for 5 h as described.²⁰ A total of 50 μL of plasma was eluted through the column with phosphate-buffered saline (PBS) until a final dilution of 1:75. The oxidation was then started in a spectrophotometrical cuvette with 1.5 mL of the eluted sample, 1.47 mL of PBS and 30 μL of 5 mM CuCl_2 solution. From the kinetics profile of each measured sample, several indexes have been determined describing the plasma oxidizability as described.²¹ Lag phase, defined as the interval (min) between the intercept of the linear least-square slope of the curve with the initial-absorbance axis, was measured. The maximal rate of oxidation (V_{max}) was calculated from the slope of the absorbance curve during the propagation phase (expressed as nmol/min/mL of plasma) using the molar absorptivity for CD ($E_{240} = 29,500 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The same absorptivity value was used to determine the maximal amount of CD produced (C_{max}).

2.5.4. Endothelial adhesion molecules

Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) were measured using the standard ELISA kit from Diaclone (Besançon, France). The mean intra- and interassay coefficients of variation were 2.82, 8.15% and 2.27, 5.94% respectively.

2.6. Urinary 8-oxo-dG assay

24 h urine sample was collected at home by patients in polyethylene bottles. The volume of the sample was measured and, after agitation, aliquots ($2 \times 10 \text{ mL}$) of the homogenized urine were kept at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until further analysis.

The method for detecting 8-oxo-dG was based on that of Brown RK et al.,²² To 1 mL of urine, 100 μL of 3 mol/L Tris-EDTA solution pH 8.6 was added and vortex-mixed for 30 s. The solution was then applied to a Bond Elute C18(OH)SPE (3 mL) column that had been prepared with 3 mL methanol and 3 mL water. The column was

washed with 3 mL water followed by 3 mL 2.5% acetonitrile and 1.5% methanol in 10 mmol/L borate pH 7.9. The sample was eluted with 3 mL of the same buffer and applied to a Bond Elute strong cation exchange column (3 mL) prepared with 3 mL methanol and 3 mL borate buffer pH 7.9. The 8-oxo-dG was eluted with 2 mL of acetonitrile/methanol buffer in borate and then adjusted to pH 6.0 with 1 mol/L HCl. 4 mL of 50:50 dichloromethane: propane-2-ol was added to the 2 mL of eluent and vortex-mixed for 30 s. The sample was then centrifuged for 10 min at 3500 rpm, the upper aqueous layer aspirated off and 3 mL of organic layer evaporated to dryness under nitrogen at 50 °C. Finally, the sample was reconstituted in 1 mL HPLC running buffer without acetonitrile and 50 μL injected into an HPLC column. To separate 8-oxo-dG, a Waters 515 HPLC pump model was used. This separation was carried out using a 5 μm Spherisorb ODS2 column (4.6 mm \times 250 mm) with a flow rate of 1 mL/min. The buffer used was 50 mmol/L potassium phosphate pH 5.1 in 5% of acetonitrile, and the retention time was 7.5 min. To assess the optimization and accuracy of the HPLC-EC assay in isolating and detecting 8-oxo-dG, appropriate chromatograms of both samples and standards were recorded at the beginning of each working day.²³ The 8-oxo-dG values were expressed as the ratio to creatinine urine concentration given in mmol/mL.

2.7. Urine 8-isoprostane assay

24 h urine samples were frozen at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. The 8-isoprostane was extracted from the urine samples before the assay using an immunoaffinity column (cat number 416358; Cayman Chemical Corp). Aliquots of 0.5 mL urine were directly applied to the columns and the columns were washed with 2 mL of 0.1 mol/L PBS followed by 2 washes with 2 mL of water. The levels of urine 8-isoprostanes were determined with a commercial EIA kit from Cayman Chemical (N° 516351). Readings were made at 405 nm in a Multiskan EX, Thermo Labsystems. The results were expressed as ng of 8-iso-prostanates/mmol creatinine.

