

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Medicina

**INFLUENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE GRASA
DE LA DIETA SOBRE EL GRADO DE RESPUESTA
INFLAMATORIA EN PACIENTES CON SÍNDROME
METABÓLICO: ESTUDIO LIPGENE**

Trabajo presentado por Cristina Cruz Teno, licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor.

TITULO: *INFLUENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE GRASA DE LA DIETA
SOBRE EL GRADO DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN
PACIENTES CON SINDROME METABOLICO: ESTUDIO LIPGENE*

AUTOR: *CRISTINA CRUZ TENO*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: INFLUENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE GRASA DE LA DIETA SOBRE EL GRADO DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO: ESTUDIO LIPGENE

DOCTORANDO/A: CRISTINA CRUZ TENO

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS.
Dr. José López Miranda y Dr. Pablo Pérez Martínez**

HACEN CONSTAR:

Que el trabajo titulado "INFLUENCIA DE LA CALIDAD Y CANTIDAD DE GRASA DE LA DIETA SOBRE EL GRADO DE RESPUESTA INFLAMATORIA EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO: ESTUDIO LIPGENE" ha sido realizado por D^a Cristina Cruz Teno bajo nuestra dirección, en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba/Universidad de Córdoba. La publicación derivada de la tesis titulada: "Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic síndrome: the LIPGENE study" ha sido publicada en la revista Molecular Nutrition and Food Research.

A nuestro juicio reúne los méritos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente y poder optar al grado de Doctor

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 24 de Septiembre de 2012

Firma del/de los director/es

Fdo.: José López Miranda

Fdo.: Pablo Pérez Martínez

LISTADO DE ABREVIATURAS	9
I. RESUMEN	15
II. INTRODUCCIÓN	19
1. SÍNDROME METABÓLICO	19
1.1. Historia del síndrome metabólico	19
1.2. Definición del síndrome metabólico	23
2. INFLAMACIÓN	24
2.1. Concepto de inflamación	24
2.2. Respuesta inflamatoria	25
2.3. Inflamación y aterosclerosis	26
2.4. NF-kB	31
2.5. Citoquinas	33
2.6. Metaloproteínas	39
2.7. Adipoquinas	41
2.8. Ácidos grasos libres no esterificados	43
3. ALTERACIONES METABÓLICAS DEL SÍNDROME METABÓLICO Y SU RELACIÓN CON LA INFLAMACIÓN	44
3.1. Inflamación, aterosclerosis y síndrome metabólico	44
3.2. Inflamación, obesidad y síndrome metabólico	45
3.3. Inflamación, dislipemia y síndrome metabólico	48
3.4. Inflamación, disfunción endotelial, hipertensión y síndrome metabólico	49
3.5. Inflamación, resistencia a la insulina y síndrome metabólico	50
3.6. Inflamación, estrés oxidativo y síndrome metabólico	52
3.7. Prevalencia del síndrome metabólico y asociación con la enfermedad cardiovascular y la diabetes mellitus tipo 2	52
4. DIETA, INFLAMACIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO	54
4.1. Modelo de alimentación saludable	54
4.2. Aceite de oliva	55
4.3. Dieta, inflamación y síndrome metabólico	56
5. ESTADO POSTPRANDIAL	59
5.1. Respuesta postprandial, inflamación y síndrome metabólico	60
III. HIPÓTESIS	67

IV. OBJETIVOS	71
V. DISEÑO Y METODOLOGÍA	75
1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	75
1.1. Cálculo del tamaño muestral	75
1.2. Criterios de inclusión	76
1.3. Criterios de exclusión	76
2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO	77
2.1. Estudio de intervención dietética	77
2.2. Estudio de lipemia postprandial	79
3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	80
3.1. Extracciones sanguíneas	80
3.2. Aislamiento del plasma	81
3.3. Análisis lipídico	81
3.4. Aislamiento de células mononucleares	81
4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NF-KB Y WESTERN BLOTTING	82
4.1. Extracción de proteínas	82
4.2. Determinación de la actividad nuclear del NF-kB (p65)	82
4.3. Western Blotting	83
4.4. Cuantificación de las bandas de proteínas	85
5. EXTRACCIÓN DEL ARN DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y qRT- PCR DE GENES INFLAMATORIOS REGULADOS POR EL NF-KB	86
5.1. Extracción del ARN	86
5.2. Eliminación del ADN	86
5.3. Transcripción inversa	87
5.4. PCR a tiempo real	87
6. MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CITOQUINAS Y ADIPOQUINAS	88
6.1. Cuantificación de la MCP-1 humana en plasma-citrato	88
6.2. Determinación cuantitativa de la IL-6 humana en plasma-EDTA	89
6.3. Determinación cuantitativa del TNF- α humano en plasma-citrato	89
6.4. Cuantificación de resistina humana en plasma-EDTA	90
6.5. Determinación de leptina humana en plasma-EDTA	90

6.6. Cuantificación de adiponectina humana en plasma-EDTA	91
7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA-EDTA	91
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	91
VI. RESULTADOS	95
1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES AL COMIENZO DEL ESTUDIO	95
2. COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS DEL ESTUDIO	96
3. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES TRAS EL PERIODO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA	97
4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA FASE DE PRE-INTERVENCIÓN DEL ESTUDIO	98
5. EFECTO DE LA INGESTA A CORTO Y LARGO PLAZO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE GRASA. RESPUESTA INFLAMATORIA EN AYUNAS Y DURANTE EL PERIODO POSTPRANDIAL	101
5.1. Actividad nuclear del NF-kB	101
5.2. Niveles de expresión proteica de las subunidades activadora (p65) e inhibidora (I κ B- α) del NF-kB	102
5.3. Expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y regulados por el NF-kB	104
5.4. Análisis de las concentraciones plasmáticas de citoquinas y adipocinas que intervienen en la respuesta inflamatoria	110
5.5. Ácidos grasos libres no esterificados	114
6. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN	114
VII. DISCUSIÓN	122
VIII. CONCLUSIONES	135
IX. BIBLIOGRAFÍA	139
X. ANEXOS	173

ABREVIATURAS

A continuación se presenta una relación de las abreviaturas más utilizadas a lo largo del texto:

AACE: Asociación Americana de Endocrinología Clínica

ABCA1: ATP binding cassette A1

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AHA: Asociación Americana del Corazón

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATP: adenosín tri-fosfato

ATPIII: Tercer informe del panel de expertos del programa de Educación Nacional sobre colesterol

CCT: Contenido Calórico total

cHDL: colesterol vehiculizado en lipoproteínas de alta densidad

cLDL: colesterol vehiculizado en lipoproteínas de baja densidad

CMNs: Células mononucleares de sangre periférica

cVLDL: colesterol vehiculizado en lipoproteínas de muy baja densidad

DHA: ácido docosahexaenoico

DM: dieta mediterránea

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2

DTT: Ditiotreitól

EASD: Asociación Europea para el estudio de la diabetes

ECV: Enfermedad Cardiovascular

EDTA: ácido etilendiamino-tetracético

EEM: error estándar de la media

EGIR: Grupo europeo para el estudio de la resistencia a la insulina

EO: Estrés oxidativo

EPA: ácido eicosapentaenoico

FDA: US Food and Drug Administration

HC: hidratos de carbono

HEPES: ácido N-2 hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico

HOSO: cápsula de aceite de girasol alto en ácido oleico

HSFA: alta en ácidos grasos saturados

HMUFA: alta en ácidos grasos monoinsaturados

HUVEC: Células de cordón umbilical humanas

IDF: Federación Internacional de Diabetes

IκB: Inhibidor de NF-κB

IKK: quinasas de IκB

IL: Interleuquina

IMC: índice de masa corporal

KANWU:

LFHCC n-3: baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos y suplementada con poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino

LFHCC: baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos y suplementada con placebo

LPS: Lipopolisacárido

LRTs: lipoproteínas ricas en triglicéridos

LSH: Lipasa sensible a hormonas

MAP3Ks: Mitogen activated protein kinase kinase kinase

Marinol TM C-38: Concentrado natural de aceite de pescado con alto contenido en ácido docosahexaenoico y ácido eicosapentaenoico

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos

MESYAS: Metabolic Syndrome in Active Subjects

MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos

MMPs: Metaloproteínas

MUFA: ácidos grasos monoinsaturados

NEFAs: ácidos grasos libres no esterificados

NF-κB: factor de transcripción nuclear kappa B

NHANES-III: Tercera Encuesta Nacional de Salud Americana

NHLBI: Instituto Nacional de pulmón, corazón y sangre

NIK: quinasa inductora de NF-κB

NOS3/eNOS: óxido nítrico sintasa 3 u óxido nítrico sintasa endotelial

OMS: Organización mundial de la salud

ON: óxido nítrico

PAI-1: Inhibidor del activador tisular del plasminógeno-1

pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato salino
PCR: Proteína C Reactiva
PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride
PREDIMED: Estudio de Prevención con Dieta Mediterránea
PUFA n-3: ácidos grasos poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino
RI: Resistencia a la insulina
ROS: especies reactivas de oxígeno
rpm: revoluciones por minuto
SFA: ácidos grasos saturados
SM: Síndrome Metabólico
TG: Triglicéridos
TIMPs: Inhibidores de las metaloproteínasas
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
UA: Unidades Arbitrarias
UCP-2: Proteína desacopladora-2
v/v: volumen/volumen



I. RESUMEN

Introducción: El síndrome metabólico (SM) se ha convertido en un problema de salud de creciente prevalencia asociado a estilos de vida poco saludables. El factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) regula la expresión de citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión o enzimas inflamatorias, todas ellas implicadas en procesos de inflamación, aterosclerosis o resistencia a la insulina. El estado postprandial constituye la situación metabólica habitual en la que se encuentra el ser humano a lo largo del día, por lo que es fundamental estudiar los cambios metabólicos que se producen durante el postprandio, así como, el efecto que sobre el mismo ejercen los diferentes modelos de alimentación consumidos de forma crónica.

Objetivo principal: Estudiar el efecto a largo plazo del consumo de cuatro modelos de dieta (alta en MUFA (HMUFA, 20% MUFA); rica en grasa saturada (HSFA, 16% SFA); baja en grasa (LFHCC, 6% PUFA); pobre en grasa y suplementada con PUFA n-3 (LFHCC n-3, 6% PUFA y 1.24 g/d de PUFA n-3), seguidos de una sobrecarga grasa en forma de desayuno con la misma composición que la dieta que habían seguido durante las 12 semanas de intervención sobre la actividad nuclear de NF- κ B, en células mononucleares (CMNs) de pacientes con SM.

Objetivos secundarios: Estudiar el efecto de los cuatro modelos de alimentación sobre los niveles proteicos de I κ B- α citoplasmática y p65 nuclear y sobre los cambios de expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios: I κ B- α , p65, IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-8, MIF y MMP-9 en CMNs de pacientes con SM, al finalizar el periodo de intervención dietética y durante el postprandio. Determinar la respuesta a la intervención dietética y al estudio postprandial de las moléculas TNF- α , IL-6, MCP-1, adiponectina, leptina, resistina y ácidos grasos libres a nivel plasmático. Por último analizaremos si existe una relación entre el grado de respuesta de los triglicéridos (TG) y de las lipoproteínas ricas en TG (quilomicrones y sus remanentes) con los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.

Población, diseño y metodología: Un grupo de 75 pacientes con SM fueron aleatorizados para recibir uno de los cuatro periodos de intervención dietética de 12 semanas de duración de las que consta el estudio. Las 4 dietas fueron: dieta HMUFA (20% MUFA), dieta HSFA (16% HSFA), dieta LFHCC (6% PUFA) y dieta LFHCC n-3 (6% PUFA y 1.24 g/d PUFA n-3 de origen marino). Tras el periodo de intervención dietética, los voluntarios consumieron una sobrecarga grasa de similar composición que la dieta que acababan de finalizar, y se les realizaron extracciones sanguíneas en los

tiempos basales (en ayunas), a las 2 y a las 4 horas de la sobrecarga grasa. Se determinó la actividad nuclear de NF- κ B, los niveles proteicos de I κ B- α y p65, así como la expresión génica de I κ B- α , p65, IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-8, MIF y MMP-9, en CMNs. Además, se determinaron las concentraciones plasmáticas de TNF- α , IL-6, MCP-1, adiponectina, leptina, resistina y ácidos grasos libres.

Resultados: El consumo de una dieta HMUFA indujo una disminución postprandial en la actividad nuclear de NF- κ B y en la proteína p65 nuclear en CMNs. Además, se observó un aumento postprandial en la expresión génica de I κ B- α con esta misma dieta. Por otra parte, el consumo de la dieta HMUFA indujo una disminución postprandial en la expresión génica de TNF- α y MMP-9, en CMNs, comparado con el consumo de una dieta HSFA. En plasma, observamos una disminución postprandial en los niveles plasmáticos de MCP-1 con las dietas HMUFA y LFHCC-n-3 respecto a la dieta HSFA. Además, tras el consumo de la dieta LFHCCn-3 se observaron menores niveles de resistina plasmática, tanto en el periodo basal (ayunas) como durante el postprandio, comparado con la dieta HSFA.

Conclusiones: Los resultados obtenidos sugieren que un modelo de dieta saludable, con alto contenido en MUFA o en PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino, mejoran el estado inflamatorio postprandial en pacientes con SM.



II. INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME METABÓLICO

1.1 Historia del Síndrome Metabólico

El Síndrome Metabólico (SM) es un estado fisiopatológico multifactorial que se ha convertido en uno de los principales problemas de salud del siglo XXI. Una de las primeras referencias en la literatura al SM data de hace más de 250 años cuando, basándose en los hallazgos necrópsicos de individuos con enfermedad cardiovascular (ECV), se describió la asociación entre obesidad abdominal, hiperuricemia, hipertensión arterial (HTA) y apnea del sueño¹. No sería hasta principios del siglo XX, cuando en 1923 Kylin² retomaría el tema detectando la presencia de una asociación entre HTA, hiperglucemia y gota. Marañón³, el fundador de la endocrinología moderna en España, ya señaló en 1927 de manera explícita que «la HTA es un estado prediabético... este concepto también se aplica a la obesidad... y debe haber alguna forma de predisposición de carácter general para la asociación de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) con la HTA, la obesidad y quizá también con la gota... de manera que la dieta es esencial para la prevención y el tratamiento de todas estas alteraciones». Posteriormente, en 1947, Vague⁴ aportaría su contribución concluyendo en un estudio que la obesidad corporal superior (de tipo androide o masculino) se asociaba a determinadas anomalías metabólicas que se observaban en la DMT2 y la ECV. En 1963 Reaven y cols⁵ describieron en pacientes no diabéticos que habían sufrido previamente un infarto agudo de miocardio, elevados niveles de glucosa en ayunas, intolerancia a la glucosa y mayores niveles de TG en comparación con sujetos controles. Camus⁶ en 1966, denominó *trisíndrome metabólico* a la asociación ya descrita previamente por Kylin². En 1967, Avogaro y Crepaldi⁷ denominaron *síndrome plurimetabólico* a la confluencia de obesidad, HTA, hiperuricemia, enfermedad arterial coronaria y DMT2.

Sin embargo, fueron Mehnert y Kuhlmann⁸ en 1968 quienes determinaron por primera vez la importancia de factores ambientales al definir el *síndrome del bienestar* para hacer referencia a la relación entre determinadas anomalías metabólicas observadas y algunos hábitos nutricionales y de estilo de vida en habitantes de países desarrollados. En 1981, Leonhardt y Hanefeld⁹ acuñaron por vez primera el término de *síndrome metabólico* para describir la asociación entre DMT2, hiperinsulinemia, obesidad, HTA, hiperlipemia, gota y trombofilia, destacando la importancia del perfil genético y determinadas condiciones ambientales como la sobrenutrición y el sedentarismo. En 1985, Modan¹⁰ detectó la presencia de una relación entre hiperinsulinemia, HTA,

DMT2, intolerancia a la glucosa y dislipemia. A pesar de todas las observaciones aportadas por los distintos autores, no fue hasta 1988 con Reaven¹¹, y su denominado *síndrome X*, compuesto por intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, niveles elevados de colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad (cVLDL) y TG, bajos niveles de cHDL e HTA, cuando comenzó a despertar gran interés. Bjorntorp¹² en 1991 destacó la existencia de alteraciones metabólicas en presencia de obesidad abdominal, la cual no había sido incluida en la definición previa de Reaven al constatar en la presencia de sujetos no obesos con resistencia a la insulina (RI). Ese mismo año, DeFronzo y Ferrannini¹³ sugirieron que la RI podría ser el denominador común de estos síntomas y que una vez adquirida, en aquellos sujetos genéticamente predispuestos, se podrían desarrollar otras alteraciones de este síndrome. Además, estos autores apuntaron que una dieta adecuada junto con el ejercicio físico y la pérdida de peso, podrían disminuir la RI. Basados en esta hipótesis en 1992, Haffner y cols¹⁴ lo denominaron *síndrome de resistencia a la insulina* para subrayar el hecho de que esta podría preceder al conjunto de alteraciones metabólicas observadas.