2.8. In vivo endothelial function measurement

To assess the EF, a finger plethysmograph based on non-invasive PAT technology was used (EndoPAT 2000, Itamar-Medical Ltd, Caesarea, Israel). A thimble-shaped pneumatic probe was placed on the index finger of the hand undergoing hyperaemia testing and a second PAT probe was placed on the contralateral index finger. The probe components were connected to isolated volume reservoirs, which buffer pressure changes and provide a uniform pressure field. The pressure changes accompanying peripheral volume changes are fed to a personal computer, where the signal is band pass-filtered (0.3–30 Hz), amplified, displayed, and stored.²⁴ The PAT hyperaemic response (ENDOPAT index) was automatically calculated at the conclusion of the study as the ratio of the average baseline pulse wave amplitude during reactive hyperaemia to the preocclusion baseline. PAT measurements were analyzed with a computerised, automated algorithm (EndoPAT 2000, Itamar-Medical Ltd, Caesarea, Israel), so this calculated ratio automatically provides an index of EF. Therefore, there is no intraobserver or interobserver variability.

2.9. Statistical analysis

We used the Kolmogorov–Smirnov statistical test to check the normal distribution of variables. For the statistical comparison and depending on the normality data for each parameter measured before and after the 12-wk intervention period, results were expressed as the mean (standard deviation or 95% CI) or median [p25–p75]. Means were analyzed using the unpaired Student's *t*-test. The differences between basal and final values were tested

within groups by a paired *t*-test or the Wilcoxon test as appropriate. The differences between the changes in the values of the two diet groups were tested by an unpaired Student's *t*-test or the Mann–Whitney *U*-test as appropriate. The differences in changes between groups were also tested in the case of the DNA damage measurements by ANCOVA using a general linear model, with body weight changes as a covariate. Differences were considered statistically significant at $P \leq 0.05$. All statistical analyses were carried out with the Statistical Package for the Social Sciences, SPSS software for Windows version 15.0 SPSS, Inc.,USA.

3. Results

A total of 61 subjects were assessed for inclusion in the study. Of these, 4 did not meet the inclusion criteria, 4 had severe difficulties in following the study and 1 had started statine therapy just before the randomization. Of the 52 participants randomized, 2 withdrew from the study for personal reasons. A total of 50 subjects (25 in the Control group and 25 in the Nut group) completed the trial and were included in the statistical analyses (Fig. 1). The average age of the 28 men and 22 women studied was 51.8 y (range 26–63).

The general baseline characteristics of the subjects did not differ significantly between the two intervention groups (Table 1). Most of the subjects included in the study were overweight or obese (BMI between 25 and 35 kg/m²), and 96% of the Nut group and 84% of the Control group were diagnosed with hypertension. At baseline 72% and 40% of the population had hypertriglyceridemia or low HDL-cholesterol, respectively. Physical activity was similar in both groups before the intervention period and remained unchanged throughout the study (data not shown).

At baseline, no significant differences between groups were observed in relation to the total daily energy and nutrient intake (Table 2), peripheral oxidative stress, EF biomarkers and the ENDOPAT index measurements of endothelial function ($p > 0.05$).

When the 3-day records were analyzed, no significant differences were observed in the changes between groups in total energy, carbohydrate or alcohol consumption during the intervention (data not shown). However, participants in the Control group showed a slight increase in total protein intake and a considerable decrease

in total fat ($p < 0.01$), monounsaturated fatty acid (MUFA) ($p < 0.01$) and PUFA ($p < 0.001$) consumption compared with the participants in the Nut group, who significantly increased their baseline PUFA intake ($p < 0.05$).

Adherence to the supplemented nuts measured by counting the empty packages of nuts returned to the investigators was excellent (94%). Adherence was also good when evaluated by objective measurements of nut intake in 27 participants of the sample ($n = 14$ and $n = 13$ in the Nut and Control group, respectively). Plasma α -linolenic acid levels significantly increased during the intervention only in the nut group ($p = 0.019$) from baseline 0.26 to 0.36% (95% CI, –0.02 to 0.18).

Participants in both groups lost weight (–1.5 kg [95% CI, –2.4 to –0.6] and –2.2 kg [95% CI, –3.4 to –0.9] in the Control and the Nut group, respectively). No differences were observed in changes between groups in body mass index ($P = 0.363$), arterial systolic ($P = 0.238$) and diastolic ($P = 0.466$) blood pressure, or any of the general biochemical lipid profile measurements (TC, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and TG, all $P > 0.05$).

Although almost all the oxidative stress biomarkers tended to improve in both interventional groups (Table 3), the DNA damage evaluated by 8-oxo-dG ($p < 0.001$) reduced significantly only in the Nut group. After this variable had been adjusted for body weight changes using an ANCOVA model, the differences in the changes in the 8-oxo-dG measurements between groups remained significant ($p < 0.001$). The nut group also tended to have less oxidative stress because of a greater but nonsignificant reduction in plasma oxLDL, C_{max}, and isoprostane urine excretion.

Although plasma ICAM-1 concentrations decreased during the intervention period in the nut group ($p = 0.038$), no significant differences were observed in changes between groups in plasma endothelial adhesion molecules or in *in vivo* ENDOPAT index measurements (Table 4).

4. Discussion

The results of our feeding clinical trial show that, despite the adverse pro-oxidant effect of consuming PUFA in nuts, especially high in walnuts, the consumption of a supplement of 30 g of mixed

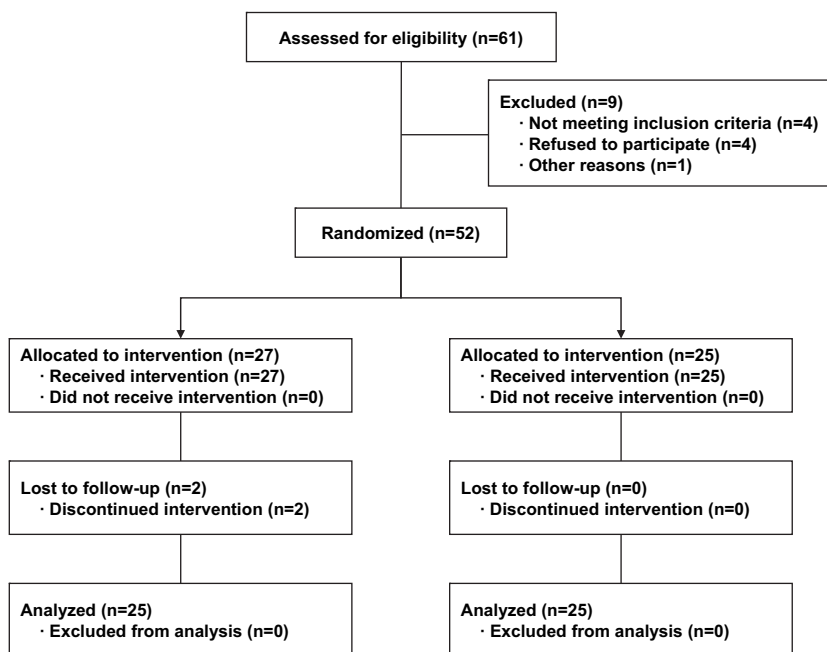


Fig. 1. Patients flow through the study.

Table 1

General baseline characteristics of the groups.

Variable	Nut group (n = 25)	Control group (n = 25)	P
Age (y)	52.9 (8.4)	50.6 (8.4)	0.316
Sex [n (%) men]	15 (60)	13 (52)	0.569
Body weight (kg)	86.4 (80.8–92.0)	79.9 (75.5–84.4)	0.069
Body mass index (kg/m ²)	31.6 (30.5–32.8)	30.0 (28.6–31.4)	0.065
Systolic blood pressure (mm Hg)	144.6 (138.3–150.9)	137.2 (129.2–145.2)	0.137
Diastolic blood pressure (mm Hg)	86.0 (82.7–89.3)	82.0 (77.9–86.0)	0.119
Physical activity (kcal/d)	449.3 (230.9–667.7)	380.0 (248.7–511.3)	0.578

Values are means (SD) or (95% CI). Statistical significance determined by the unpaired *t*-test.

nuts (walnuts, almonds and hazelnuts) in a context of a healthy diet for 12 wk did not produce a deleterious effect on oxidative stress biomarkers or the endothelial function in MetS patients compared with patients consuming the same healthy diet without nuts. Moreover, DNA damage (measured by the 8-oxo-dG urinary excretion), a chronic disease related biomarker, was significantly reduced in the Nut group compared to the Control group during the intervention.

Several studies have investigated the possible effect of nut consumption on oxidation in healthy humans, and patients with hypercholesterolemia or at high cardiovascular risk. These studies are very controversial because some of them show possible benefits but other neutral or negative effects on oxidation. In addition, in only eight clinical trials oxidation was the primary outcome analyzed after chronic consumption of tree nuts,^{25–32} and none of them were conducted in patients with metabolic syndrome. The present study is the first to have evaluated the effect of a supplement of mixed nuts on several lipid and DNA oxidation markers in a group of patients with oxidative stress associated to MetS.