Finalmente, y como ya sugiriera Ferrannini¹⁵ anteriormente, sería el término *síndrome metabólico* el habitualmente utilizado para referirnos a esta confluencia de factores que producen un estado alterado del metabolismo lipídico e hidrocabonado con predisposición del sujeto que lo padece al desarrollo de diabetes y ECV. Sin embargo, no fue hasta finales de siglo, en 1998, cuando la *Organización Mundial de la Salud (OMS)*¹⁶ introdujo el término *síndrome metabólico* como entidad diagnóstica con criterios definidos. Un aspecto central en esta definición era la descripción de la RI, aunque pronto se convirtió en una de sus propias limitaciones. La más importante de estas se refería a la necesidad de la técnica del «pinzamiento» o *clamp* euglucémico hiperinsulinémico para determinar la sensibilidad a la insulina. El *Grupo Europeo para el estudio de la RI (EGIR)* desarrolló una versión¹⁷ modificada de la definición de la OMS. Esta nueva versión basaba la RI en las concentraciones de ésta en ayunas en lugar de la técnica del *clamp* euglucémico. De esta forma, todavía se mantenía la RI como el principal determinante etiológico del SM. No obstante, estos investigadores limitaron el uso de la definición del SM a los casos en que se pudiera cuantificar, de manera sencilla y fiable, la RI. Por lo tanto, los pacientes con DMT2 fueron excluidos de esta definición, dado que la disfunción de las células beta que caracteriza a esta enfermedad hace que las estimaciones de la sensibilidad a la insulina carezcan de fiabilidad. La definición del EGIR también introdujo el perímetro de la cintura abdominal como

medida de la adiposidad. Dos años después, el *Tercer Informe del panel de expertos del Programa de Educación Nacional sobre Colesterol (ATP III)*¹⁸, introdujo su definición. Fundamentalmente propuesta para su aplicación en la práctica clínica, esta definición no incluía una cuantificación específica de la sensibilidad a la insulina y adoptó un abordaje menos «glucocéntrico», considerando por igual todos los componentes del SM. El parámetro de cuantificación de la obesidad seguía siendo el perímetro de la cintura, aunque con valores umbral superiores a los utilizados en la definición del *EGIR* (102 cm en los varones y 88 cm en las mujeres). La definición del *ATP III* alcanzó una gran popularidad debido a su sencillez. Sus componentes se podían determinar fácilmente y de manera sistemática en la mayor parte de los contextos clínicos y de investigación. Sin embargo, dos años después, la *Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE)* efectuó una modificación de la definición del *ATP III*¹⁹. Esta nueva definición estaba basada en la consideración de que la RI constituía el problema básico. La *AACE* excluyó la obesidad central como componente del SM al considerar que era un factor que contribuía a la aparición de RI, más que una consecuencia de ésta. La exclusión de este componente generó numerosas críticas, dada la gran cantidad de datos que sugieren que la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de DMT2 y ECV^{20, 21, 22, 23}. Por otro lado, la *Federación Internacional de Diabetes (IDF)*²⁴ propuso la creación de una herramienta diagnóstica sencilla y universalmente aceptada cuya aplicación en la práctica clínica fuera suficientemente fácil y no dependiera de parámetros aplicables sólo en contextos de investigación. En esta nueva definición, la obesidad central representaba un requisito necesario teniendo en cuenta la gran cantidad de datos que indican que la adiposidad abdominal es común a todos los componentes del SM²⁵. Por primera vez, se ofrecieron valores umbral para definir la obesidad en los distintos grupos étnicos, dado que en los estudios de investigación se había demostrado que los grados de obesidad para los cuales comienza a aumentar el riesgo de otras complicaciones son distintos en los diferentes grupos de población^{24, 25, 26, 27}. Por ejemplo, en lo que se refiere a los asiáticos del sur y del sureste, los valores umbral para los varones y las mujeres son 90 y 80 cm, respectivamente. Posteriormente, la *Asociación Americana de Diabetes (ADA)* y la *Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes (EASD)* publicaron un informe conjunto²⁸, basado en una revisión de los criterios utilizados originalmente por la *OMS*¹⁷ y por el *ATP III*¹⁸ para definir el SM. Este informe cuestionaba la existencia del SM teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- La ausencia de bases establecidas para la inclusión de unos u otros componentes.
- La variabilidad interindividual del riesgo cardiovascular, dependiente de la presencia de factores de riesgo específicos y de la intensidad de los mismos.
- El riesgo cardiovascular global asociado no parece ser mayor del resultante de la suma de sus componentes. De hecho, el tratamiento del mismo equivale al tratamiento de sus componentes.
- El valor de incluir la DMT2 en la definición, pues esta incrementa ya de por sí el riesgo vascular.
- La inconsistencia de la RI como factor unificador, cuya medida no está presente en las últimas definiciones aportadas.
- La ambigüedad de algunos de sus criterios y la arbitrariedad de sus valores umbrales, no siempre bien definidos.

Consecuentemente y en base a estos razonamientos, la *ADA* y la *AESD* consideraban que no estaría clara la utilidad médica de diagnosticar este síndrome. Otros datos publicados, apoyaron la visión crítica de estas sociedades^{29, 30}. La respuesta de la *IDF* no se hizo esperar²⁴, su principal defensa del SM consistía en la consideración de que este grupo de factores de riesgo estrechamente relacionados con la ECV y la DMT2^{20, 21, 22, 23} constituía una razón excelente para definir un síndrome, al perseguir el objetivo de identificar a las personas que presentaban un elevado riesgo cardiovascular. Un trabajo³¹ reciente que reevaluó los resultados del estudio de casos y controles *INTERHEART* sobre más de 26.000 pacientes de 52 países, atribuyó al hecho de padecer SM un riesgo entre el 14.5-16.8% de sufrir un infarto de miocardio, similar al de padecer DMT2 o HTA y muy superior al considerar otros componentes del SM por separado. Tras las críticas ofrecidas por la *ADA/EASD*, la *American Heart Association (AHA)* y el *National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)* han publicado declaraciones científicas acerca del SM³², en las que se recoge una clasificación del *ATP III* actualizada, a las que se han unido otras sociedades científicas³³. En esta nueva definición no se considera necesario el criterio del incremento del perímetro de la cintura en los pacientes en los que hay otros tres factores de riesgo y se contempla una disminución del valor umbral del perímetro de la cintura en lo relativo al riesgo, sobre todo en las personas de origen asiático-americano. Esta versión actualizada de la definición del *ATP III* y los criterios propuestos por la *IDF* permiten establecer el

diagnóstico de SM básicamente en los mismos pacientes, pues los criterios y las recomendaciones respecto al tratamiento son virtualmente idénticos (ver **Tabla 1**). Tras este grupo inicial de factores de riesgo, otras características adicionales han sido sugeridas como componentes del SM, tales como el incremento de la actividad procoagulante³⁴ (niveles elevados de fibrinógeno e inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI)-1), un estado sistémico de inflamación de bajo grado, la adiposidad visceral y la inflamación del tejido adiposo^{35, 36, 37, 38, 39, 40}, la esteatosis hepática⁴¹, la disfunción endotelial⁴² y el estrés oxidativo (EO)^{43, 44}.

1.2 Definición de Síndrome Metabólico

Como referíamos previamente, el SM es un estado fisiopatológico multifactorial que se ha convertido en uno de los principales problemas de salud del siglo XXI. Se considera que el SM está asociado a un incremento de 4 a 5 veces la prevalencia de DMT2 y de 2 a 3 veces la de ECV^{25, 45, 46, 47}.

A pesar de muchos esfuerzos, aún no existen criterios definitivos para diagnosticar el SM^{48, 49}, sin embargo, una de las definiciones mejor aceptadas es la propuesta por el *ATP III* (**Tabla 1**)³³. Además, existen otros componentes relacionados con el SM y con la ECV como un estado pro-inflamatorio (citoquinas pro-inflamatorias y proteína C reactiva (PCR) elevadas) y un estado pro-trombótico (elevados niveles de PAI-1 y de fibrinógeno).

Medidas	Valores
Perímetro de cintura elevado *	Definiciones específicas para cada país o población
TG elevados o tratamiento farmacológico para la hipertrigliceridemia †	≥ 150 mg/dL (1.7 mmol/L)
c-HDL bajo o tratamiento farmacológico para el mismo	<40 mg/dL (1.0 mmol/L) en hombres <50 mg/dL (1.3 mmol/L) en mujeres
Presión arterial elevada o tratamiento farmacológico en un paciente con historia de HTA	Sistólica ≥130 mm Hg Diastólica ≥85 mm Hg
Glucemia basal alterada o tratamiento farmacológico para la hiperglucemia ‡	≥100 mg/dL

Tabla 1: Criterios para el diagnóstico clínico del SM.

* Se recomienda el uso de los puntos de corte de la IDF para sujetos no europeos e indistintamente los puntos de corte de la IDF o de la AHA/NHLBI para personas europeas hasta que se disponga de más datos.

† Los fármacos más frecuentemente usados para la hipertrigliceridemia y la reducción de c-HDL son los fibratos, el ácido nicotínico y los ácidos grasos ω -3 a altas dosis.

‡ La mayor parte de los pacientes con DMT2 tendrá el SM por los criterios definidos.

Según el *ATP III* los factores de riesgo principales para las ECV son la HTA, el tabaquismo, bajos niveles de c-HDL y altos de c-LDL y el envejecimiento. Junto a estos factores de riesgo principales existen unos factores de riesgos subyacentes y emergentes para la ECV. Como factores de riesgo subyacentes se consideran la obesidad abdominal, la inactividad física (sedentarismo) y el consumo de una dieta aterogénica (rica en ácidos grasos saturados (SFA)). Los factores de riesgo emergentes son niveles elevados de TG y moléculas de c-LDL pequeñas y densas, RI e intolerancia a la glucosa y un estado pro-inflamatorio y pro-trombótico, todos ellos relacionados directamente con el SM. Grundy y cols⁴⁹ describieron que el SM parece tener 3 causas principales para el desarrollo de ECV: la obesidad, la RI y una constelación de factores independientes como moléculas de origen hepático, vascular e inmunológico. Además, también tiene gran importancia la edad, el estado pro-inflamatorio y los cambios hormonales.

La etiología del SM es en gran medida desconocida aunque se encuentra relacionada con factores genéticos, epigenéticos, metabólicos y ambientales entre los que destaca la dieta y sobre todo el tipo de grasa consumida^{50, 51}.

2. INFLAMACIÓN

La inflamación se ha relacionado en los últimos años con el desarrollo y la progresión de la obesidad, la DMT2, las ECV y en definitiva con el SM.

2.1 Concepto de Inflamación

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa para el organismo ante las infecciones. Consta de barreras epiteliales y de células y proteínas circulantes que reconocen diferentes microorganismos o sustancias producidas durante la infección e inician la respuesta para eliminar dichos patógenos⁵². Algunas de estas células,

principalmente macrófagos y linfocitos, desencadenan una serie de señales que darán lugar a una respuesta inflamatoria (reacción inicial de la inmunidad innata).

En la respuesta inflamatoria se atraen leucocitos hacia la zona de infección y se activan, el proceso final es destruir los microorganismos patógenos al reclutar a las células efectoras activadas hacia los tejidos infectados. Los fenómenos de inflamación inducen cambios en el organismo, mediado por proteínas (citoquinas), que aumentan la capacidad del sistema inmunitario innato para erradicar la infección, además, si esta inflamación persiste puede provocar una lesión tisular sistémica.

2.2 Respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria representa una reacción precoz e inespecífica pero también altamente compleja del organismo frente a una variedad de agresiones como son las infecciones víricas, bacterianas o parasitarias, los traumatismos térmicos o mecánicos, radicales libres, la necrosis isquémica o el crecimiento neoplásico⁵³. Si el estímulo que desencadenó la respuesta inflamatoria persiste, estos cambios metabólicos pueden volverse crónicos. Por tanto, la respuesta inflamatoria puede ser transitoria o aguda, o bien, puede persistir en el tiempo dando lugar a una respuesta inflamatoria crónica.

Así, frente a una agresión se produce una reacción local con activación de macrófagos, monocitos y otras células productoras de citoquinas pro-inflamatorias. Estas citoquinas pueden actuar como mediadores desencadenando una reacción sistémica. Mientras que la reacción local se manifiesta en forma de inflamación aguda (leucocitosis o trombocitosis) la respuesta sistémica conlleva una serie de alteraciones neurológicas, hematopoyéticas, metabólicas y hepáticas acompañadas de modificaciones en la síntesis de diversas proteínas plasmáticas⁵⁴. Tras una respuesta inflamatoria se puede producir fiebre, alteraciones en la síntesis de diversas hormonas, un balance nitrogenado negativo o cambios en el perfil lipídico^{55,56}.

En el año 1996, Bone⁵⁷ identificó tres etapas en la respuesta inflamatoria: 1) Caracterizada por la producción local de mediadores inflamatorios en respuesta a la agresión o a la infección que actuarían de forma autocrina o paracrina iniciando la respuesta inflamatoria local. Activan el sistema monocito-macrófago, el sistema retículo endotelial, la cascada de coagulación y el sistema del Complemento, reestableciendo así la homeostasis y favoreciendo los procesos de reparación tisular. 2) Liberación de

pequeñas cantidades de mediadores a la circulación que actúan de forma endocrina, con fines protectores. Estimulan la síntesis de proteínas y factores de crecimiento a la vez que inducen la producción y liberación de antagonistas endógenos de la inflamación. 3) Caracterizada por una reacción sistémica masiva determinada por el paso de gran cantidad de mediadores inflamatorios a la circulación determinando una activación sostenida y generalizada de la cascada inflamatoria que puede comprometer la integridad de los órganos diana.

2.3 Inflamación y aterosclerosis

La arteriosclerosis es un término genérico que designa varias enfermedades en las que se produce engrosamiento y pérdida de elasticidad en la pared arterial. Dentro de ésta, la aterosclerosis constituye la enfermedad vascular más frecuente y más grave. Evidencias previas sugieren un papel importante de la inflamación en todos los procesos de la aterosclerosis^{58, 59}. Esta enfermedad puede considerarse como un proceso multifactorial, en el que intervienen factores ambientales y genéticos, y, es el resultado de una respuesta inflamatoria de la pared vascular a diferentes formas de lesión. Los factores desencadenantes pueden ser un aumento de los radicales libres, de moléculas de LDL oxidadas, de ácidos grasos libres (NEFAs) o una serie de patologías que se asocian con un mayor riesgo aterosclerótico como la HTA y la DMT2⁶⁰.

Existen numerosos estudios que han confirmado la estrecha relación existente entre la aterosclerosis y la inflamación. Brand y cols^{61, 62} mostraron la primera evidencia de que la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) podría tener implicaciones en la patogénesis de la aterosclerosis. En tales estudios se detectó la traslocación nuclear del NF-κB en las capas media e íntima de las regiones ateroscleróticas de la pared vascular, en células endoteliales, del músculo liso y en macrófagos, hecho que no fue detectado en las regiones no ateroscleróticas de las arterias. Además, en estudios realizados en ratones *knockout* para el receptor LDL se ha observado un desplazamiento al núcleo de p65 después de consumir una dieta aterogénica y tras inyecciones sistémicas del lipopolisacárido (LPS) en las regiones predispuestas a la enfermedad⁶³.

Por otro lado, se ha observado una asociación entre la interleuquina (IL)-6⁶⁴ y el factor de necrosis tumoral (TNF)-α,^{65, 66} y eventos cardiovasculares en sujetos sanos y con enfermedad coronaria. Además, estudios observacionales, transversales y

prospectivos realizados en hombres y mujeres sanas con uno o varios factores de riesgo cardiovascular han mostrado una asociación positiva entre elevadas concentraciones de marcadores inflamatorios y la progresión de la aterosclerosis^{67, 68, 69}.

2.3.1 Etapas de la lesión aterosclerótica

Las lesiones ateroscleróticas ocurren principalmente en las arterias musculares y elásticas de tamaño medio y constan de diferentes etapas: 1) estría grasa, 2) formación de lesiones avanzadas, 3) rotura de la placa y trombosis.

2.3.1.1 Estría grasa

La alteración funcional del endotelio es el primer paso en la formación de la lesión vascular y es regional. En las arterias existen sitios específicos, como ramas, bifurcaciones y curvaturas, que causan modificaciones características en el flujo sanguíneo⁷⁰, siendo la naturaleza de dicho flujo importante para determinar donde se va a formar la lesión dentro del árbol arterial^{71, 72}. El daño en el endotelio vascular puede ser provocado por diversos factores, como el tabaco, la DMT2, la hipercolesterolemia o la HTA, entre otros, y puede implicar una alteración en su capacidad de controlar el tránsito de sustancias al interior de la pared vascular, generando la disfunción endotelial.

Evidencias previas demuestran que los lípidos ejercen un papel fundamental en las fases tempranas de la aterosclerosis. Cuando la función del endotelio se altera, se produce la acumulación de lípidos en los sitios propensos a la lesión. Una vez que las LDL están ubicadas en el espacio subendotelial pueden sufrir modificaciones como la oxidación, la proteólisis y la agregación, lo que previene su retorno al lumen del vaso^{73, 74, 75}. Cuando estas partículas están mínimamente oxidadas tienen propiedades proinflamatorias⁷⁶, favoreciendo la entrada de monocitos^{77, 78, 79} y linfocitos T en la pared arterial. En la capa íntima arterial, los monocitos (principales células responsables de la respuesta inflamatoria dentro de la pared vascular) se activan y se diferencian en macrófagos, los cuales, junto a las células del músculo liso captan las partículas LDL dando lugar a las células espumosas⁸⁰, y los linfocitos T liberan citoquinas que amplifican la actividad inflamatoria. A través de estos procesos se forma la estría grasa.

2.3.1.2 Formación de lesiones avanzadas

Si esta primera respuesta inflamatoria no se neutraliza, se estimula la migración y la proliferación de las células del músculo, lo que da lugar a una lesión intermedia. Como

consecuencia, se produce un engrosamiento de la pared vascular que se compensa con la dilatación gradual del vaso, lo que permite a su diámetro quedar sin cambios⁸¹, fenómeno denominado remodelación vascular. Si el proceso inflamatorio continúa, resulta en un incremento en el número de macrófagos y linfocitos, los cuales emigran desde la sangre y se multiplican dentro de la lesión. La activación de estas células conduce a la liberación de enzimas hidrolíticas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento^{82, 83}, que pueden inducir un daño adicional y conducir a necrosis focal⁸⁴. Así, ciclos de acumulación de células mononucleares (CMNs), migración y proliferación de células del músculo liso, y formación de tejido fibroso provocan una lesión vascular en la cual se reconoce un centro lipídico y necrosis tisular, cubierto por una capa fibrosa, que se considera como una lesión avanzada.

2.3.1.3 Rotura de la placa y trombosis

Uno de los procesos que puede dar lugar a la rotura de la placa de ateroma es la pérdida de células presentes en la lesión mediante un proceso de apoptosis^{85, 86, 87}, dando lugar a una disminución de la resistencia de la pared celular. Otro proceso sería el desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular, que está mediado por señales inflamatorias⁸⁸. Si el estado pro-inflamatorio predomina, la cápsula fibrosa puede debilitarse y romperse, lo que liberaría el núcleo lipídico pro-trombótico en el lumen. La rotura de la cápsula fibrosa, que ordinariamente protege a la sangre del contacto con el núcleo lipídico, causa la mayoría de los síndromes coronarios agudos, resultando en la formación del trombo y en la expansión rápida de la lesión.

2.3.2 Células que intervienen en el proceso aterosclerótico

2.3.2.1 Endotelio

El endotelio representa la principal barrera entre los elementos celulares sanguíneos y la pared arterial. Participa en la homeostasis de la pared vascular regulando el tono vascular mediante la producción de moléculas vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Además, posee propiedades anti-trombóticas y transporta sustancias por endocitosis hacia el torrente sanguíneo o hacia la pared vascular, siendo en las uniones de las células donde se produce el transporte más activo en ambas direcciones⁸⁹.

2.3.2.2 Células musculares

Las células musculares lisas se localizan en la capa media de la pared arterial y su función es el mantenimiento de la elasticidad de la pared vascular. Durante el desarrollo de las placas ateroscleróticas, las células del músculo liso vascular migran a la íntima, donde proliferan y producen matriz extracelular. Las células del músculo liso activadas expresan receptores *scavenger*, a través de los cuales captan LDL modificadas⁹⁰ dando lugar a las células espumosas. Además, tienen capacidad de captar LDL agregadas mediante la proteína relacionada al receptor de la LDL⁹¹ y remanentes de quilomicrones por un mecanismo de endocitosis mediado, mayoritariamente, por el receptor LDL⁹².