Most of the studies that observed a potential beneficial effect of nut consumption on oxidation focused on almonds,^{26,27,29,31,32} pistachios,³⁰ pecans²⁸ or peanuts,²⁵ all rich sources of MUFA. However, this beneficial effect on oxidation was not consistently reported in walnut trials^{10–12,33–36} and response even tended to worsen after walnut consumption replacing other sources of MUFA.^{10–12,33}

Nuts are fatty foods rich in unsaturated fatty acids mainly MUFA, but also are good sources of PUFA, especially in case of walnuts,⁵ which are the main substrate for the oxidation of the LDL particles.⁶ For this reason, it has been suggested that nut intake can promote LDL oxidation.¹⁰ However, the principal fat compounds in almonds and hazelnuts are MUFA and they have been associated with

reduced susceptibility of LDL to oxidation.⁷ For this reason, differences in the type of fat content between nuts may partly explain why almonds, pistachios, pecans and other nuts rich in MUFA have the ability to reduce the oxidation processes whereas walnuts (rich in PUFA) do not.

Nuts also contain tocopherols and several phenolic compounds with remarkable antioxidant potential, mainly located in the pellicle.³⁷ These bioactive compounds may counteract the pro-oxidant effects of PUFA on LDL oxidation³⁸ and decrease DNA damage.³⁹ However, the ability of tree nut extracts to modulate oxidative stress demonstrated by several *in vitro* assays has not been consistently observed in *in vivo* animal models or human trials.¹⁴ It seems possible that the antioxidant activity of phytochemical compounds and phytoosterols bioavailable in nuts could work with other important nut constituents in an additive and synergistic way to protect against oxidative stress.³⁷ In our study, this complex antioxidant network might help to explain the decrease observed in some markers of oxidation after consuming nuts.

Of all the oxidative stress by-products, 8-oxo-dG has been one of the most widely studied, probably because it is of considerable pathogenic importance.⁴⁰ The presence of 8-oxo-dG in DNA results in substantial genomic instability. Guanine oxidation by ROS generates hydroxyl radicals the mutagenic and carcinogenic effects of which have been extensively documented.⁴¹ Oxidation adds a hydroxyl group to position C8 of the guanine molecule, leading to the oxidative and mutagenic by product 8-oxo-dG, which is considered to be both an important biomarker of generalized cellular oxidative stress and a repair product.⁴² Elevated levels of 8-oxo-dG have also been related to tumour initiation and progression in a variety of animal and human experimental models.^{43,44} The products of DNA repair of oxidation damage are excreted into the urine in amounts corresponding to a damage rate of up to 10⁴ modifications in each cell every day. The most abundant of these lesions is 8-oxo-dG, which is validated as the method of choice for oxidative stress associated diseases⁴⁰ and may be useful for monitoring the beneficial effect of antioxidants in dietary intervention studies.

As mentioned, a remarkably significant improvement in 8-oxo-dG urinary excretion was observed in our MetS patients who consumed the mixed nut supplement compared to those who did not consume it. It has been suggested that this generalized cellular oxidative stress biomarker is a pivotal factor not only for carcinogenesis, but also for aging-associated degenerative diseases,⁴⁰ atherosclerosis or diabetes.⁹ In fact, increased levels of the damaged base have been isolated from both nuclear and mitochondrial DNA of hypertensive subjects.^{23,45} Enhanced oxidative stress and 8-oxo-dG levels have also been observed in other cardiovascular-associated cardiovascular alterations such as combined hyperlipidemia.⁴⁶ The only two studies that have assessed the effect of nut consumption on DNA damage biomarkers were conducted on healthy smokers and they also observed similar improvements after almond consumption.^{29,31} However, further studies are needed to elucidate the possible positive effects of chronic nut consumption on diseases related to DNA damage.

Endothelial dysfunction, a critical early event in the pathogenesis of atherosclerosis characterized by the reduced bioavailability of nitric oxide (endogenous vasodilator) and the increased expression of cellular adhesion molecules, is related to perfusion abnormalities and the causation of ischemic events.⁴⁷ Nuts are rich sources of bioactive compounds, such as α -linolenic acid, the plant n-3 fatty acid which might favourably influence EF.⁴⁸ Only two clinical trials (one chronic and the other acute) have assessed the effect of walnut consumption on endothelial dysfunction.^{12,36} They both demonstrated a significant improvement in the EF, which was assessed by brachial artery vasodilation after walnut consumption. Moreover, a significant

Table 2

Baseline energy and nutrient intake for each intervention group.