2.3.2.3 Plaquetas

Cuando las plaquetas circulantes se ponen en contacto con las sustancias que inducen su adhesión, agregación y degranulación, contribuyen a la vasoconstricción y a la trombosis. Las plaquetas secretan el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento del fibroblasto, el factor de crecimiento epidérmico y el TNF- α . La presencia de la actividad plaquetaria en la lesión se expresa por la observación de microtrombos plaquetarios murales⁹³.

2.3.2.4 Células mononucleares

Los monocitos y los linfocitos tienen un papel clave tanto en la génesis como en la progresión de la lesión aterosclerótica. En una primera fase se produce la adhesión de los monocitos circulantes al endotelio y su migración a la capa íntima⁹⁴. Una vez en el espacio subendotelial, las LDL modificadas, diferentes moléculas producidas por los linfocitos T, las células endoteliales y las células del músculo liso estimulan la transformación de los monocitos en macrófagos. En concreto, los linfocitos T producen interferón (INF)- γ y el TNF- α , que activan a los monocitos, y factores estimuladores de la formación de colonias, como el factor estimulador de colonias granulo-macrofágicas, que estabilizan a los macrófagos y estimulan su proliferación⁹⁴.

Uno de los procesos claves en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas es la captación de las LDL modificadas por parte de los macrófagos, lo que los convierte en células espumosas⁹⁵. La interacción de las partículas LDL con los proteoglicanos de la íntima favorece los procesos de modificación y agregación de estas partículas. Las LDL agregadas que se han aislado de lesiones ateroscleróticas son captadas por los macrófagos en cultivo mediante endocitosis^{96, 97}, mientras que las LDL oxidadas son

captadas por los receptores *scavenger*^{98, 99}. Ninguno de estos mecanismos de captación de las LDL está regulado por la concentración intracelular de colesterol, por lo que se produce la acumulación de colesterol en los macrófagos y las células del músculo liso. Cuando se satura la capacidad de neutralizar el colesterol libre en el interior celular, las células espumosas se lisan formando los núcleos necróticos característicos de las placas ateroscleróticas¹⁰⁰.

Las placas, de localización normalmente excéntrica, son más vulnerables a sufrir rotura o ulceración en las zonas de unión a la pared¹⁰¹. Estas áreas presentan pocas células del músculo liso pero abundan los linfocitos T y los macrófagos activados. Los linfocitos T producen IFN- γ que inhibe la producción de colágeno basal y los efectos estimuladores del factor de crecimiento transformante- β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas y la IL-1¹⁰², sobre la síntesis de colágeno en las células del músculo liso. Además, los linfocitos T participan en los procesos inflamatorios que promueven la destrucción del colágeno existente en las placas. Estas células producen el ligando CD40 y la IL-1, que promueven la producción de enzimas que degradan el colágeno por parte de los macrófagos incluyendo los miembros de las metaloproteinasas (MMPs), entre las que se encuentran la MMP-9, MMP-8, y MMP-13^{103, 104}. La destrucción del tejido conectivo debilita la cápsula fibrosa de la placa y contribuye a su inestabilidad y rotura¹⁰⁵. Estudios previos han demostrado un incremento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en las CMNs de sujetos obesos^{106, 107}.

Los linfocitos T también promueven la trombogenicidad del núcleo lipídico a través de la expresión del ligando CD40, el cual estimula la producción por parte de los macrófagos del factor tisular, un potente procoagulante que, una vez expuesto al factor VII en la sangre, inicia la cascada de la coagulación¹⁰⁸.

En la **Figura 1** se representan las células que intervienen en el proceso inflamatorio dentro de la placa de ateroma:

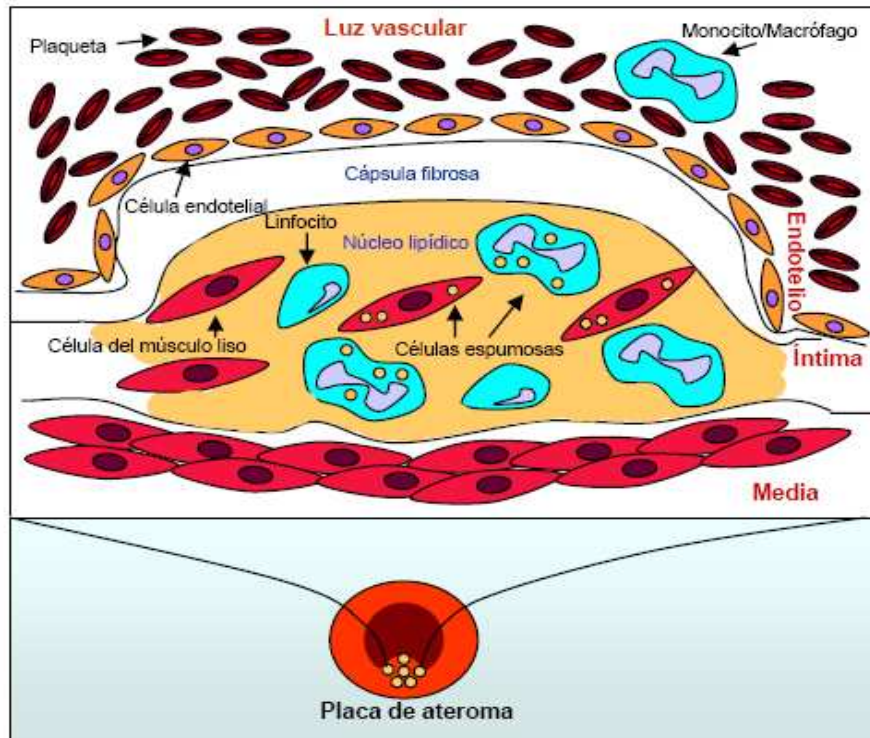


Figura 1. Células que intervienen en el proceso inflamatorio dentro de la placa de ateroma (Jiménez-Gómez Y, no publicado).

2.4 NF- κ B

El NF- κ B, es un factor de transcripción nuclear involucrado en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, la apoptosis y la proliferación celular. Está constituido por distintas subunidades: p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). Estas subunidades pueden formar combinaciones de homodímeros o heterodímeros, siendo el heterodímero p50/p65 el complejo más común^{109, 110}. Todas las subunidades comparten una secuencia en la región N-terminal de ~300 aminoácidos denominada dominio de homología Rel, la cual media su unión con el ácido desoxirribonucleico (ADN), la dimerización, la translocación nuclear y la interacción con los inhibidores de NF- κ B¹¹¹. Las subunidades p65, Rel B y c-Rel actúan como activadores de la transcripción, mientras que p50 y p52 están involucrados en la regulación de dicha función¹¹².

Ante ciertos estímulos como un aumento de los radicales libres, la radiación ultravioleta, infecciones víricas y bacterianas, moléculas de LDL oxidadas o citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1 β), NF- κ B puede activarse y regular la expresión de diversas citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión celular, inmunoreceptores o enzimas inflamatorias, todas ellas implicadas en procesos de inflamación, aterosclerosis

o RI^{113, 114}. La activación de este factor está controlada por la familia de inhibidores IκB, que se unen a los dímeros de NF-κB y evitan su traslocación al núcleo. Los inhibidores de NF-κB incluyen IκB-α, IκB-β, IκB-ε, bcl-3, p105, p100 e IκB-γ. La interacción mejor caracterizada entre Rel-IκB es la que sucede entre IκB-α y el heterodímero p50/p65. IκB-α está asociado con la activación transitoria de NF-κB, mientras que el IκB-β está asociado con la activación sostenida y se debe a que NF-κB induce la expresión de IκB-α¹¹⁵ y no puede inducir la expresión de IκB-β¹¹⁶.

NF-κB puede ser activado a través de dos rutas; la clásica y la alternativa. La liberación del factor comienza con la activación de quinasas de IκB (IKKs). La actividad de IKK reside en un complejo de elevado peso molecular con 2 subunidades catalíticas, IKKα/IKK1 e IKKβ/IKK2, y una subunidad reguladora IKKγ/NEMO¹¹⁷.

La activación de los complejos IKK está mediada por la fosforilación de IKKα, preferiblemente a través de las quinasas inductoras de NF-κB (NIK), y de IKKβ mediante miembros de la familia de las MAP3Ks (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*)^{118, 119}.

En la ruta de activación clásica, la traslocación al núcleo de NF-κB se inicia con la fosforilación de serinas en IκB situadas en la región N-terminal e involucra a las subunidades IKKβ e IKKγ. La activación del complejo IKK da lugar a la fosforilación de los aminoácidos Ser-32 y Ser-36 en IκB-α y las Ser-19 y Ser-23 en el caso de IκB-β. Una vez que los IκBs están fosforilados, son reconocidos por el complejo β-TrCP-SCF (o el complejo ligasa ubiquitina E3^{IκB}) resultando en la poliubiquitinación de IκB, su degradación por el proteosoma 26S y la traslocación nuclear de NF-κB^{117, 120}. Monaco y cols¹¹⁰, demostraron que esta ruta era la que se activaba en la aterosclerosis humana, dando lugar a la expresión selectiva de mediadores pro-inflamatorios y pro-trombóticos de la enfermedad.

En la ruta de activación alternativa se produce la activación de NF-κB mediante NIK e IKKα. En respuesta a estímulos tales como la linfotóxina β, la NIK activa a la IKKα, induciéndose el procesamiento mediado por el proteosoma de p100 con la translocación nuclear del dímero p52-RelB. Se ha sugerido que dicha ruta tiene un papel fisiológico en las respuestas mediadas por las células B y la inmunidad humoral adaptativa^{121, 122}.

Una vez en el núcleo, el dímero NF-κB se une a secuencias consenso decaméricas denominadas κB (5'GGGRNNYYCC-3', donde R indica A o G, Y indica C o T y N

indica cualquier nucleótido), o motivos similares a κB (5'-HGGARNYYCC-3', donde H indica A, C o T, R indica A o G, Y indica C o T y N indica cualquier nucleótido)¹²³.

En la **Figura 2** se muestra la ruta de activación clásica de NF- κB :

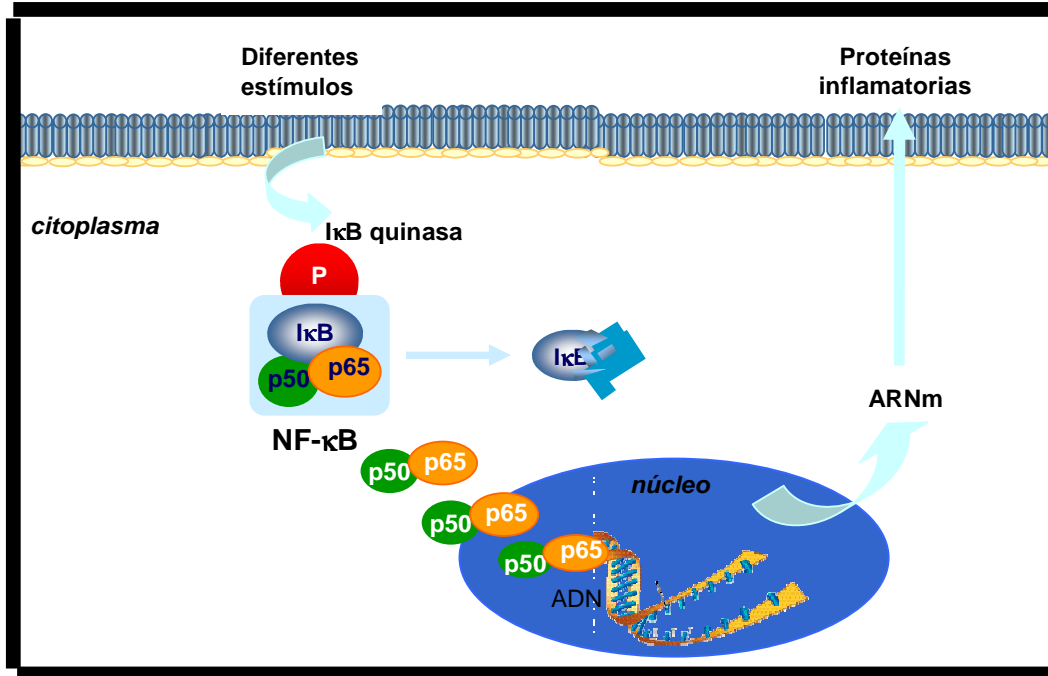


Figura 2. Ruta de activación clásica de NF- κB (Pérez-Martínez P, no publicado).

2.5 Citoquinas

Son proteínas sintetizadas en la inmunidad innata y en la específica como respuesta a estímulos inflamatorios o antigénicos. Pueden actuar de forma autocrina, paracrina o endocrina, sirven como factores de crecimiento para muchos tipos celulares y su producción excesiva conduce a situaciones patológicas, de ahí su implicación en enfermedades inflamatorias, inmunes e infecciosas¹²⁴. Fundamentalmente son producidas por los linfocitos y los macrófagos activados, sin embargo, también pueden ser sintetizadas por células polimorfonucleares, endoteliales y epiteliales, por adipocitos o por miocitos.

Las citoquinas inician su acción uniéndose a receptores específicos en la célula diana. Regulan las respuestas inmunes e inflamatorias y son producidas por diferentes células. Las citoquinas actúan sobre diversos tipos celulares y sus acciones pueden ser redundantes. Además, poseen múltiples efectos sobre la misma célula diana e influyen en la síntesis y acción de otras citoquinas⁵².

Dentro de esta sección describiremos las citoquinas: IL-1 β , TNF- α , IL-6, proteína quimioatrayente de monocitos (MCP)-1, IL-8 y factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).

2.5.1 IL-1 β

La familia de la IL-1 está formada por 11 proteínas (de IL-1F a IL-11F) codificadas por 11 genes diferentes. Los genes de la mayoría de los miembros de la superfamilia de IL-1 están localizados en el cromosoma 2. Se conocen tres agonistas de la IL-1 (IL- α , IL-1 β e IL-18) y un antagonista (IL-1Ra), el cual se une a los receptores de IL-1 sin producir transducción de una señal¹²⁵. La IL-1 β es sintetizada principalmente por macrófagos activados como un precursor de 31 kDa y es procesada proteolíticamente en su forma activa por proteasas celulares específicas¹²⁶. Otras fuentes celulares incluyen neutrófilos, queratinocitos o células endoteliales^{126, 127, 128, 129}.

La producción de la IL-1 puede estar inducida por el LPS, diversas citoquinas como el TNF, la IL-2, la IL-3, la IL-12, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, el factor estimulante de colonias de macrófagos o el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Otros inductores pueden ser el plasminógeno, la trombina, las moléculas de LDL oxidadas, la PCR, o bien, algunos tipos de medicamentos¹²⁷. La IL-1 es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, y está involucrada en diversas actividades celulares, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis.

La potente actividad de la IL-1 β se limita a tres niveles principales: 1) la síntesis y liberación, 2) los receptores de membrana y 3) la transducción de una señal intracelular. Esta vía de señalización incluye mecanismos positivos y negativos de retroalimentación que terminan por amplificar o inhibir la señal de esta citoquina. En respuesta a la unión del ligando con el receptor, se producen una serie de eventos de fosforilación y ubiquitinación que confluyen en la activación de diversos factores de transcripción, como es el caso de NF- κ B, dando lugar al inicio de la respuesta inflamatoria. Hay que destacar que la mayoría de los componentes intracelulares que participan en la respuesta celular a IL-1 también median las respuestas a otras citoquinas, a los receptores tipo Toll y a diversas formas de estrés citotóxico.

Por otro lado, al igual que el TNF- α , la IL-1 β favorece la síntesis de IL-6 y estimula la actividad ciclooxigenasa. Por tanto, la acción de esta citoquina permite amplificar y

perpetuar la respuesta inflamatoria. Otras de las funciones que comparte con el TNF- α es la estimulación de la producción de ciertas MMPs y la inhibición de algunos de sus inhibidores (TIMPs)¹²⁶.

2.5.2 TNF- α

La familia del TNF consta de al menos 18 miembros distintos que exhiben del 15-25% de homología en su secuencia de aminoácidos. El TNF- α es una citoquina primaria que se expresa como una proteína transmembrana en la superficie celular con un tamaño de 25 kDa, la cual se ensambla como un homotrímero. Un fragmento de 14 kDa de cada subunidad puede ser cortado proteolíticamente de la membrana plasmática para producir una forma soluble que circula como un homotrímero. Esta proteína actúa vía los receptores de superficie celular p55 y p75, los cuales median todas las acciones conocidas de dicha citoquina. Los monocitos y los macrófagos son los principales productores de TNF- α , pero también puede ser producido por otros tipos celulares como los linfocitos T, las células *natural killer*, las musculares lisas, las endoteliales y algunas células tumorales¹³⁰.

Los macrófagos activados secretan TNF- α que activa el endotelio y aumenta la permeabilidad vascular, lo que conduce a un incremento en la entrada de IgG, del complemento y de células a los tejidos, y un drenaje elevado de fluido a los ganglios linfáticos. Los efectos sistémicos de esta citoquina son fiebre, movilización de metabolitos y shock. Por otro lado, el TNF- α induce la contención local de la infección. Sin embargo, una vez que la infección se extiende por el torrente sanguíneo, TNF- α es liberado de forma sistémica provocando vasodilatación y pérdida de volumen plasmático debido al aumento de la permeabilidad vascular, lo cual conduce al shock. En el shock séptico, el TNF- α favorece la formación de coágulos en los vasos pequeños y el consumo masivo de proteínas de la coagulación.

Por otro lado, el TNF- α puede disminuir la actividad de la óxido nítrico sintasa 3 u óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3 o eNOS), dando lugar a una disminución de la expresión de los genes relacionados con la fosforilación oxidativa mitocondrial, el aumento del EO celular y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, está descrito que el TNF- α estimula a las células endoteliales a producir moléculas similares al factor de crecimiento derivado de plaquetas, agente mitogénico que induce la proliferación de las células del músculo liso vascular¹³¹, favoreciendo la

aterosclerosis. Este hecho se confirma con el estudio realizado por Branen y cols⁶⁹ donde demuestran que el TNF- α está involucrado en la progresión de la aterosclerosis. Además, al igual que ocurre con la IL-1 β , el TNF- α favorece la síntesis de IL-6¹³² y estimula la actividad ciclooxigenasa. Por tanto, la acción de esta citoquina permite amplificar y perpetuar la respuesta inflamatoria. Otras de las funciones que comparte con la IL-1 β es la estimulación de la producción de ciertas metaloproteasas (MMPs)¹³³ y la inhibición de algunos de sus inhibidores (TIMPs)¹³⁴. Además, TNF- α influye en el metabolismo lipídico¹³⁵, regula la síntesis de fibrinógeno y del Factor VII¹³⁶ y favorece un estado pro-trombótico.