Variable	Nut group (n = 25)	Control group (n = 25)	P
Energy (kcal/d)	2094 (1865–2322)	1993 (1801–2186)	0.493
Protein (%)	18.9 (18.0–20.2)	18.6 (17.2–20.0)	0.748
Total fat (%)	35.5 (33.1–38.0)	35.7 (33.2–38.1)	0.933
SFA (%)	10.5 (9.4–11.5)	10.5 (9.4–11.7)	0.931
PUFA (%)	5.4 (4.7–6.1)	5.0 (4.4–5.5)	0.353
MUFA (%)	16.6 (14.5–18.4)	17.0 (15.6–18.5)	0.708
Carbohydrates (%)	41.3 (38.5–44.1)	42.4 (40.0–45.0)	0.533
Fiber (g/day)	20.5 (17.3–23.7)	19.5 (15.9–23.1)	0.679
Alcohol (%)	4.3 (2.0–6.6)	3.3 (0.9–5.7)	0.546

SFA, saturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acids.

Values are means (95% CI). Statistical significance determined by the unpaired *t*-test.

Table 3
 Baseline values and changes within and between groups in antioxidant capacity and biomarkers of oxidative stress during the intervention.

Variable	Nut group (n = 25)	P ^b	Control group (n = 25)	P ^b	Interventional effect	
					Differences ^c	P ^d
Plasma ORAC (μmol TE/mL)						
Baseline	25.46 (22.82–28.12)		26.00 (23.13–28.88)			
Change ^a	0.84 (–1.92–3.60)	0.535	–0.29 (–2.79–2.19)	0.807	1.13 (–2.48–4.76)	0.530
Oxidative stress biomarkers						
oxLDL (U/l)						
Baseline	70.67 (61.50–79.85)		67.64 (57.11–78.19)			
Change ^a	–7.59 (–15.72–0.53)	0.066	–1.87 (–9.39–5.63)	0.611	–5.71 (–16.50–5.06)	0.292
Plasma conjugate diene						
Lag phase (min)						
Baseline	15.76 (12.36–19.16)		14.50 (11.25–17.76)			
Change ^a	0.71 (–2.16–3.60)	0.612	2.70 (0.32–5.07)	0.028	–1.98 (–5.62–1.65)	0.278
V _{max} (nmol/min/mL)						
Baseline	23.8 (21.3–26.2)		26.5 (24.1–29.0)			
Change ^a	–0.4 (–2.3–1.6)	0.690	–0.6 (–2.7–1.5)	0.575	–0.2 (–2.6–3.0)	0.885
C _{max} (nmol/mL)						
Baseline	1088 [976 to 1346]		1193 [958–1555]			
Change ^a	–71 [–278–134]	0.109	28 [–249–136]	0.330	–30 [–247.5–134]	0.603
Urine 8-isoprostanes (ng/mmol creatinine)						
Baseline	221.29 (169.74–272.84)		225.28 (198.39–252.16)			
Change ^a	–138.01 (–190.49 to –85.54)	0.000	–121.06 (–150.56 to –91.54)	0.000	–16.95 (–76.26–42.34)	0.568
Urine 8-oxo-dG (nmol/mmol creatinine)						
Baseline	11.90 (11.06–12.73)		11.96 (11.25–12.66)			
Change ^a	–6.35 (–7.20 to –5.51)	0.000	–3.93 (–4.78 to –3.09)	0.000	–2.42 (–3.58 to –1.25)	0.000

ORAC, oxygen radical absorbance capacity; TE, trolox equivalent; oxLDL, oxidized LDL; V_{max}, maximal rate of oxidation; C_{max}, maximal amount of CD produced; 8-OXO-dG, 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine.

Values are means (95% CI) or median [p25–p75]. Statistical significance determined by the unpaired t-test.

^a Changes between baseline and final intervention period.

^b P value for changes within groups.

^c Differences in changes between groups (Nut vs Control).