2.5.3 IL-6

La IL-6 es una citoquina de aproximadamente 26 kDa que es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos, algunas células T activadas y otros tipos de células en respuesta a la IL-1 y, en menor medida, al TNF. La forma funcional de la IL-6 es como homodímero y regula la respuesta humoral y celular, además de desempeñar un papel clave en la inflamación y el daño tisular¹³⁷.

El receptor de la IL-6 está compuesto por dos glicoproteínas, una proteína de unión a ligando (IL-6R α), y una subunidad de traducción de señal (IL-6R β o gp130). El IL-6R α se une a la citoquina con baja afinidad, mientras que el IL-6R β se requiere para la unión con alta afinidad entre el IL-6R α y la IL6^{138, 139}. El IL-6R α soluble unido a la IL-6 es capaz de interactuar con la subunidad de traducción de señal en la superficie de las células diana¹⁴⁰.

Las dos acciones mejor descritas de la IL-6 son: 1) Estimular a los hepatocitos a sintetizar varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuye a la respuesta de fase aguda. De hecho, dicha citoquina es un estímulo central para tal respuesta¹⁴¹. 2) Estimular la diferenciación y maduración de las células B¹⁴².

A parte de las acciones descritas *in vivo*, los estudios *in vitro* sugieren que la IL-6 puede servir como co-estimulador de las células T y de los timocitos. Además, esta citoquina también actúa junto a otras como cofactor de crecimiento de las células madre hemopoyéticas en la médula ósea¹⁴³ e induce la proliferación de las células del músculo liso.

La IL-6 tiene un papel central en la respuesta inflamatoria y se expresa en lesiones ateromatosas humanas, encontrándose en grandes cantidades en placas

ateroscleróticas¹⁴⁴. Se sabe que esta citoquina puede estimular la agregación plaquetaria y la expresión del factor tisular, incrementar los receptores de LDL en macrófagos y aumentar las concentraciones en plasma del fibrinógeno, el PAI-1 y la PCR¹⁴⁵. Además, regula la expresión de diversas citoquinas como IL-1 y TNF- α ^{146, 147} y también puede aumentar la síntesis de la IL-2¹⁴⁸.

2.5.4 Quimioquinas

Las quimioquinas son citoquinas quimiotácticas que median la maduración, la diferenciación y la migración de las células involucradas en la respuesta inflamatoria. Ejercen sus funciones a través de su unión a receptores acoplados a proteína G en la superficie de sus células diana^{149, 150}. Una vez activados, se desencadenan una serie de reacciones que dan lugar a la formación de inositol trifosfato, a la liberación de calcio intracelular, y a la activación de la proteína quinasa C¹⁵¹.

Las quimioquinas son proteínas de pequeño tamaño, con pesos moleculares que oscilan entre 8 y 12 kDa. Atendiendo a la disposición de las dos cisteínas más cercanas al extremo N-terminal, las quimioquinas se distribuyen en varias subfamilias:

1) Subfamilia α (CXC), 2) Subfamilia C, 3) Subfamilia CX3C y 4) Subfamilia β (CC).

2.5.4.1 MCP-1

La MCP-1 es una quimioquina que pertenece a la subfamilia β (CC) (CCL2), cuyos componentes presentan dos residuos de cisteína conservados adyacentes en la posición N-terminal¹⁵². La MCP-1 se expresa en los monocitos, las células del músculo liso, las células endoteliales, hepáticas y sinoviales, los fibroblastos, los monocitos cardiacos y ciertas líneas de células tumorales. Varios estímulos inducen la producción de la MCP-1¹⁵³ como las partículas LDL mínimamente modificadas¹⁵⁴ y citoquinas como la IL-1, el TNF, el INF- γ ¹⁵⁵ y el factor estimulador de colonias de macrófagos¹⁵⁶. Esta quimioquina ejerce sus efectos mediante su interacción con el receptor de quimioquina-2 en numerosos tipos celulares entre los que se encuentran los monocitos, que lo expresan de forma constitutiva y, las células T, que sólo lo expresan después de ser activadas¹⁵⁷.

Una de las funciones de la MCP-1 es regular la migración e infiltración de los monocitos y otras células mononucleares en los sitios de inflamación¹⁵⁸. En el desarrollo de la aterosclerosis, esta quimioquina funciona reclutando a los monocitos en la capa subendotelial¹⁵⁹, además, en presencia de factores de riesgo ateroscleróticos, la expresión de la MCP-1 se incrementa en las lesiones¹⁶⁰. En este sentido, se ha descrito

que la degradación enzimática y no oxidativa de la LDL da lugar a una partícula que induce la liberación masiva de la MCP-1 por parte de los macrófagos¹⁶¹ y que en pacientes hipercolesterolémicos se aumenta la expresión del receptor de quimioquina-2 en los monocitos al compararlos con los normocolesterolémicos¹⁶².

2.5.4.2 IL-8

La IL-8 es una quimioquina que pertenece a la subfamilia CXC (CXCL8), cuyos miembros presentan dos residuos cisteína en la posición N-terminal separados por un residuo no conservado. El gen de la IL-8 y otros diez miembros de esta familia de quimioquinas están localizados en el cromosoma 4. La IL-8 se expresa fundamentalmente en monocitos y fibroblastos.

Una de las funciones de la IL-8 es regular la migración e infiltración de las células polimorfonucleares (neutrófilos y basófilos) al endotelio vascular mediante la activación de integrinas de la pared. Además, puede regular la adhesión de las células T al endotelio, aunque con respecto a los monocitos el papel de esta quimioquina no queda claro¹⁶³. La IL-8 es uno de los mayores mediadores de la respuesta inflamatoria, y también es un potente factor angiogénico. Al igual que ocurre con la IL-6, la producción de la IL-8 está regulada por la IL-1 β y el TNF- α ¹⁶⁴.

2.5.5 MIF

El MIF es una linfoquina de unos 12-13 kDa secretada principalmente por los linfocitos T activados, aunque también pueden expresar MIF los macrófagos, las células del músculo liso o las células de órganos como el hígado, el corazón, el tejido adiposo, el bazo, el riñón y la hipófisis, entre otros^{165, 166}.

Originalmente se describió como un factor soluble expresado por las células T en las respuestas de hipersensibilidad retardada que ejercía un efecto inhibitor en la migración de los macrófagos¹⁶⁷. Posteriormente se describió que presentaba diversas funciones biológicas como la activación de los macrófagos, el aumento de su adherencia o la fagocitosis, también posee actividad tumoral^{168, 169, 170} e induce una mayor producción de óxido nítrico (ON)^{171, 172}. Se considera que el MIF es clave en la respuesta inflamatoria local y sistémica y en la respuesta inmune¹⁷³. Además, posee un papel esencial en la proliferación y diferenciación celular.

Por otro lado, se sabe que el MIF se libera por los monocitos/macrófagos en respuesta a glucocorticoides, lo que daría lugar a una disminución del efecto

inmunosupresor de los mismos en la producción de otras citoquinas pro-inflamatorias. Este mecanismo podría estar implicado en la aceleración de la aterosclerosis y, por tanto, en la aparición de las ECV. De acuerdo con esta afirmación, se ha comprobado que el MIF es un mediador de la inflamación y que en los macrófagos puede estimular la expresión de diversas citoquinas como la (IL-1 β , el TNF- α o la IL-6)^{174, 175}. Además, el MIF puede actuar sobre las células a través de un receptor específico, activando una cascada intracelular que incluye la fosforilación de las proteínas Erk y MAP quinasa, la regulación de diversas MMPs, y la expresión de c-jun, c-fos e IL-1¹⁷⁶.

2.6 Metaloproteinasas

Las MMPs son una familia de proteasas encargadas del remodelado de la matriz extracelular. La matriz extracelular proporciona la plataforma estructural y funcional de los vasos sanguíneos, por lo que las alteraciones en su síntesis y/o degradación serán clave en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, el remodelado vascular y la rotura de la placa^{177, 178}. Las MMPs constituyen una familia con más de 20 enzimas proteolíticas. La estructura común a todas las MMPs consiste en una secuencia de aminoácidos con un pro-dominio y con un dominio catalítico con átomos de Zn⁺⁺ y Ca⁺⁺¹⁷⁹. El pro-dominio está constituido por un péptido-sígnal y por un pro-péptido. La mayoría de las MMPs tienen dominios adicionales, como una región para la hemopexina y otra para la fibronectina¹⁸⁰. Estos dominios son importantes para el reconocimiento del sustrato y para su unión específica con los inhibidores.

La mayoría de las MMPs tienen bajos niveles de expresión en tejidos no lesionados. La actividad de las MMPs está regulada a múltiples niveles¹⁷⁹: 1) la síntesis de las MMPs está controlada a nivel transcripcional en respuesta a la acción de oncogenes, factores de crecimiento, citoquinas y hormonas sobre las regiones promotoras del gen; 2) las MMPs son secretadas como zimógenos inactivos que requieren un proceso proteolítico para liberar la zona catalítica. La activación se consigue al separar el pro-péptido del resto de la cadena de las MMPs. Este proceso se consigue a través de la acción de las MMPs o por otras proteasas. 3) la regulación de la actividad de las MMPs se consigue a través del bloqueo de la actividad enzimática mediado por inhibidores tisulares, de los que se conocen cuatro miembros (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4), que difieren en sus patrones de expresión y en su afinidad por los diversos tipos de MMPs. La pérdida de este complejo control está implicado en diversas enfermedades

como el cáncer, la artritis, la nefritis, las úlceras y fibrosis, el desarrollo de aneurismas o la arteriosclerosis y son factores fundamentales en la inestabilidad de la placa ateromatosa^{181, 182, 183}.

Dependiendo de la especificidad del sustrato, la similitud de aminoácidos y los módulos de secuenciación identificables, la familia de las MMPs se puede clasificar en cuatro subclases¹⁸⁴: 1) Colagenasas, 2) Estromelinas, 3) Gelatinasas y 4) MMPs tipo membrana.

2.6.1 MMP-9

La MMP-9 pertenece a la subclase Gelatinasa de las MMPs. Se produce en queratinocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares, células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos y una gran variedad de células tumorales¹⁸⁴. Esta MMP tiene un peso molecular de 92 kDa. La MMP-9 actúa sobre colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, gectina-3, agregán, hialuronidasa-versicán, proteoglicanos unidos a proteínas, fibronectina, entactina, osteonectina, α 1-antitrombina, IL-1 β y plasminógeno. Puede ser activada por las MMPs 2, 3 y 13, la plasmina y la elastasa.

Se sabe que la región promotora del gen de la MMP-9 contiene zonas de unión para el NF-kB, poliovirus A unido a proteína 3 y elementos de respuesta a ésteres de forbol. Algunas citoquinas (TNF- α , IL-1 β o IL-6) estimulan las zonas de unión de la región promotora del gen y controlan la síntesis de la MMP-9¹⁸⁵. De la misma forma, existen citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10 que pueden frenar la transcripción de la MMP-9 y de otras MMPs.

La MMP-9 participa en varias etapas de la aterosclerosis. Las células espumosas aumentan la expresión de la MMP-9 en respuesta a lipoproteínas oxidadas y citoquinas, facilitando la migración de las células musculares¹⁸⁶. Esta MMP puede ser un mediador de la enzima NADPH-oxidasa dependiente de la producción de ROS en los procesos ateroscleróticos, además, estudios previos sugieren que la actividad de la NADPH oxidasa incrementa significativamente después de un desayuno hipercalórico¹⁸⁷. Por otro lado, se ha observado un incremento en los niveles de MMP-9 con disminución de la actividad TIMP en pacientes diabéticos con enfermedad coronaria y en sujetos con aterosclerosis prematura¹⁸⁸.

2.7 Adipoquinas

Las adipoquinas son proteínas secretadas por los adipocitos y los macrófagos del tejido adiposo. En este grupo se incluyen la adiponectina, la resistina, la leptina, la omentina o la visfatina, entre otras, y también, citoquinas como la IL-6, la IL-1 β o el TNF- α . La función de las adipoquinas puede ser autocrina, paracrina y endocrina¹⁸⁹. Modulan la función vascular, la regulación inmune y el metabolismo de los adipocitos, asimismo, median el metabolismo de la glucosa, los lípidos y la respuesta inflamatoria.

Por todo esto, las adipoquinas desempeñan un papel en la patogénesis del SM y en sus características clínicas como la obesidad, la hipertensión, la dislipemia y la hiperinsulinemia, todas ellas relacionadas directamente con el desarrollo de ECV^{190, 191, 192}.

Dentro de esta sección nos centraremos en la adiponectina, la resistina y la leptina.

2.7.1 Adiponectina

La adiponectina es una adipoquina de ~30 kDa codificada por el gen APM1 (3q27) y expresada casi exclusivamente en el tejido adiposo blanco. Esta adipoquina puede sufrir modificaciones postraduccionales de hidroxilación y glicosilación produciendo trímeros, hexámeros o isoformas de alto peso molecular¹⁹³.

La adiponectina tiene dos receptores: 1) un receptor con dos proteínas transmembrana similares y con homología a receptores de unión a la proteína G, conocidos como adipoR1 y adipoR2. 2) El segundo es la T-cadherina muscular, que funciona como receptor de alta afinidad para la adiponectina globular. Existen receptores para adiponectina en hígado, músculo esquelético, células β y cerebro. Diversos estudios han comprobado que la adiponectina puede tener efectos divergentes y que éstos dependen de sus concentraciones circulantes, de las propiedades de sus diferentes isoformas y también de la expresión tejido específico de los subtipos de sus receptores¹⁹⁴.

De forma contraria al resto de adipoquinas, los niveles de adiponectina tienen una correlación inversa con la masa corporal, la RI y la inflamación^{195, 196}. El TNF- α y la IL-6 son potentes inhibidores de su expresión y de su secreción¹⁹⁷. Entre las funciones de la adiponectina se encuentran la inhibición de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales, la transformación de macrófagos en células espumosas y la activación de células endoteliales. Además, esta adipoquina favorece la producción de ON ya que incrementa la actividad de la enzima eNOS¹⁹⁸. Ejerce también un efecto

sinérgico con la leptina para mejorar la sensibilidad a la insulina¹⁹⁹. Dentro de sus efectos metabólicos se encuentran una mejora de la sensibilidad a la insulina en el hígado, un descenso del flujo de los NEFAs, un incremento de la oxidación de las grasas y una reducción de la liberación de glucosa hepática. En el músculo, la adiponectina estimula el uso de glucosa y la oxidación de los ácidos grasos¹⁹⁴.

Por otro lado, bajos niveles de adiponectina se asocian con la aparición de HTA, sobrepeso, obesidad, hipertrigliceridemia y disminución en los niveles de HDL, alteraciones todas ellas características de enfermos con SM. Además, los niveles de adiponectina se encuentran disminuidos en sujetos con DMT2 o con RI²⁰⁰. En un estudio llevado a cabo por Yang y cols²⁰¹ comprobaron que en sujetos obesos existía una menor expresión del gen de la adiponectina si lo comparaban con la expresión de esta adipoquina en sujetos delgados.

2.7.2 Resistina

La resistina es una adipoquina de 94 aminoácidos producida fundamentalmente por los adipocitos y macrófagos del tejido adiposo, aunque también se ha detectado expresión de resistina en células de otros órganos como el pulmón o el músculo esquelético. Existen varias formas multiméricas de resistina que circulan en el plasma y su acción celular parece depender de las formas con menor peso molecular, que son dímeros unidos por un puente disulfuro.

La expresión de resistina se encuentra incrementada en el tejido adiposo de obesos y, varios estudios han confirmado la relación de esta adipoquina con la obesidad y la DMT2. Además, la resistina disminuye la actividad de la enzima eNOS²⁰², induce la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales²⁰³ y se relaciona de manera directa con la disfunción endotelial y la HTA.

Por otro lado, existen estudios que muestran que la resistina tiene un papel importante en las enfermedades inflamatorias²⁰⁴, induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-12 por los macrófagos y bloquea los efectos anti-inflamatorios de la adiponectina, lo que puede contribuir a la RI, obesidad y otras complicaciones asociadas²⁰⁵.

2.7.3 Leptina

La leptina es una adipoquina de 167 aminoácidos con una secuencia señal de 21 aminoácidos que se escinde antes de secretarse al torrente circulatorio. La proteína

madura de 146 aminoácidos presenta una estructura terciaria similar a la de la IL-2. La expresión de esta adipocina puede producirse en células del músculo esquelético, del hígado o de la pared gástrica, pero sobre todo su expresión es a nivel de tejido adiposo y específicamente en los adultos a nivel de los depósitos subcutáneos.

La leptina desempeña un papel importante como regulador negativo del apetito ya que provee una señal de saciedad al hipotálamo²⁰⁶. La secreción de leptina es pulsátil y está modulada por la insulina entre otras hormonas²⁰⁷. Además, eleva el tono simpático, mediado por la tirotrina, con aumento de la tensión arterial así como aumento de la angiogénesis, la agregación plaquetaria y la producción del PAI-1. También aumenta la lipólisis, inhibe la lipogénesis, y estimula la termogénesis en el tejido adiposo marrón. Resulta paradójico el hecho de que la leptina esté sobreexpresada en el tejido adiposo de la mayoría de los obesos, lo que ha llevado al desarrollo del concepto de resistencia a la leptina²⁰⁸, fenómeno implicado en las complicaciones cardiovasculares relacionadas con la obesidad.

En la inflamación, la leptina actúa directamente sobre los macrófagos aumentando su actividad fagocítica y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. También se ha involucrado en la inflamación asociada con la aterosclerosis y el SM¹⁹². La leptina induce un efecto sensibilizador de insulina al promover la oxidación de los NEFAs y la reducción de la acumulación de la grasa ectópica en tejidos no adiposos^{209, 210}.

2.8 Ácidos grasos libres no esterificados

El tejido adiposo es el principal reservorio de energía del organismo. Esta energía se almacena en los adipocitos en forma de TG, cuya principal fuente procede de los quilomicrones y las VLDL circulantes. Durante la lipólisis, los TG se hidrolizan hasta NEFAs y glicerol por la acción de la lipasa sensible a hormonas (LSH). Los NEFAs se liberan a la circulación por el tejido adiposo blanco en condiciones de ayuno como fuente de energía para la mayoría de los tejidos, con acciones adicionales en la homeostasis de la glucosa. Los bajos niveles de insulina en el estado de ayuno, combinados con una elevación de hormonas como el glucagón, la adrenalina y los corticosteroides, promueven la producción hepática de glucosa.