^d P values for changes between groups.

decrease in VCAM-1 was also observed in the chronic feeding study.¹² It was suggested that these beneficial effects are because of their α-linolenic acid content. However, considerable evidence suggests that some antioxidant vitamins, folic acid or L-arginine (also contained in other nuts) may contribute to the beneficial effects on EF.⁴⁹ Because the PAT seems to be a promising operator-independent *in vivo* method that can be used for clinical assessment of EF, we evaluated the effect of nuts on EF not only by biochemical markers (*in vitro* CAMs measurements), but also by PAT. In our study we observed no significant effect on the *in vivo* EF between the two interventional groups or on the circulating levels of CAMs.

Our study has some limitations. Because the study was conducted with MetS patients, the results cannot be extrapolated to

other healthy or unhealthy populations. In addition, patients from both groups of our study received dietary advice so that they could be ascribed to the American Heart Association general recommendations. The differences in oxidation may be caused above all by the nut supplement, because according to the empty nut bags and plasma α-linolenic acid concentrations, the participants largely complied with instructions. However, we cannot discard a possible residual effect secondary to the subject unconscious nutrient replacement produced after nut supplementation.

In conclusion, chronic consumption of a daily serving of mixed nuts (walnuts, almonds, and hazelnuts) in the context of a healthy cardiovascular diet does not have a deleterious effect on the antioxidant capacity, lipid oxidation, or endothelial function when

Table 4
 Baseline values and changes within and between groups in endothelial function markers and the ENDOPAT index during the intervention.

Variable	Nut group (n = 25)	P ^b	Control group (n = 25)	P ^b	Interventional effect	
					Differences ^c	P ^d
Endothelial function markers						
VCAM-1 (μg/L)						
Baseline	1082.04 (921.13–1242.95)		1179.25 (905.15–1453.34)			
Change ^a	–42.91 (–220.47–134.65)	0.622	56.81 (–86.40–200.03)	0.421	–99.72 (–321.96–122.51)	0.371
ICAM-1 (μg/L)						
Baseline	609.1 (523.2–696.5)		566.9 (476.4–657.4)			
Change ^a	–91.98 (–178.29 to –5.68)	0.038	–11.35 (–116.23–93.53)	0.824	–80.63 (–211.1–50.72)	0.222
ENDOPAT index						
Baseline	1.82 (1.65–1.99)		1.92 (1.69–2.14)			
Change ^a	–0.11 (–0.28–0.05)	0.165	–0.13 (–0.36–0.091)	0.231	0.02 (0.25–0.29)	0.890

VCAM-1, vascular cell adhesion molecule; ICAM-1, intercellular cell adhesion molecule; ENDOPAT index, hyperaemic response.

Values are means (95% CI). Statistical significance determined by the unpaired t-test.

^a Changes between baseline and final intervention period.

^b P value for changes within groups.

^c Differences in changes between groups (Nut vs Control).

^d P values for changes between groups.

compared to subjects not receiving nuts. The decrease in DNA damage observed in the present study may help to explain the beneficial effects of regular nut consumption on some MetS features observed in other studies. These findings are consistent with the beneficial effects of nuts on CHD.⁵⁰ Further studies will be required to explore any possible interaction between antioxidants and other constituents of tree nuts that may promote different antioxidant activities.

Conflict of Interest

J. Salas-Salvadó has received research funding from the International Nut Council, Reus, Spain. He is a nonpaid member of the Scientific Advisory Board of the International Nut Council. Mònica Bulló, Patricia Casas-Agustench, Patricia López-Uriarte, Lluís Masana, Rosa Nogués, Marta Romeu, Guillermo Saez and Carmen Tormos, no conflict of interest.

Contribution authors

PLU and JSS wrote the paper; JSS and MB designed the research and had primary responsibility for final content; PLU and PCA conducted research and analyzed data; PLU, PCA, MB, RN, MR, GS and CT conducted experiments of the research. MB, LM, GS, critically reviewed the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CICYT-AGL2005-0365), Spanish Ministry of Health (RTIC RD06/0045), and the International Nut Council. Borges S.A. (Reus, Spain) donated the walnuts used in this study. CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) is an initiative of ISCIII. Patricia López-Uriarte is the recipient of a predoctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya's Department of Universities, Research and the Information Society and the European Social Funds. We thank Adriana Gómez-Flores for her collaboration in the acquisition of the nutritional data.