Por otro lado, después de la ingesta de una comida se produce un aumento en los niveles de glucosa y de NEFAs, por lo que las células β pancreáticas secretan insulina, la cual promueve el depósito de glucosa en el tejido adiposo y en el músculo, e inhibe la

producción de glucosa por el hígado, por supresión de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis.

En individuos obesos, la actividad lipolítica del tejido adiposo es mayor y los niveles de NEFAs y de insulina se encuentran elevados constantemente en la circulación. Este hecho origina que la función de la insulina sea defectuosa y no pueda inhibir la acción de la LSH, por lo que la actividad lipolítica continúa²¹¹. Si los niveles elevados de NEFAs se mantiene de forma constante, disminuye la sensibilidad a la insulina y se induce la expresión de la proteína desacopladora (UCP)-2, la cual desciende el potencial de membrana mitocondrial, la síntesis de ATP y la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas²¹², fenómeno que conllevaría a una reducción de la captación de glucosa en músculo y en grasa, y una disminución de la producción hepática de glucosa^{213, 214}.

Por otro lado, un incremento en los niveles circulantes de NEFAs conlleva un aumento de la absorción de los mismos por parte del tejido adiposo dando lugar a un acúmulo de moléculas como el diacilglicerol que disminuye la sensibilidad a la insulina por la fosforilación en serina del sustrato del receptor de la insulina, a través de la activación de la proteína kinasa C²¹⁵. Esta fosforilación en serina afecta a la fosforilación en tirosina del sustrato del receptor de la insulina y por tanto se produce una alteración en la vía de señalización de la insulina.

Santomauro y cols²¹⁶ mostraron que bajos niveles de NEFAs en individuos obesos pero no diabéticos llevaron a la normalización, en el músculo esquelético, de la captación de glucosa mediada por la insulina. Además, en sujetos obesos y con DMT2 se comprobó que la sensibilidad a la insulina mejoraba cuando los niveles de NEFAs disminuían.

3. ALTERACIONES METABÓLICAS DEL SÍNDROME METABÓLICO Y SU RELACIÓN CON LA INFLAMACIÓN

3.1 Inflamación, aterosclerosis y Síndrome Metabólico

La aterosclerosis y la inflamación se encuentran estrechamente relacionadas^{58, 59}. Se ha considerado a la aterosclerosis como la consecuencia fisiopatológica primaria del SM, además, se ha demostrado la existencia de una inflamación sistémica de bajo grado

en pacientes con SM que está implicada en la obesidad, la RI, la dislipemia o la HTA y en el desarrollo de la DMT2^{217, 218, 219, 220}, de tal forma que, aunque en los criterios de diagnóstico del SM del *ATP III*^{32, 49} no se considera el perfil inflamatorio, las evidencias sugieren que en los pacientes con SM subyace un estado pro-inflamatorio y pro-trombótico crónico, por tanto, se considera la inflamación como parte del SM.

La inflamación a nivel celular podría ser descrita como un incremento en la actividad nuclear del NF-kB acompañada por un descenso en la expresión de IκB-α e IκB-β¹⁰⁷. Se considera que muchos de los factores de riesgo cardiovascular están relacionados con la inflamación crónica²²¹. Los macrófagos activados se encuentran tanto en las lesiones ateroscleróticas como en el tejido adiposo y secretan gran cantidad de citoquinas pro-inflamatorias¹⁰⁶.

Estudios observacionales han descrito que los sujetos con SM presentan elevadas concentraciones de moléculas pro-trombóticas y pro-inflamatorias como fibrinógeno, PAI-1, PCR, IL-6, o TNF-α, que puede inducir la secreción de diferentes adipoquinas en el tejido adiposo²²², así como bajas concentraciones de adiponectina^{217, 218, 219}. La disminución plasmática de adiponectina promueve la adherencia de monocitos al endotelio dando lugar a uno de los eventos clave en el desarrollo de la aterosclerosis^{223, 224}. Evidencias previas demuestran que la cantidad y el tipo de grasa de la dieta, sobre todo una alta ingesta de SFA, inducen procesos inflamatorios y contribuyen al desarrollo de SM ya que aumentan la actividad del NF-kB, y, por tanto la expresión de numerosos genes pro-inflamatorios^{47, 225}. Además, altas concentraciones circulantes de TNF-α, IL-6 y PCR se han asociado con el desarrollo de HTA, de alteraciones en el metabolismo de lípidos y de glucosa, así como con una disfunción del endotelio y una inflamación vascular^{220, 226, 227}. Robert y cols²²⁸ observaron bajos niveles en plasma de MMP-9 en sujetos con SM tras el consumo de una dieta saludable y la realización de ejercicio físico.

3.2 Inflamación, obesidad y Síndrome Metabólico

La obesidad se define generalmente como un exceso de adiposidad corporal, con un IMC≥30. Dentro de la obesidad, la obesidad abdominal es una de las principales características del SM y se caracteriza por la presencia de adipocitos activados y por la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo. Así pues la obesidad abdominal,

normalmente de tipo visceral por considerarse metabólicamente más activa^{229, 230}, se considera un factor de riesgo cardiometabólico asociado a la inflamación²²⁰.

La obesidad fue etiquetada como epidemia mundial por la OMS en el año 1998. El aumento mundial del sobrepeso y la obesidad es atribuible a factores genéticos y moleculares, junto con circunstancias coadyuvantes y desencadenantes ambientales y conductuales²³¹. Entre los factores que intervienen en su patogenia se encuentran modificaciones de los hábitos higiénico-dietéticos, donde destacan la sobrenutrición con una elevada ingesta de SFA y grasas trans, generalmente acompañada de un menor consumo de micronutrientes procedentes de la fibra, fruta y verdura así como una disminución de la actividad física motivada por el desarrollo tecnológico de los países industrializados²³². Estos cambios han derivado en un incremento global de la incidencia de diabetes y obesidad²³³. Los últimos cálculos de la OMS indican que en 2015 habrá en todo el mundo aproximadamente 2300 millones de adultos (mayores de 15 años) con sobrepeso y al menos 700 millones de adultos obesos. En España hay numerosos estudios sobre la prevalencia de obesidad en la población general²³⁴. El registro *MESYAS (Metabolic Syndrome in Active Subjects)* demostró un porcentaje total de sobrepeso del 33,9%, y de obesidad 12,5% en una población laboral de 18778 trabajadores²³⁵.

La mayoría de los pacientes obesos presentan una RI subyacente, principal característica del SM, además, tienen el metabolismo de la glucosa alterado lo que favorece el desarrollo de la DMT2, presentan HTA, disfunción del endotelio, inflamación (aumento de IL-6, IL-18, TNF- α o leptina y disminución de adiponectina) y también dislipemia (aumento de TG y disminución de HDL)^{39, 40, 58, 236, 237}.

El sobrepeso y la obesidad tienen graves consecuencias para la salud. La obesidad es un importante factor de riesgo de enfermedades crónicas, también llamadas por la OMS enfermedades no transmisibles relacionadas con los hábitos dietéticos y nutricionales, tales como:

- Las ECV (especialmente la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular).
- La diabetes, que se ha transformado rápidamente en una epidemia mundial.
- Las enfermedades del aparato locomotor, y en particular la artrosis.
- Algunos tipos de cáncer, como los de endometrio, mama y colon.

A pesar de que el IMC se relaciona de manera directa con el sobrepeso (IMC>25) y la obesidad, se ha observado un fenotipo correspondiente a individuos obesos metabólicamente sanos (IMC elevado pero sin las alteraciones metabólicas típicas de individuos obesos)^{238, 239} y un fenotipo correspondiente a individuos con IMC<25 pero metabólicamente obesos (presentan las alteraciones metabólicas características del SM)^{239, 240}.

En un estudio reciente llevado a cabo por Virtue y Vidal-Puig²⁴¹ concluyeron que existía una unión, a nivel epidemiológico, entre la obesidad y la DMT2 y que el mecanismo de unión de estas enfermedades era la capacidad de expansión del tejido adiposo. Según estos autores el tejido adiposo de cada individuo tiene una capacidad de expansión limitada que está determinada por factores genéticos y ambientales. Una vez que el tejido adiposo llega a su límite de expansión, pierde la capacidad de almacenar la grasa de manera eficiente y ésta tiende a acumularse en otros órganos en los que se generan fenómenos de RI, apoptosis, inflamación y complicaciones cardiovasculares.

Ghanim y cols¹⁰⁷ realizaron un estudio en dos poblaciones diferentes: obesos y delgados. En estos individuos compararon la actividad del NF-kB y la expresión de moléculas inflamatorias que se encuentran moduladas por este factor de transcripción, en CMNs. Los resultados obtenidos en los individuos obesos, mostraron una mayor actividad del NF-kB y una mayor expresión de diversas citoquinas pro-inflamatorias (p105, IL-6, TNF- α , MMP-9, p65, MIF, PCR). Estos resultados están en concordancia con datos de otros estudios publicados previamente donde demostraron que el tejido adiposo de obesos expresaba mayores niveles de moléculas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, iNOS, o MCP-1)^{242, 243, 244, 245, 246, 247} y pro-trombóticas (factor tisular, Factor VII o PAI-1)^{248, 249, 250} que el tejido adiposo de individuos delgados.

Por otro lado, Sheu y cols²⁵¹ estudiaron los cambios ocurridos, a nivel de inflamación, tras la pérdida de peso en individuos obesos. Los resultados obtenidos fueron sorprendentes, ya que, tras la pérdida de un 5% del peso corporal se producía una disminución de la actividad del NF-kB y de la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias.

3.3 Inflamación, dislipemia y Síndrome Metabólico

Existen varias causas por las que se asocia al SM con un incremento del riesgo de ECV pero se ha demostrado que la dislipemia (alteraciones del metabolismo lipídico) juega un papel muy importante²⁵². Se define como un aumento en los niveles de TG (hipertrigliceridemia) y de LDL pequeñas y densas y un descenso de las HDL. La dislipemia está relacionada con la obesidad y la RI y podría explicarse por un aumento en los niveles de NEFAs en el hígado, debido a un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, que estimulan la síntesis de partículas ricas en TG (LRTs) y de VLDL por los hepatocitos. Este aumento en las partículas VLDL provoca un descenso en los niveles de HDL por la actuación de la proteína transportadora de esteres de colesterol, las HDL se enriquecen en TG, se hacen más pequeñas y por medio de la enzima lipasa hepática se catabolizan, razón por la cual al aumentar los niveles de TG disminuyen los de HDL^{253, 254}. Esto mismo ocurre con las LDL que también se enriquecen en TG, se catabolizan por la lipasa hepática y se hacen más pequeñas, densas, oxidables y poco afines a sus receptores (encargados de la regulación de los niveles plasmáticos de LDL).

En el *United Kingdom Prospective Diabetes Study*, la dislipemia se asoció con factores de riesgo para ECV y DMT2, particularmente en las mujeres del estudio²⁵⁵. Los datos obtenidos en el *Quebec Cardiovascular Study* mostraron la presencia de LDL pequeñas y densas asociadas con un incremento del riesgo de cardiopatía isquémica²⁵⁶ y DMT2²⁵⁷. Además, en un estudio llevado a cabo en una población norteamericana (*NHANES-III*) se demostró la presencia de niveles de TG superiores a 150 mg/dL en más del 30% de los casos y una HDL por debajo de sus límites en el 37%, solo precedidos en frecuencia por la obesidad, todo ello en una población en la que el 24% de los voluntarios tenía SM²⁰.

Hay evidencias claras de la relación entre la hipertrigliceridemia, la RI²⁵⁸ y la enfermedad coronaria. La hipertrigliceridemia ocasiona una disfunción del endotelio asociada a una producción incrementada de anión superóxido vascular y el consiguiente descenso de ON. Parece que después de la ingesta de la comida, las lipoproteínas, particularmente los quilomicrones y las VLDL, inducen la generación de radicales de oxígeno en la superficie endotelial que reaccionan con el ON reduciendo su biodisponibilidad.

Por otro lado, se ha relacionado la inflamación con alteraciones en el metabolismo lipídico. Los niveles circulantes de TNF- α se relacionan negativamente con el tamaño de las LDL. Las citoquinas podrían modular las concentraciones de las lipoproteínas a

través de diversos mecanismos: el TNF- α y la IL-1 inhiben el transporte inverso de colesterol a las células por una disminución del ARNm y la proteína de ABCA1²⁵⁹ (*ATP binding cassette A1*), hecho importante para las concentraciones circulantes de HDL y además, inhiben las acciones del receptor de LDL²⁶⁰.

3.4 Inflamación, disfunción endotelial, hipertensión y Síndrome Metabólico

La etiología de la HTA se encuentra relacionada con el estilo de vida, la dieta y una serie de factores psicosociales. Además, la inflamación crónica, el EO, la obesidad, la disfunción endotelial o la hiperinsulinemia, asociados al SM, se encuentran entre los procesos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de HTA^{261, 262, 263}.

Se ha demostrado que los marcadores inflamatorios disminuyen la síntesis de ON en células endoteliales^{264, 265} y estimulan la disfunción endotelial^{266, 267}. La menor biodisponibilidad de ON y el empeoramiento en el tono vascular darán lugar a un aumento en la presión sanguínea^{268, 269}. Diferentes estudios han encontrado altos niveles de marcadores inflamatorios circulantes (IL-6, IL-1, TNF- α o PCR) en sujetos con elevada presión sanguínea o con HTA^{270, 271, 272, 273, 274, 275}. La aparición de la disfunción endotelial también se debe al aumento de los NEFAs que dificultan la vasodilatación inducida por la insulina en el músculo esquelético^{276, 277}, y que además, junto con la IL-6 aumentan la producción de fibrinógeno, factor determinante en la viscosidad sanguínea.

Por otra parte, el aumento en la producción de angiotensinógeno por los adipocitos implica un aumento en la cantidad de angiotensina II, molécula que favorece la disfunción endotelial, ya que: 1) estimula la expresión de moléculas de adhesión y MCP-1 en las células endoteliales²⁷⁸, 2) promueve la formación de radicales libres a partir del ON, disminuyendo así su biodisponibilidad²⁷⁹ y 3) favorece la angiogénesis²⁸⁰ y la HTA¹⁸⁹.

La RI y el hiperinsulinismo pueden promover *per se* la HTA. Además, se ha comprobado que entre los pacientes obesos existe mayor prevalencia de HTA y que ésta puede revertirse con la pérdida de peso²⁸¹. En el registro *NHANES III* (*tercera encuesta nacional de salud americana*), entre los sujetos con $IMC \geq 30$ existía 2 veces más porcentaje de hipertensos que entre los no obesos¹⁸. Este hecho podría deberse a que en los obesos se produce una retención de sodio, un estímulo del sistema renina-

angiotensina-aldosterona con efectos hipertensores²⁸², también hay cambios en la actividad de la ATPasa Na⁺/K⁺ y cambios en la estructura de la pared arterial mediados por factores de crecimiento. Por otra parte, en estos individuos hay un aumento de actividad simpática asociado con la resistencia a la leptina.

Se ha descrito que pacientes con HTA tienen menor actividad de la enzima superóxido dismutasa²⁸³. En pacientes hipertensos con otros componentes del SM se detectaron marcadores elevados de EO y una capacidad antioxidante deprimida tanto en plasma como en CMNs²⁶², sin embargo, esta observación no se detectó ante la presencia de componentes adicionales de SM como la hipertrigliceridemia o la hiperglucemia basal, sugiriendo que la HTA podría jugar un papel central en el desarrollo de EO y disfunción endotelial. Estos datos se corroboraron en estudios posteriores²⁸⁴ en los que se objetivó una capacidad antioxidante disminuida en CMNs de sujetos hipertensos.

3.5 Inflamación, resistencia a la insulina y Síndrome Metabólico

La RI se caracteriza por una menor actividad biológica de la insulina debido a la imposibilidad de transducción de la señal necesaria a sus receptores y se expresa en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente en el metabolismo de la glucosa. La RI se manifiesta en órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo y muscular y también en el endotelio.

La RI puede deberse a defectos del receptor de la insulina o también por trastornos de su acción a nivel post-receptor. Las mutaciones del receptor suelen ser poco frecuentes, por lo que, en la mayoría de los pacientes que tienen RI hay defectos a nivel post-receptor derivados de alteraciones genéticas y cuya expresión clínica es favorecida por la concurrencia de factores ambientales y la obesidad abdominal, aunque también influyen el sedentarismo o el tabaquismo.

La mayoría de los pacientes obesos presentan una RI subyacente, principal característica del SM, además, tienen el metabolismo de la glucosa alterado lo que favorece el desarrollo de la DMT2. En un estudio de seguimiento durante 10 años se observó que la pérdida de peso de los pacientes produjo una mejora en la RI y en el SM y disminuyó la mortalidad total²⁸⁵. Además, incluso en ausencia de pérdida de peso se ha observado que la actividad física, medida por la capacidad cardiorrespiratoria, previene el SM²⁸⁶, la aparición de otras enfermedades y la reducción de la mortalidad²⁸⁷.

En presencia de obesidad, el tejido adiposo segrega cantidades mucho más elevadas de adipoquinas, en concreto TNF- α , IL-6 y resistina, que provocan que este tejido se vuelva resistente a la acción de la insulina²⁸⁸. Además, un descenso en las concentraciones plasmáticas de adiponectina, se ha asociado a la RI, la hiperinsulinemia y la intolerancia a la glucosa^{289, 220, 223, 224}. Yuan y cols²⁹⁰ detectaron niveles elevados de moléculas pro-inflamatorias y bajos niveles de adiponectina en individuos con DMT2. Además, otros estudios han confirmado que altas concentraciones de adiponectina se asocian con una baja incidencia de DMT2^{291, 292}.

Una de las moléculas más importantes en la RI es el TNF- α , ya que induce una disminución de la expresión del receptor de la insulina, además, reduce la fosforilación de residuos tirosina del sustrato del receptor de la insulina-1²⁹³, necesaria para la progresión de la señal intracelular de la insulina^{294, 295} y disminuye la expresión génica del transportador de glucosa sensible a la insulina (GLUT)-4²⁹⁶. El TNF- α estimula la lipólisis y puede favorecer la aparición de hiperinsulinemia y RI²⁹⁷. De este modo, parece evidente que niveles elevados de TNF- α en el tejido adiposo podrían ser la unión existente entre obesidad, RI y el desarrollo de SM²⁹⁸.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en individuos obesos la actividad lipolítica del tejido adiposo es mayor y los niveles de NEFAs y de insulina se encuentran elevados constantemente en la circulación. Este hecho origina que la función de la insulina sea defectuosa y no pueda inhibir la acción de la LSH, por lo que la actividad lipolítica continúa²¹¹ produciéndose un aumento en los niveles de NEFAs que no solo se almacenan en el tejido adiposo sino también en otros órganos como el hígado o el músculo esquelético provocando un cuadro de intolerancia a la glucosa. De esta manera se producen fenómenos de hiperinsulinemia, hiperglucemia y RI debido a la incapacidad de la insulina para normalizar los niveles de glucosa. Además, a largo plazo se desarrolla DMT2 por la hiperactividad de las células β pancreáticas para mantener normales los niveles de glucosa que provoca su disfunción y también por efecto lipotóxico de los NEFAs, que conduce a la acumulación de cadenas largas de acil-CoA en las células β y la muerte de las mismas por apoptosis^{299, 300, 301}. La hiperinsulinemia, la hiperglucemia y la RI provocan efectos adversos entre los que se encuentran un aumento del EO, disfunción endotelial, HTA o dislipemia³⁰².

3.6 Inflamación, estrés oxidativo y Síndrome Metabólico

Generalmente se acepta que la RI es el causa principal del SM, aunque existen evidencias que demuestran una estrecha relación entre el SM, un estado inflamatorio crónico de bajo grado y el EO^{303, 304, 305}. El EO juega un papel fundamental en la patogénesis de las alteraciones que acompañan al SM al desencadenar sus manifestaciones metabólicas y cardiovasculares^{306, 307} incluyendo la inflamación, la arteriosclerosis, la disfunción endotelial, la HTA, la obesidad y la RI, así como la enfermedad del hígado graso no alcohólica y la DMT2^{306, 308, 309, 310}. Además, el EO está presente en diversas patologías, incluyendo las enfermedades respiratorias³¹¹, el cáncer³¹², las enfermedades neurológicas^{313, 314} y el envejecimiento³¹⁵.

El aumento en los niveles de NEFAs, la hiperglucemia y la inflamación, provocan un aumento en las especies reactivas de oxígeno, una mayor actividad de la enzima NADPH oxidasa y un aumento del EO dando lugar a una reducción de la biodisponibilidad de ON³¹⁶. Esta disminución de ON está presente en patologías como la HTA, la disfunción endotelial y la hipertrigliceridemia, todas ellas relacionadas con el SM³¹⁷.

En pacientes con SM se observa una disminución significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes, menores niveles de vitaminas C y E, un incremento de la peroxidación lipídica y de las proteínas carboniladas. Además, se ha demostrado una correlación positiva entre la grasa corporal y el perímetro de cintura con la disfunción endotelial mediada por EO³¹⁸, la actividad de la subunidad p47phox de la enzima NADPH oxidasa y los niveles de catalasa. En otro estudio, se objetivó un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa en sujetos con SM³¹⁹.

Por otra parte, el aumento en los niveles de ROS conducen a la activación del NF- κ B, al aumento en los niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias y a la disminución en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias^{320, 321}.

3.7 Prevalencia del Síndrome Metabólico y asociación con la enfermedad cardiovascular y la diabetes mellitus tipo 2.

Como se ha mencionado anteriormente, el SM está asociado a un incremento de 4 a 5 veces la prevalencia de DMT2 y de 2 a 3 veces la de ECV^{25, 45, 46, 47}. Se considera que la prevalencia del SM en España es del 22% en la población general española y del 41% en los pacientes con cardiopatías.

La asociación entre SM, ECV y DMT2 es evidente según los datos de un estudio prospectivo realizado en una cohorte de 1209 hombres caucasianos sanos (42-60 años). A lo largo del estudio, los individuos que desarrollaron varias de las alteraciones metabólicas presentes en el SM, incrementaron el riesgo de ECV en más de 4 veces y duplicaron su mortalidad³²². Estos factores de riesgo también están presentes en individuos no caucasianos, según muestra un estudio realizado en 808 hombres japoneses sin HTA, dislipemia o DMT2. El estudio tuvo un periodo de seguimiento de 6 años en los que la incidencia de ECV fue 2 veces superior en los individuos que presentaron al menos 3 de las características presentes en el SM que en los individuos sanos³²³.

Las complicaciones cardiovasculares fundamentales que produce el estado de hiperglucemia en la DMT2 son la nefropatía, la retinopatía y neuropatía diabéticas y las ECV. Entre éstas se incluyen la enfermedad coronaria y la enfermedad cerebrovascular como principales complicaciones, aunque la enfermedad arterial periférica también es un proceso común y tiende a ser más grave cuando su causa es la diabetes que cuando se produce por otros mecanismos. Las ECV son las complicaciones numérica y clínicamente más importantes de la DMT2 y constituyen hasta el 80% de las complicaciones macrovasculares de esta enfermedad³²⁴.

La hiperglucemia y otros factores de riesgo prevalentes en los pacientes diabéticos como la HTA, la dislipemia y la obesidad, concurren y multiplican sus efectos dañinos contribuyendo al desarrollo de las ECV. La disfunción endotelial, la disminución de la biodisponibilidad de ON y los procesos inflamatorios se cuentan entre los mecanismos más importantes implicados en el proceso.

El registro *NHANES III* demostró que la prevalencia de SM aumentaba de forma paralela a la edad y superaba el 40% en las personas mayores de 60 años. Además, los sujetos con SM mostraron mayor prevalencia de cardiopatía isquémica que los diagnosticados de DMT2 sin SM (el 13,9 frente al 7,5%) pero menor que la de los que presentaban ambas patologías³²⁵.

Otros datos relevantes han sido los aportados por los estudios Framingham³²⁶ y WOSCOPS³²⁷ que demostraron que el SM es predictor del desarrollo de DMT2. Concretamente, el seguimiento durante 6 años de la cohorte del estudio *WOSCOPS* demostró que, en los sujetos con SM, el riesgo de desarrollar DMT2 era casi 4 veces superior frente a los que no tenían SM, especialmente en aquellos con niveles elevados

de PCR. Por otra parte, los pacientes con SM mostraron más complicaciones cardiovasculares que los que no tenían SM, independientemente de los valores de PCR.

En el registro *MESYAS*²³⁵ español se objetivó la presencia de SM en uno de cada 10 trabajadores activos. La prevalencia de SM aumentó con la edad, el IMC, la presión arterial y la glucemia basal. Todos los componentes del SM fueron más prevalentes en varones, excepto las concentraciones de cHDL, que fueron más bajas.

4. DIETA, INFLAMACIÓN Y SÍNDROME METABÓLICO

4.1 Modelo de alimentación saludable

Una alimentación equilibrada forma parte esencial de un estilo de vida saludable. Además, otros elementos de la vida diaria, como el ejercicio físico, el consumo de tabaco o el estrés, influyen de forma significativa sobre nuestra salud^{328, 329}. La dieta, y especialmente su contenido en grasa, pueden modular los factores de riesgo cardiovasculares, los mecanismos relacionados con el comienzo y la progresión de las placas de ateroma y, además, se ha asociado con los factores implicados en el desarrollo de SM. Algunos estudios epidemiológicos han documentado que factores dietéticos como la alta ingesta de SFA, colesterol e hidratos de carbono (HC) simples, aumentan el riesgo de desarrollar SM³³⁰. Por el contrario, una alta ingesta de fibra, antioxidantes, componentes fenólicos, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3 de cadena larga y de origen marino y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), se ha asociado de manera inversa al desarrollo de SM^{331, 332}.

En la última década ha crecido el interés por seguir un modelo de alimentación saludable como la Dieta Mediterránea (DM), en gran medida debido a que su consumo se relaciona con una mayor longevidad, mejor calidad de vida y menor incidencia de obesidad, ECV, cáncer o deterioro cognitivo, a pesar de ser un modelo de alimentación con un elevado contenido en grasa, en contraste con las dietas recomendadas durante varias décadas por los nutricionistas³³³. No obstante, estos efectos beneficiosos deberían atribuirse a la DM Tradicional, de la cual, las poblaciones del sur de Europa se están alejando. De hecho, el proyecto Eurodiet³³⁴ puso de manifiesto que en los países del sur de Europa en los que clásicamente se consumía una DM rica en aceite de oliva, el porcentaje de grasa ingerido era superior al de los países nórdicos. Por este motivo, en

estos países se están realizando recomendaciones dietéticas para reducir el consumo de grasa, especialmente de SFA.

Las características que distinguen a la DM son una alta ingesta de verduras, legumbres, frutas, frutos secos, cereales integrales, ajo, cebolla y especias, un elevado consumo de aceite de oliva (rico en MUFA), una baja ingesta de SFA, un moderado consumo de pescado y productos lácteos, una baja ingesta de carne, productos cárnicos procesados, cremas, mantequilla y margarina y un regular pero moderado consumo de vino³³⁵. El consumo de MUFA, concretamente el ácido oleico del aceite de oliva, se considera el componente clave de la DM y el responsable de su efecto protector³³⁶.

El comité científico asesor del *AHA* declaró que un modelo de DM tiene un efecto positivo en el tratamiento de la ECV³³⁷. Las recomendaciones dietéticas del *ATP III* para pacientes con SM están en consonancia con las recomendaciones generales. Según el *ATP III*^{338, 339}, un modelo de alimentación saludable debe tener una ingesta de grasa del 25-35% de las calorías totales, con una proporción de SFA <10%, de PUFA <7% y con un porcentaje máximo del 20% de MUFA. En este modelo, la ingesta de SFA y de colesterol es baja y la mayoría de las calorías provienen de comidas de origen vegetal. Dentro de los MUFA presentes en la dieta, el ácido oleico (cis C18:1 n-9) es el más consumido y el 85% de la ingesta de esta grasa procede del aceite de oliva³⁴⁰.

Los resultados de un meta-análisis publicado recientemente por Kastorini y cols³⁴¹ asociaron una menor prevalencia y desarrollo del SM con el consumo de un modelo de alimentación saludable como la DM. Además, una mayor adherencia a este patrón dietético fue asociado con una mejora en las alteraciones metabólicas que componían el SM.

4.2 Aceite de oliva

El conocimiento de las cualidades saludables del consumo de aceite de oliva eran ya conocidas desde la antigua Grecia y tuvieron gran repercusión en la medicina arábiga. Si embargo, no ha sido hasta el siglo XX cuando todas estas ideas han comenzado a tener una base científica³⁴².

El aceite de oliva está compuesto de dos fracciones fundamentales desde el punto de vista cuantitativo. La mayor parte la constituyen los compuestos saponificables glicerídicos, como los TG, que constituyen el 98-99% de la grasa total. Entre ellos destaca la abundancia de ácido oleico que constituye del 60-84% del total de ácidos grasos de los TG, mientras que el ácido linoleico sólo supone del 3-21%

de su composición. Pero de forma añadida, el aceite de oliva virgen posee una serie de microcomponentes no grasos que representan del 1-2% y, que le aportan un gran interés biológico del que carecen el resto de aceites vegetales, con composición grasa similar, como el de girasol, soja y colza. Entre estos micronutrientes cabe destacar la vitamina E, los hidrocarburos (escualeno, carotenoides y clorofila), los tocoferoles (alfa, beta y gamma tocoferol), los aromatizantes, los estenoles y esteroides y los compuestos fenólicos. Estos últimos han adquirido gran relevancia en los últimos años y pueden ser ácidos fenólicos simples (hidroxitirosol, tirosol, cafeico, cumárico, gálico y vainílico), secoioides (oleuropeína y ligstrósido), flavonoides (apigenina, luteolina) y lignanos (pinoresinol y 1-acetopinoresinol).

El *aceite de oliva virgen y virgen extra* es el obtenido directamente de la aceituna mediante medios físicos, sin tener contacto alguno con disolventes orgánicos, y con una temperatura constante durante su extracción nunca superior a 35°C. El llamado *aceite de oliva* contiene un pequeño porcentaje de aceite virgen (5-10%), que se añade al aceite de oliva previamente refinado, por lo que su riqueza en microcomponentes es inferior a la de los aceites vírgenes, aunque superior a los de semilla³⁴³.

4.3 Dieta, Inflamación y Síndrome Metabólico

La cantidad y la naturaleza de los lípidos consumidos en la dieta son factores importantes en el proceso de la modulación de las respuestas inflamatorias e inmunes. El grado de insaturación de los ácidos grasos de la dieta afecta a la composición de las lipoproteínas y a la expresión de factores relacionados con la inflamación. Existen estudios que evidencian que la cantidad y el tipo de grasa de la dieta, tales como un alto consumo de SFA, inducen un proceso inflamatorio y contribuyen a desarrollar SM ya que producen un aumento en la actividad del NF-κB y, por tanto, un incremento en la expresión de IL-6, TNF-α y otras citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria⁴⁷. De acuerdo con estos estudios, Pérez-Martínez y cols¹¹³ demostraron que la DM, rica en aceite de oliva, disminuía la activación del NF-κB, en CMNs, comparada con una dieta típica Occidental, rica en SFA, en una población de individuos jóvenes y sanos.

Por otro lado, en un estudio publicado por Weldon y cols³⁴⁴ se demostró que el ácido docosahexaenoico ((DHA), un PUFA n-3 de cadena larga de origen marino) disminuía la expresión del ARN mensajero (ARNm) de varias citoquinas pro-

inflamatorias, incluyendo el TNF- α y la IL-6, en cultivos de células humanas THP-1 cuando éstas eran incubadas con el LPS.

Los ácidos grasos de la dieta se encuentran entre uno de los factores más críticos para la disfunción del endotelio vascular. El ácido oleico podría producir una inhibición o disminución en la activación de la célula endotelial y la respuesta inflamatoria^{345, 346}, así como una reducción en la susceptibilidad de las partículas LDLs a modificaciones oxidativas³⁴⁷. Este ácido graso podría contribuir a la prevención de la aterogénesis a través del desplazamiento selectivo de los SFA en los fosfolípidos de la membrana celular y a una modulación de la expresión de los genes involucrados en el reclutamiento de los monocitos. En un estudio de nuestro grupo, Bellido y cols³⁴⁸ observaron que los niveles de moléculas de adhesión (ICAM-1 y E-selectina), en células de cordón umbilical humanas (HUVEC), fueron menores cuando se cultivaron con LDL de personas que habían consumido una dieta alta en MUFA, respecto a otras que habían consumido una dieta enriquecida en SFA.

Con respecto a los PUFA n-3, se ha demostrado que presentan propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras^{349, 350} y que mejoran la sensibilidad a la insulina³⁵¹. Además, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el DHA podrían inhibir los eventos aterogénicos relacionados con la adhesión del monocito a las células endoteliales.

Los beneficios favorables que una dieta alta en MUFA ejerce sobre los niveles de colesterol plasmático sirvieron para despertar el interés sobre el potencial efecto beneficioso de la DM, rica en este tipo de ácidos grasos, y la salud cardiovascular. Esta hipótesis inicial fue corroborada en el informe de la US Food and Drug Administration (*FDA*) que establecía que cuando se reemplazaban 23 g/d de SFA por MUFA se reducía el riesgo de enfermedad coronaria. Esta evidencia se apoya en los datos de 73 ensayos clínicos^{352, 353, 354, 355}, 4 de ellos de especial calidad, de los cuales 2 son de nuestro grupo, tal y como se recoge en dicho informe. Gracias a ello quedó establecido que la sustitución de SFA por MUFA mantenía los niveles de c-HDL y disminuía los niveles de c-LDL. Los resultados de otro estudio confirmaron que la sustitución de HC por MUFA disminuía los niveles de TG en plasma³⁵⁶.

Un estudio previo realizado en voluntarios sanos mostró que el consumo de una dieta alta en MUFA inducía bajos niveles de TG y altos de c-HDL comparada con el consumo de una dieta baja en grasa y enriquecida en HC³⁵⁷. Además, Roche y cols³⁵⁸ observaron que el efecto adverso producido por una dieta baja en grasa y alta en HC en

los niveles de lípidos en sangre podían ser atenuados si se adicionaban PUFA n-3 de cadena larga.

Una de las alteraciones metabólicas que se producen en el SM es la HTA. En un estudio llevado a cabo por Ferrara y cols³⁵⁹ en el que 23 pacientes hipertensos fueron sometidos a dos dietas, una de ellas alta en MUFA y la otra rica en PUFA demostraron que los pacientes que consumieron la dieta alta en PUFA necesitaron más tratamiento para mantener la presión arterial dentro de los valores normales. Una posible explicación al efecto hipotensivo de los MUFA podría ser un incremento en la biodisponibilidad del ON³⁶⁰, aunque existen diversidad de opiniones, ya que diferentes estudios sugieren que este efecto hipotensor se debe, no solo a los MUFA, sino también a los microcomponentes que presenta el aceite de oliva^{361, 362}.

Con respecto a la obesidad abdominal, principal patología de los pacientes que presentan SM, diferentes estudios de intervención han encontrado una relación inversa entre el consumo de ácidos grasos insaturados y la obesidad abdominal. Un estudio reciente publicado por Paniagua y cols³⁶³ demostró que el consumo a largo plazo de una dieta baja en grasa y enriquecida en PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino, disminuía la prevalencia de SM en un 20,7% comparado con una disminución de un 11% en el resto de dietas estudiadas. Además, tras el consumo de esta dieta enriquecida en PUFA n-3 se reducía la HTA, la obesidad abdominal y la hipertrigliceridemia en pacientes que presentaban SM. En otro estudio aleatorizado y cruzado llevado a cabo por este mismo autor³⁶⁴, se observó que el consumo de una dieta alta en MUFA favorecía una menor redistribución de la grasa corporal desde el tejido adiposo subcutáneo periférico al visceral y un menor porcentaje de grasa abdominal si lo comparaban con el efecto producido tras el consumo de una dieta alta en HC.

Por otro lado, Piers y cols³⁶⁵ publicaron que el consumo de MUFA y PUFA inducía una menor acumulación de grasa en el abdomen respecto al consumo de SFA. Resultados similares han observado Summers y cols³⁶⁶ o Fernandez de la Puebla y cols³⁶⁷. Además, datos del estudio *PREDIMED* (Prevención con Dieta Mediterránea) confirman que el consumo de una DM suplementada en nueces reduce la prevalencia de SM, fundamentado por una reducción del perímetro de cintura sin pérdida de peso, fenómeno que sugiere una redistribución de la grasa corporal³⁶⁸.

Numerosos estudios clínicos han sugerido que dietas ricas en MUFA, en comparación con dietas altas en HC, tienen efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico, las complicaciones cardiovasculares y el control metabólico de la diabetes^{369, 370, 371, 372}.