References

- Kelly Jr JH, Sabate J. Nuts and coronary heart disease: an epidemiological perspective. *Br J Nutr* 2006;**96**:S61–7.
- Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Jerling JC. A systematic review of the effects of nuts on blood lipid profiles in humans. *J Nutr* 2005;**135**:2082–9.
- Johnson RK, Kennedy E. The 2000 dietary guidelines for americans: what are the changes and why were they made? the dietary guidelines advisory committee. *J Am Diet Assoc* 2000;**100**:769–74.
- Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA dietary guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American heart association. *Circulation* 2000;**102**:2284–99.
- Kris-Etherton PM, Yu-Poth S, Sabate J, Ratcliffe HE, Zhao G, Etherton TD. Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk. *Am J Clin Nutr* 1999;**70**:504S–11S.
- Reaven P, Parthasarathy S, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witztum JL. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest* 1993;**91**:668–76.
- Berry EM, Eisenberg S, Haratz D, Friedlander Y, Norman Y, Kaufmann NA, et al. Effects of diets rich in monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins—the Jerusalem nutrition study: high MUFAs vs high PUFAs. *Am J Clin Nutr* 1991;**53**:899–907.
- Thomas MJ, Rudel LL. Dietary fatty acids, low density lipoprotein composition and oxidation and primate atherosclerosis. *J Nutr* 1996;**126**:1058S–62S.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004;**339**:1–9.
- Zambon D, Sabate J, Munoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, et al. Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial. *Ann Intern Med* 2000;**132**:538–46.
- Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, Hirooka Y, Sakai K, Takeshita A, et al. Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts. *Eur J Clin Nutr* 2002;**56**:629–37.
- Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, et al. A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial. *Circulation* 2004;**109**:1609–14.
- Chen CY, Blumberg JB. Phytochemical composition of nuts. *Asia Pac J Clin Nutr* 2008;**17**:SS329–32.
- Lopez-Uriarte P, Bullo M, Casas-Agustench P, Babio N, Salas-Salvadó J. Nuts and oxidation: a systematic review. *Nutr Rev* 2009;**67**:497–508.
- Schutte AE, Van Rooyen JM, Huisman HW, Mukuddem-Petersen J, Oosthuizen W, Hanekom SM, et al. Modulation of baroreflex sensitivity by walnuts versus cashew nuts in subjects with metabolic syndrome. *Am J Hypertens* 2006;**19**:629–36.
- Casas-Agustench P, Lopez-Uriarte P, Bullo M, Ros E, Cabre-Vila JJ, Salas-Salvadó J. Effects of one serving of mixed nuts on serum lipids, insulin resistance and inflammatory markers in patients with the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009 Dec 21. [Epub ahead of print]
- Elosua R, Marrugat J, Molina L, Pons S, Pujol E. Validation of the Minnesota leisure time physical activity questionnaire in Spanish men. the MARATHOM investigators. *Am J Epidemiol* 1994;**139**:1197–209.
- Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1993;**14**:303–11.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001;**49**:4619–26.
- Spranger T, Finckh B, Fingerhut R, Kohlschutter A, Beisiegel U, Kontush A. How different constituents of human plasma and low density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem Phys Lipids* 1998;**91**:39–52.
- Kleinvelde HA, Hak-Lemmers HL, Stalenhoef AF, Demacker PN. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation: application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. *Clin Chem* 1992;**38**:2066–72.
- Brown RK, McBurney A, Lunec J, Kelly FJ. Oxidative damage to DNA in patients with cystic fibrosis. *Free Radic Biol Med* 1995;**18**:801–6.
- Espinosa O, Jimenez-Almazan J, Chaves FJ, Tormos MC, Clapes S, Iradi A, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res* 2007;**41**:546–54.
- Rozanski A, Qureshi E, Bauman M, Reed G, Pillar G, Diamond GA. Peripheral arterial responses to treadmill exercise among healthy subjects and atherosclerotic patients. *Circulation* 2001;**103**:2084–9.
- Hargrove RL, Etherton TD, Pearson TA, Harrison EH, Kris-Etherton PM. Low fat and high monounsaturated fat diets decrease human low density lipoprotein oxidative susceptibility in vitro. *J Nutr* 2001;**131**:1758–63.
- Hyson DA, Schneeman BO, Davis PA. Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women. *J Nutr* 2002;**132**:703–7.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Parker TL, Connelly PW, Qian W, et al. Dose response of almonds on coronary heart disease risk factors: blood lipids, oxidized low-density lipoproteins, lipoprotein(a), homocysteine, and pulmonary nitric oxide: a randomized, controlled, crossover trial. *Circulation* 2002;**106**:1327–32.
- Haddad E, Jambazian P, Karunia M, Tanzman J, Sabaté J. A pecan-enriched diet increases γ -tocopherol/cholesterol and decreases thiobarbituric acid reactive substances in plasma of adults. *Nutr Res* 2006;**26**:397–402.
- Jia X, Li N, Zhang W, Zhang X, Lapsley K, Huang G, et al. A pilot study on the effects of almond consumption on DNA damage and oxidative stress in smokers. *Nutr Cancer* 2006;**54**:179–83.
- Kocycigit A, Koylu AA, Keles H. Effects of pistachio nuts consumption on plasma lipid profile and oxidative status in healthy volunteers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006;**16**:202–9.
- Li N, Jia X, Chen CY, Blumberg JB, Song Y, Zhang W, et al. Almond consumption reduces oxidative DNA damage and lipid peroxidation in male smokers. *J Nutr* 2007;**137**:2717–22.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Josse AR, Nguyen TH, Faulkner DA, et al. Almonds reduce biomarkers of lipid peroxidation in older hyperlipidemic subjects. *J Nutr* 2008;**138**:908–13.
- Munoz S, Merlos M, Zambon D, Rodriguez C, Sabate J, Ros E, et al. Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells. *J Lipid Res* 2001;**42**:2069–76.
- Tapscell LC, Gillen LJ, Patch CS, Batterham M, Owen A, Bare M, et al. Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;**27**:2777–83.
- Davis L, Stonehouse W, Loots du T, Mukuddem-Petersen J, van der Westhuizen FH, Hanekom SM, et al. The effects of high walnut and cashew nut diets on the antioxidant status of subjects with metabolic syndrome. *Eur J Nutr* 2007;**46**:155–64.
- Cortes B, Nunez I, Cofan M, Gilabert R, Perez-Heras A, Casals E, et al. Acute effects of high-fat meals enriched with walnuts or olive oil on postprandial endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:1666–71.
- Blomhoff R, Carlsen MH, Andersen LF, Jacobs Jr DR. Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *Br J Nutr* 2006;**96**:S52–60.
- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *J Nutr* 2001;**131**:2837–42.