De hecho, la *ADA* considera que la dieta idónea para la prevención y el tratamiento de la DMT2 debe contener entre un 60-70% de la energía repartida entre HC y MUFA³⁷³. En un estudio llevado a cabo en pacientes diabéticos en el que consumieron una dieta alta en MUFA (33% del contenido calórico diario), se observó una disminución del requerimiento de insulina por parte de los pacientes cuando comparaban los resultados con los obtenidos tras el consumo de una dieta alta en HC³⁵⁷. Además, Vesby y cols³⁷⁴ demostraron, en su estudio *KANWU*, que al modificar la ingesta de SFA por MUFA se producía una mejora en la sensibilidad a la insulina. Igualmente, Pérez-Jiménez y cols³⁷⁵ demostraron en un estudio de intervención dietética, que la sustitución de SFA por MUFA o por HC mejoraba la sensibilidad a la insulina.

Por otro lado, la grasa de la dieta también influye en la hemostasis. Se ha observado que tras el consumo a largo plazo de dietas enriquecidas en MUFA, se produce una disminución en la activación del Factor VII, en comparación con dietas pobres en este tipo de grasa. Estos resultados se podrían explicar por el hecho de que con el consumo de una dieta rica en MUFA se disminuyen los quilomicrones postprandiales, hecho que atenúa la activación del Factor VII³⁷⁶.

Teniendo en cuenta los resultados de estos estudios, el objetivo final en la prevención y el tratamiento del SM es reducir el riesgo de desarrollar DMT2 y ECV. Por tanto, es fundamental profundizar sobre los efectos biomoduladores de la dieta para prevenir el desarrollo de las distintas alteraciones metabólicas que subyacen en el SM.

5. ESTADO POSTPRANDIAL

El estado postprandial es la situación metabólica habitual en la que se encuentra el ser humano a lo largo del día, debido a la superposición de los productos absorbidos en las distintas comidas diarias. Durante el postprandio se producen modificaciones sucesivas en la concentración y composición de las lipoproteínas plasmáticas. En los países occidentales se consumen al menos tres comidas diarias con un 20-70% de grasa en cada comida, el valor máximo de TG se presenta entre las 3 y las 4 horas tras la ingesta y los niveles no retornan al estado basal hasta las 8-12 horas³⁷⁷. El periodo postprandial se caracteriza por un aumento en los niveles plasmáticos de TG y de las lipoproteínas ricas en TG (LRTs), constituidas por los quilomicrones intestinales, las

partículas de VLDL y sus remanentes. Además, las partículas de LDL se convierten en pequeñas y densas y las HDL se catabolizan rápidamente³⁷⁸. Un incremento del tiempo de permanencia en el plasma de estas LRTs aterogénicas da lugar a un aumento de la unión al endotelio, activando las células endoteliales, promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión y reclutando células inflamatorias³⁷⁹.

Los factores genéticos y ambientales condicionan la variabilidad en la respuesta lipémica postprandial. Varios son los factores que pueden inducir cambios en esta respuesta, como la edad, el género, el tabaquismo, el ejercicio físico, los niveles de insulina, la obesidad abdominal, la actividad de las enzimas lipoproteín lipasa y lipasa hepática, los genes o el tipo de dieta.

5.1 Respuesta postprandial, inflamación y Síndrome Metabólico

Muchos de los conocimientos que se tienen hoy en día de la relación existente entre lípidos, metabolismo de las lipoproteínas y desarrollo de arteriosclerosis proviene de estudios realizados en situación de ayunas. Estos conocimientos son una base importante, pero no hay que olvidar que el ser humano se encuentra la mayor parte del día en estado postprandial, con una fluctuación continua del grado de lipemia a lo largo del día³⁸⁰. Fue Zilversmit en 1979³⁸¹, quién sugirió que la arteriosclerosis era un fenómeno postprandial, tras analizar diversos estudios realizados en modelos animales y cultivos celulares donde se responsabilizó a las LRTs de este hecho.

Hay evidencias de la relación existente entre la hipertrigliceridemia postprandial, la RI²⁵⁸ y la enfermedad coronaria y también parece probable que los TG postprandiales sean un mejor predictor de enfermedad coronaria que los TG en ayunas³³⁸. En pacientes con SM existe una importante heterogeneidad en la respuesta a una sobrecarga grasa. El 53% de los pacientes con SM presentan incrementos intensos (>100 mg/dl) en los TG tras la sobrecarga grasa, y el 50% de estos pacientes son hiperuricémicos³⁸². Existen una gran variedad de estudios que han demostrado la asociación existente entre los niveles de TG postprandiales y el riesgo de desarrollar ECV, tales como: el *Women's Health Study*^{383, 384}, el *Copenhagen City Heart Study*^{385, 386, 387, 388}, el *Apolipoprotein-related Mortality Risk Study (AMORIS)*³⁸⁹ o el *Northwick Park Heart Study (NPHSII)*³⁹⁰. Además, diversos meta-análisis han corroborado dicha asociación (Hokanson³⁹¹, Sarwar³⁹² y Di Angelantonio³⁹³).

Sin embargo, no solo la lipemia postprandial contribuye al desarrollo de ECV, sino también la hiperglucemia, en lo que ha venido a denominarse estado dismetabólico postprandial³⁹⁴. Un trabajo publicado por Paniagua y cols³⁹⁵, observó que con el consumo de una dieta alta en MUFA se mejoraba la respuesta postprandial de la glucosa y de los lípidos en sujetos con RI.

Estudios previos sugieren que la lipemia postprandial induce una disfunción endotelial³⁹⁶ que se acompaña de una respuesta inflamatoria aguda³⁹⁷, de un estado pro-trombótico³⁹⁸ y de un aumento en los niveles de EO³⁹⁹, por lo que, existe un gran interés en conocer los cambios que se producen en el organismo durante el postprandio y la influencia que la cantidad y la calidad de la grasa de la dieta tienen sobre la respuesta postprandial.

El comienzo del proceso aterosclerótico es una alteración de la función endotelial desencadenada por varios factores de riesgo. Como indicaron Vogel y cols⁴⁰⁰, un importante mecanismo para la alteración de esta función en la lipemia postprandial es el daño oxidativo. En un estudio reciente, Pérez-Martínez y cols⁴⁰¹ compararon el efecto postprandial de cuatro sobrecargas grasas. Los autores demostraron que la sobrecarga rica en MUFA mejoraba el EO posprandial medido como el cociente entre glutathion reducido/glutathion oxidado. De esta misma forma, tras el consumo de esta sobrecarga, se encontraron menores niveles postprandiales de lipoperóxidos, proteínas carboniladas y menor actividad de la enzima superóxido dismutasa, en comparación con el resto de sobrecargas grasas del estudio. Además, se encontraron mayores niveles de peróxido de hidrógeno tras la sobrecarga alta en SFA, en comparación con el resto.

Varios estudios han mostrado un descenso en el efecto negativo producido tras una sobrecarga grasa al administrar antioxidantes, lo que viene a corroborar la asociación entre actividad pro-oxidante y disfunción vascular. Plotnick y cols⁴⁰² encontraron que en individuos sanos se prevenía la reducción en la vasodilatación mediada por flujo y dependiente del endotelio con el consumo de vitamina C y E antes de una sobrecarga grasa (50 g). Además, se sabe que la hipertrigliceridemia postprandial puede conducir a una disfunción endotelial asociada a una producción incrementada de anión superóxido vascular y el consiguiente descenso de ON. Parece que las lipoproteínas posprandiales, particularmente los quilomicrones y las VLDL inducen la generación de radicales de oxígeno en la superficie endotelial que reaccionan con el ON, reduciendo su biodisponibilidad. En el estudio *Lipgene* se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en MUFA mejora la función endotelial postprandial en individuos con SM, respecto

al consumo de SFA y de PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino (EPA y DHA). En concordancia con estos resultados, la respuesta postprandial de la NOS se incrementó con la ingesta de una dieta rica en MUFA comparado con las dietas alta en SFA y baja en grasa. Además, se objetivó un descenso en los niveles de ICAM-1 plasmáticos tras el consumo de MUFA respecto al consumo de SFA y de PUFA n-3⁴⁰³.

Por otro lado, se ha demostrado que la lipemia postprandial influye en la hemostasis, ya que después de consumir un desayuno rico en grasa se ha observado una activación postprandial del factor VII que se ve disminuida al consumir de forma habitual un desayuno rico en aceite de oliva⁴⁰⁴. Estos resultados se podrían explicar por el hecho de que con el consumo de una dieta rica en MUFA se disminuyen los quilomicrones postprandiales, hecho que atenúa la activación del Factor VII³⁷⁶.

En un estudio realizado en pacientes hipercolesterolémicos, Ruano y cols⁴⁰⁵ concluyeron que el consumo de MUFA con alto contenido en polifenoles mejoraba el perfil hemostático postprandial. Así las concentraciones plasmáticas del Factor VII y la actividad del PAI-1 era menores tras el consumo de un desayuno rico en aceite de oliva con alto contenido en polifenoles comparado con un desayuno rico en aceite de oliva con bajo contenido en polifenoles.

Como se ha mencionado anteriormente, durante el postprandio se desencadena una respuesta inflamatoria aguda. Debido al hecho de que nos encontramos la mayor parte del día en estado postprandial por la superposición de los productos absorbidos en las distintas comidas diarias, es probable que esta respuesta inflamatoria aguda se mantenga a lo largo del día, lo que conllevaría a un aumento en los niveles de ROS, una mayor actividad de NF-kB y elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias que están bajo su influencia⁴⁰⁶. Este hecho es importante debido a que en los pacientes con SM subyace un estado de inflamación crónica de bajo grado⁴⁷. Un estudio llevado a cabo por Aljada y cols¹⁸⁷ demostró que tras una sobrecarga grasa (900 Kcal) se inducían diversos cambios inflamatorios caracterizados por una disminución en la expresión de I κ B- α , un incremento en la actividad del NF-kB, de los niveles de PCR plasmática y de la expresión de IKK- α , IKK- β y p47^{phox}.

Hay pocos estudios que hayan investigado los cambios postprandiales que ocurren en los marcadores inflamatorios considerando el tipo de ácido graso y apenas existen trabajos realizados en pacientes con SM. En un trabajo publicado por Bellido y cols⁴⁰⁷ encontraron un efecto diferencial del tipo de ácido graso en la activación de NF-kB, observando que la ingesta de una comida rica en aceite de oliva, disminuía la activación

de dicho factor de transcripción comparada con una comida rica en SFA, en CMNs de individuos jóvenes y sanos.

Se conoce que los PUFA n-3 reducen la activación de las células endoteliales *in vitro*^{408, 409, 410} y los procesos inflamatorios además, se ha descrito que tienen efectos en la estabilización de la placa por la reducción de la migración de los monocitos y de las células del músculo liso vascular⁴¹¹. Estos ácidos grasos pueden influir en dichos procesos indirectamente mediante la reducción de la trigliceridemia, de las LDL pequeñas y densas, y elevando las concentraciones de HDL^{411, 412, 413}, y se piensa que los efectos beneficiosos que producen se deben a la reducción de ROS^{410, 411}. Jiménez-Gómez y cols⁴¹⁴, publicaron recientemente un trabajo donde demostraban que el consumo de una sobrecarga grasa alta en MUFA o rica en PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino tenían efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico postprandial de individuos con SM.

En definitiva, estas evidencias sugieren que es fundamental investigar los cambios metabólicos que se producen durante el periodo postprandial, así como, el efecto que sobre el mismo ejercen diferentes modelos de alimentación.



III. HIPÓTESIS

El síndrome metabólico (SM) se ha convertido en un problema de salud de creciente prevalencia asociado a estilos de vida poco saludables. Su etiología es en gran medida desconocida, aunque probablemente sea la consecuencia de una compleja interacción entre factores genéticos, epigenéticos, metabólicos y ambientales, entre los que destaca la dieta y sobre todo la calidad y cantidad de grasa consumida. La inflamación se ha relacionado en los últimos años con el desarrollo y la progresión de la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y en definitiva con el SM, por lo que uno de los pilares básicos de su tratamiento estaría vinculado a cambios en el estilo de vida, como la ingesta de una dieta saludable y la realización de ejercicio físico. Como hemos sugerido previamente el exceso de nutrientes, la ingesta de dietas ricas en ácidos grasos saturados y bajas en ácidos grasos monoinsaturados y el sedentarismo, además de otros factores, generan estrés oxidativo y la activación de una respuesta inflamatoria, a través del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), que produce un incremento en la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión, quimioquinas, proteínas coagulantes y enzimas inflamatorias.

Por otro lado, en las sociedades occidentales, donde es habitual la ingesta sucesiva de varias comidas, el estado postprandial constituye la situación metabólica habitual en la que se encuentra el ser humano a lo largo del día, por lo que es fundamental estudiar los cambios metabólicos que se producen durante el postprandio, así como, el efecto que sobre el mismo ejercen los diferentes modelos de alimentación consumidos a largo plazo.

Por todo lo expuesto nos planteamos el hecho de que la calidad y la cantidad de grasa de la dieta podrían influir en el grado de respuesta inflamatoria en pacientes con Síndrome Metabólico. Por tanto, nos propusimos estudiar si la ingesta a largo plazo de cuatro modelos de dieta con diferente calidad y cantidad de grasa atenúa el grado de inflamación crónica que subyace en pacientes con SM disminuyendo la actividad nuclear del NF- κ B y la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. De este modo se podrían generar recomendaciones sobre la dieta para mejorar la calidad de vida de los pacientes con SM.



IV. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar el efecto a largo plazo del consumo de cuatro modelos de dieta (HMUFA (20% de MUFA), HSFA (16% SFA), LFHCC (6% PUFA) y LFHCC n-3 (6% PUFA y 1.24 g/d de PUFA n-3 de cadena larga y origen marino), seguidos de una sobrecarga grasa en forma de desayuno, con la misma composición que la dieta que habían seguido durante las 12 semanas del periodo de intervención dietética, sobre la actividad nuclear de NF- κ B en células mononucleares de pacientes con Síndrome Metabólico.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Analizar el efecto de los diferentes modelos de alimentación sobre los niveles proteicos de I κ B- α citoplasmática y p65 nuclear en las células mononucleares de pacientes con Síndrome Metabólico, al finalizar el periodo de intervención dietética (efecto a largo plazo) y durante el postprandio (efecto agudo).

2. Estudiar el efecto agudo y a largo plazo de los cuatro modelos de alimentación sobre los cambios de expresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios: I κ B- α , p65, IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-8, MIF y MMP-9 en CMNs de pacientes con Síndrome Metabólico.

3. Determinar la respuesta a la intervención dietética y al estudio postprandial de las moléculas TNF- α , IL-6, MCP-1, adiponectina, leptina, resistina y ácidos grasos libres a nivel plasmático.

4. Establecer si existe una relación entre el grado de respuesta de las lipoproteínas ricas en TG con los niveles de expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.



**V. DISEÑO Y
METODOLOGÍA**

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Este estudio se ha realizado siguiendo la metodología del proyecto europeo del LIPGENE “*Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis*” (NCT00429195). Un grupo de 75 pacientes (28 hombres y 47 mujeres) con SM completaron el estudio de lipemia postprandial de las fases de pre- y post-intervención. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado y se les realizó una historia médica completa, un reconocimiento físico y análisis clínicos antes de comenzar el estudio. El SM se definió según los criterios del ATP III^{48, 49}, cuando los pacientes presentaron tres o más de las siguientes características:

- Concentración de glucosa en ayunas: ≥ 5.5 mmol/L (≥ 100 mg/dL).
- Niveles de triglicéridos en plasma: ≥ 1.7 mmol/L (≥ 150 mg/dL).
- Concentración de C-HDL en plasma: < 1.0 mmol/L (< 40 mg/dL) en hombres y < 1.3 mmol/L (< 50 mg/dL) en mujeres.
- Presión sanguínea: $\geq 130/85$ mmHg.
- Perímetro de cintura: > 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres.

Este ensayo clínico se realizó en la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Hospital Universitario Reina Sofía, de febrero de 2005 a abril de 2006. El protocolo experimental fue aprobado por el comité ético del centro de intervención, de acuerdo con la declaración de Helsinki.

1.1 Cálculo del tamaño muestral

Se realizó basándose en las siguientes premisas:

- Variable principal del estudio: Activación del NF-kB
- Desviación estándar de la variable principal del estudio: 1,2
- Diferencia mínima esperada: 1 ($H_0=2,31$; $H_1=1,31$; $r=0,6$)
- Riesgo alfa= 0,05
- Potencia ($1-\beta$)= 0,90
- En base a estas premisas, se precisan al menos, un total de 10 pacientes por grupo estudiado.

1.2 Criterios de inclusión

Se determinaron los criterios de inclusión de acuerdo a los establecidos en la realización del estudio *LIPGENE*. De este modo fueron admitidos los pacientes que cumplieron los siguientes criterios:

1. Edad comprendida entre 35 y 70 años.
2. IMC entre 20 y 40 kg/m².
3. Concentración sérica de colesterol total \leq 8.0 mmol/l (144 mg/dl).
4. Medicación/suplementos nutricionales permitidos: antihipertensivos (incluyendo beta-bloqueantes), terapias hormonales, polivitamínicos y antioxidantes.
5. Fumadores y no fumadores.
6. Consumo de alcohol de forma no excesiva sin elevación de las enzimas hepáticas (AST y ALT).
7. Europeos de raza blanca.

1.3 Criterios de exclusión

Del mismo modo, se establecieron los siguientes criterios de exclusión, de acuerdo a los instaurados en el estudio *LIPGENE*:

1. Edad inferior a 35 o superior a 70 años.
2. Padecer diabetes u otros desórdenes endocrinos.
3. Enfermedades inflamatorias crónicas.
4. Enfermedades renales o hepáticas.
5. Anemia (hemoglobina <12 g/dl en hombres o <11 g/dl en mujeres)
6. Medicación hipolipemiante o antiinflamatoria concomitante.
7. Consumo de suplementos de ácidos grasos, incluyendo aceites de pescado, etc.
8. Consumo de altas dosis de vitaminas antioxidantes (A, C, E, β -caroteno).
9. Alto consumo de pescado (>2 piezas de pescado a la semana de arenques, caballa, sardinas, salmón, trucha, atún).
10. Realización de un ejercicio físico intenso más de 3 veces a la semana
11. Inicio de una dieta especial durante los 3 meses de duración del estudio.
12. Modificaciones del peso corporal en 3 o más kg durante los 3 meses de duración del estudio
13. Abuso de alcohol o de drogas.

14. Mujeres embarazadas o lactantes o mujeres que deseen quedarse embarazadas en los próximos 12 meses al estudio. Las mujeres que se queden embarazadas durante el estudio deberán abandonar el mismo.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

2.1 Estudio de intervención dietética

Cada voluntario fue aleatorizado para recibir uno de los cuatro periodos de intervención dietética de 12 semanas de duración de las que consta el estudio. La aleatorización de los participantes se realizó de acuerdo a la edad, al género y a la concentración de glucosa en plasma usando el programa de aleatorización MINIM (*Minimisation Programme for Allocating patients to 8 Clinical Trials, Dept of Clinical Epidemiology, the London Hospital Medical College, UK*). El diseño del estudio de intervención dietética se describió previamente en el artículo publicado por Shaw y cols⁴¹⁵ que aporta información detallada acerca del control del consumo de los alimentos durante el periodo de intervención dietética, la adherencia de los voluntarios a la dieta y detalles de la composición de los alimentos durante las fases de pre- y post-intervención del estudio.