39. Sudheer AR, Muthukumar S, Devipriya N, Menon VP. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology* 2007;**230**:11–21.
40. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2009;**27**:120–39.
41. Ames BN. Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Radic Res Commun* 1989;**7**:121–8.
42. Cooke MS, Evans MD, Herbert KD, Lunec J. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: source significance and supplements. *Free Radic Res* 2000;**32**:381–97.
43. Kalliomäki TM, McCallum G, Wells PG, Hill RP. Progression and metastasis in a transgenic mouse breast cancer model: effects of exposure to in vivo hypoxia. *Cancer Lett* 2009;**282**:98–108.
44. Oliva MR, Ripoll F, Muñoz P, Iradi A, Trullenque R, Valls V, et al. Genetic alterations and oxidative metabolism in sporadic colorectal tumors from a Spanish community. *Mol Carcinog* 1997;**18**:232–43.
45. Sáez GT, Tormos C, Giner V, Chaves J, Lozano JV, Iradi A, et al. Factors related to the impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. *Am J Hypertens* 2004;**17**:809–16.
46. Martínez-Hervas S, Fandos M, Real JT, Espinosa O, Chaves FJ, Saez GT, et al. Insulin resistance and oxidative stress in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 2008;**199**:384–9.
47. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;**352**:1685–95.
48. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2001;**73**:673–86.
49. Ros E. Nuts and novel biomarkers of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2009;**89**:1649S–56S.
50. Salas-Salvado J, Fernandez-Ballart J, Ros E, Martinez-Gonzalez MA, Fito M, Estruch R, et al. Effect of a mediterranean diet supplemented with nuts on metabolic syndrome status: one-year results of the PREDIMED randomized trial. *Arch Intern Med* 2008;**168**:2449–58.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EFECTO DEL CONSUMO DE FRUTOS SECOS SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO
Patricia Josefina López Uriarte
ISBN:978-84-694-0325-9/DL:T-197-2011