La composición de las cuatro dietas del estudio fue la siguiente:

- Dieta Occidental, rica en SFA (HSFA): compuesta por un 15% de proteína (en relación al contenido calórico total (CCT)), 47% de HC del CCT y 38 % de grasa del CCT (16% de SFA, 12 % MUFA y 6% PUFA).
- Dieta alta en MUFA (HMUFA): con un 15% de proteína del CCT, 47% de HC del CCT y 38 % de grasa del CCT, distribuida de la siguiente forma: 8% SFA, 20% MUFA, 6% PUFA.
- Dieta baja en grasa y rica en HC complejos (LFHCC): compuesta por un 15% de proteína del CCT, 57% de HC del CCT y 28 % de grasa del CCT (8% SFA, 11% MUFA, 6% PUFA). Además, esta dieta se suplementó con un 1 g/d de aceite de girasol alto en ácido oleico (HOSO) en forma de cápsula.
- Dieta baja en grasa, alta en HC complejos y suplementada con PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino (LFHCC n-3): con un 15% proteína del CCT, 57% de HC del CCT y 28% de grasa del CCT (8% SFA, 11% MUFA, 6%

PUFA). Esta dieta fue suplementada con 1.24 g/d de PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino, en forma de cápsula (Marinol™ C-38, un concentrado natural de aceite de pescado con alto contenido en EPA y DHA).

La composición de cada cápsula de placebo (HOSO) y de Marinol™ C-38 de las dos dietas bajas en grasa del estudio se muestran en la **Tabla 2**:

Descripción:	Marinol™ C-38	Placebo HOSO
Ácidos grasos	g/100 g	g/100 g
C14:0	5	-
C16:0	10.5	3.5
C16:1	4.5	-
C17:0	0.2	-
C18:0	2.5	3.4
C18:1	8.0	79.2
C18:2	1.0	11.8
C18:3	0.5	0.2
C20:0	0.2	0.3
C20:1	1.1	0.3
C22:0	0.2	0.9
C24:0	0.2	0.3
C20:5	24	-
C22:6	17.5	-
Tocoferol natural	3.0 mg	3.0 mg

Tabla 2. Composición de las cápsulas de las dos dietas bajas en grasa del estudio.

Antes de comenzar el periodo de intervención dietética (semana 0), a la mitad del estudio (semana 6) y al finalizar el mismo (semana 12), todos los voluntarios completaron durante 3 días consecutivos un diario de consumo de alimentos en los que había que incluir pesos específicos de cada alimento ingerido y un extenso cuestionario de frecuencia de alimentos, que permitía la identificación de posibles errores en la ingesta y la posibilidad de su corrección. Al comienzo del periodo de intervención dietética, a los pacientes se les facilitó un manual con los distintos alimentos que podrían consumir según la dieta a la que habían sido aleatorizados, además, la experta en nutrición les asesoró sobre qué alimentos debían consumir fuera del hogar, los cuales debían ser anotados en el manual proporcionado con el fin de detectar incidencias en la alimentación. A los voluntarios se les proporcionó alimentos cada dos semanas a lo

largo de todo el estudio. Durante la visita para la recogida de alimentos, a los voluntarios se les pidió que hicieran un recordatorio de la comida consumida el día anterior, que fue evaluado con un sistema de puntos según los alimentos ingeridos. Además, dicha visita también sirvió para motivar a los voluntarios y para detectar posibles errores en el cumplimiento de las pautas de alimentación. Con el fin de analizar los alimentos consumidos durante las 12 semanas de duración del estudio se utilizó el programa informático “*Dietsource*”, versión 2.0.

2.2 Estudio de lipemia postprandial

Al comienzo del estudio (semana 0) y en el periodo de post-intervención (semana 12) a los pacientes se les realizó un estudio de lipemia postprandial, en el que consumieron una sobrecarga grasa en forma de desayuno con la misma composición que el periodo de intervención dietética que acababan de finalizar, y que estaba compuesto por 0.7 g de grasa /kg de peso, 5 mg/kg de peso de colesterol y 60.000 IU/m² por área de superficie corporal de Vitamina A, con la siguiente distribución calórica: 65% de grasa, 10% de proteína y 25% de HC. Para la obtención de las muestras de sangre los pacientes debían venir en ayunas, sin haber fumado desde el día anterior y sin beber alcohol una semana antes de la toma de muestras. Las extracciones sanguíneas para el tiempo basal se realizaron tras 12 horas de ayuno y antes de tomar el desayuno. Después de la sobrecarga grasa se realizaron extracciones de sangre a las 2 y 4 horas. Durante el periodo postprandial los participantes no consumieron más alimentos, aunque sí pudieron tomar agua.

La composición en grasa para el estudio de lipemia postprandial fue la siguiente:

1. Desayuno rico en SFA, a expensas de mantequilla (HSFA): 38% SFA, 21% MUFA, 6% PUFA.
2. Desayuno alto en MUFA, a expensas de aceite de oliva (HMUFA): 12% SFA, 43% MUFA, 10% PUFA.
3. Desayuno bajo en grasa y alto en HC complejos con placebo (LFHCC): 21% SFA, 28% MUFA, 16% PUFA (con 1g de aceite de girasol alto en ácido oleico).
4. Desayuno bajo en grasa y alto en HC complejos, suplementado con Marinol™ C-38 (LFHCC n-3): 21% SFA, 28% MUFA, 16% PUFA (con 1.24 g de PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino).

A continuación, en la **Figura 3** se muestra un esquema que resume el diseño del estudio:

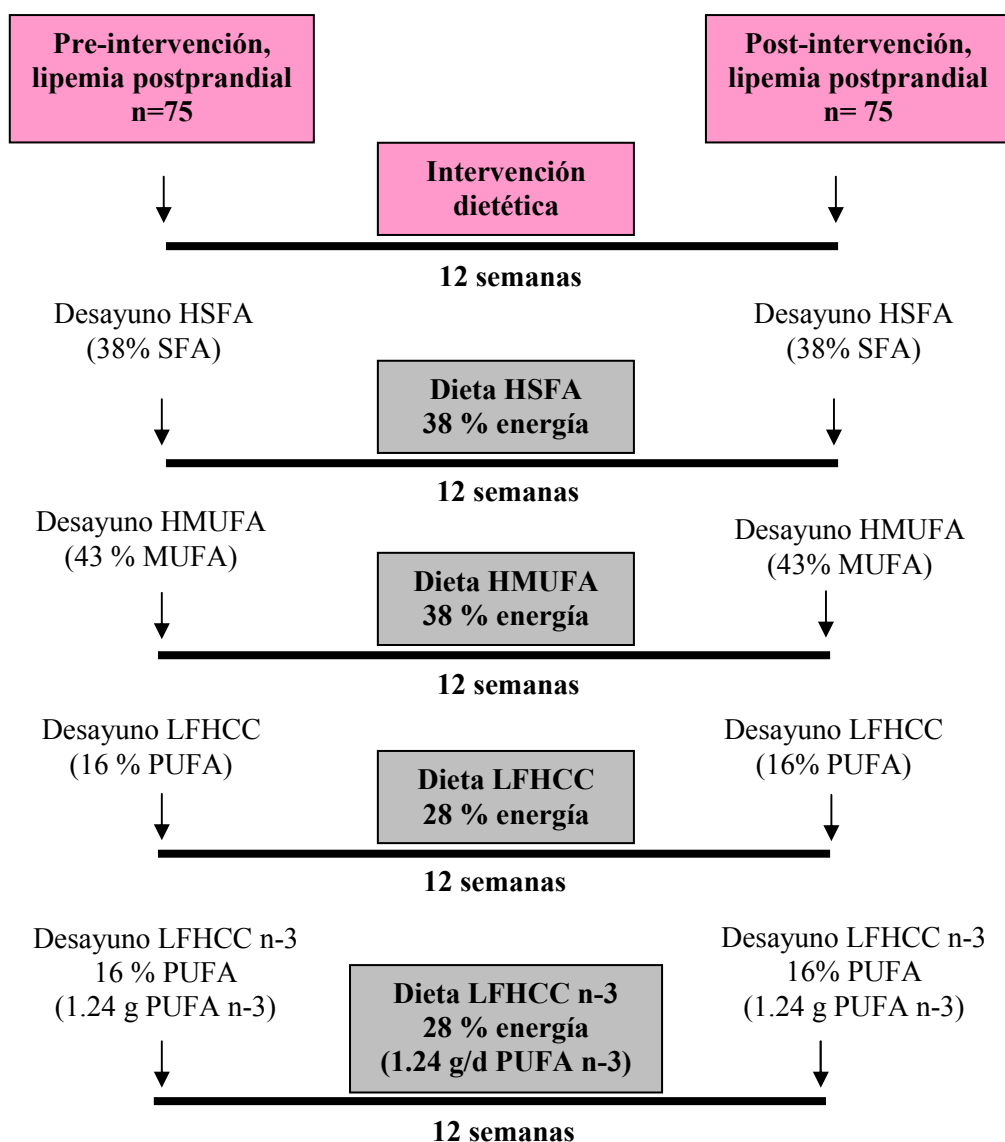


Figura 3. Diseño del estudio del Lipgene

3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.1 Extracciones sanguíneas

Las muestras de sangre fueron recogidas en tubos que contenían 1 mg/dL de ácido etilendiamino-tetracético (EDTA) para evitar la oxidación de las lipoproteínas y como

anticoagulante, y fueron depositadas en contenedores con hielo y mantenidas en la oscuridad.

3.2 Aislamiento del plasma

Inmediatamente después de la extracción sanguínea se procedió a la separación del plasma mediante centrifugación (3000 rpm, 10 min a 4°C). Las muestras de plasma se guardaron alicuotadas a -80 °C hasta la realización de las determinaciones para evitar las variaciones interensayo.

3.3 Análisis lipídico

La concentración de las diferentes variables lipídicas fue determinada utilizando un autoanizador modular (DDPPII Hitachi; Roche®, Basel, Switzerland), con reactivos específicos suministrados por Boehringer-Mannheim®. El colesterol total, los TG y las fracciones lipoproteicas fueron determinados mediante procedimientos enzimáticos. Los niveles de apolipoproteína A1 y de apolipoproteína B se determinaron mediante inmunoturbidimetría⁴¹⁶. El c-HDL se determinó analizando el sobrenadante obtenido tras la precipitación de una alícuota con dextrano sulfato-Mg²⁺. Los niveles de c-LDL se determinaron mediante la fórmula de Friedewald⁴¹⁷ basada en las concentraciones de colesterol total, TG y c-HDL.

3.4 Aislamiento de células mononucleares

Muestras sanguíneas de 15 mL fueron diluidas volumen/volumen (v/v) en tampón fosfato salino (PBS) y fueron separadas en un gradiente de Ficoll (solución de aislamiento de CMNs, Rafer) por centrifugación a 2500 rpm, 25 min a 20 °C. La capa de CMNs fue recogida y lavada dos veces en PBS a 1800 rpm, 10 min a 4°C. Seguidamente, las células se resuspendieron en “Buffer A” (10 mM ácido N-2 hidroxietil-piperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) [pH=7.8], 15 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM ditioneitol (DTT) y 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)) para la posterior extracción de las proteínas y en TRIZOL (Tri®Reagent, Sigma, St Louis, MO) para el aislamiento del ARN. Una vez finalizados estos pasos, todas las muestras se guardaron congeladas a -80 °C.

4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NF- κ B y WESTERN BLOTTING

4.1 Extracción de proteínas

Los lisados nucleares y citoplasmáticos de CMNs se prepararon siguiendo el método descrito por Hernández-Presa y cols⁴¹⁸. Las CMNs que anteriormente se congelaron en “buffer A”, fueron descongeladas en hielo y se suplementaron con 10 μ g/mL de un cóctel inhibidor de proteasas (CLAP-quimiostatina, leupeptina, aprotinina y pepstatina) y 1% de Nonidet NP-40. Las células se incubaron en hielo durante 5 min sujetas a agitaciones suaves de 20 s con el vórtex, posteriormente se sometieron a una centrifugación de 13000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido contenía las proteínas citoplasmáticas que se guardaron a -80°C. El pellet se trató con otra solución de lisis (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT y 10 μ g/mL CLAP). Las muestras se incubaron 20 min en hielo y durante este periodo se mezclaron durante 30 s con el vórtex cada 5 min de incubación. Posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante obtenido contenía las proteínas nucleares que se guardaron a -80°C. La concentración de proteínas fue determinada por el kit 2-D Quant (GE Healthcare), con la albúmina como proteína estándar.

4.2 Determinación de la actividad nuclear del NF- κ B (p65)

Se utilizó la técnica de “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay” (ELISA) mediante el kit “NF- κ B (p65) Transcription Factor Assay” de Cayman Chemical siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, 25 μ g de cada uno de los extractos nucleares, previamente congelados a -80°C, se diluyeron en *Complete Transcription Factor Binding Assay Buffer (CTFB)* y se añadieron a los pocillos de la placa, incubando toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó la placa 5 veces usando *Wash Buffer* a razón de 200 μ L por pocillo. Posteriormente, se añadió 100 μ L del anticuerpo primario para el NF- κ B (p65) diluido 1:100 a cada pocillo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Tras 5 lavados, se añadió 100 μ L de anticuerpo secundario (*Goat anti-rabbit HRP*) diluido 1:100 y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este periodo se repitió el proceso de lavado y se añadió 100 μ L de *Developing solution* a cada pocillo, incubando la placa 45 min en oscuridad. Para parar

la reacción se añadieron 100 μ L de *Stop solution* y se determinó la densidad óptica usando un lector de placas (Multimode Detector, DTX 880 (Beckman Coulter)) a 450 nm.

4.3 Western Blotting

La identificación y visualización de las proteínas de interés se realizó mediante Western Blot, que se basa en técnicas de inmunodetección que emplean la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos a sus antígenos. Por inmunodetección indirecta se usa un anticuerpo primario para localizar la proteína de interés y un anticuerpo secundario, marcado con una enzima, y contra la especie en la que se ha producido el primero, para localizar donde se formaron los complejos antígeno-anticuerpo. Para el Western Blot se utilizaron tanto extractos citosólicos como nucleares. En geles de poli(acrilamida) (10% poli(acrilamida)) se corrieron 40 μ g de muestra y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se determinaron los niveles de p65, I κ B- α , TFIIB y β -Actina, usando anticuerpos monoclonales y policlonales contra estas proteínas. A continuación se detalla, punto por punto, el protocolo empleado para realizar el Western Blot:

- La **electroforesis** de las proteínas se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida) (electroforesis PAGE, del inglés *polyacrilamide gel electrophoresis*) utilizando el sistema *Mini-Protean 3* (Bio-Rad), en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando como detergente el SDS (sodiododecilsulfato; Sigma). Se utilizaron geles al 10% de poli(acrilamida).

La composición del gel de separación fue:

10% Acrilamida/bis (Bio-Rad); Tris-HCl 0.375 M, pH=8,8; 0.1% SDS; 0.1 % persulfato amónico (Sigma) y 0.01 % TEMED (N,N,N,N'-tetrametilendiamina, Sigma).

La composición del gel de concentración fue:

4% Acrilamida/bis (Bio-Rad); Tris-HCl 0.125 M, pH=6.8; 0.1% SDS; 0.1% persulfato amónico y 0.01% TEMED.

- Para la **preparación de las muestras**, se mezcló 40 μ g de proteína con tampón de carga, compuesto por: Tris-HCl 62.5 mM, pH=6.8; β -mercaptoetanol; glicerol 10 % (v/v); SDS 2%; azul de bromofenol 0.02 % y una incubación de 15 min a temperatura ambiente para desnaturalizar las proteínas. Una vez preparados los geles, se montó la

cubeta de electroforesis, se cargaron las muestras y se cubrieron con *running buffer* (Tris-base 0.025 M, pH=8.3; Glicina 0.192 M; 0.1% SDS). La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100 V.

- La **transferencia de proteínas** consiste en la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas para su posterior detección. Después de separar las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño que el gel, de 0.45 µm de poro, mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Para realizar la transferencia los geles se colocaron entre dos trozos de papel *watman (Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad)* y sobre la membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience), previamente incubados en tampón de transferencia (Tris base 0.025 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.02% y 20% de metanol; Sigma) y se depositaron en un sistema de transferencia semi-seco (Bio-Rad) 45 min, a amperaje constante de 250 mA y con un voltaje no superior a 25 V. Para verificar la transferencia se utilizó la tinción con rojo *Ponceau S* (Sigma), un colorante no permanente que fue eliminado mediante lavados con agua destilada. En este punto se comprobó mediante la comparación de la intensidad de la coloración de los distintos carriles la igualdad de carga de proteína.

- El **bloqueo de la membrana** consiste en la saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos, evitando ruido de fondo o falsos positivos. Las membranas fueron bloqueadas durante toda la noche y en agitación a 4°C con leche al 5%.

- Una vez finalizado el bloqueo y antes de la **incubación con los anticuerpos primarios**, se realizaron dos lavados de 15 min con TTBS (Tris 0.01 M; Tween 20 al 0.2% (v/v); NaCl 0.1M; pH=7.5; Sigma) y uno de 15 min con TBS (Tris 0.01 M; NaCl 0.1 M; pH=7.5; Sigma) y se marcó la membrana con anticuerpos primarios contra las proteínas de interés diluidos en leche al 3% en TTBS durante 1 h en agitación suave y a temperatura ambiente. Los anticuerpos y diluciones empleadas fueron los siguientes:

- Policlonal de conejo anti-IkB-α (C-21: sc-371, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluido 1:250 en leche al 3%.

- Policlonal de conejo anti NF-kB (p65) (C-20: sc-372, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluido 1:250 en leche al 3%.

- Policlonal de conejo anti-TFIIB (C-18: sc-225, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), diluido 1:250 en leche al 5%.

- Monoclonal de ratón anti- β -actina (clon AC-15: A5441, Sigma), diluido 1:300000 en leche al 3%.

Pasado este tiempo se realizaron dos lavados con TTBS y uno con TBS durante 15 min cada uno.

- Posteriormente se procedió a la **incubación con los anticuerpos secundarios**, unidos a enzimas que actúan de ligando del anticuerpo primario. En concreto, se utilizaron anti-IgG de conejo (A8275, Sigma) a una dilución de 1:5000 o anti-IgG de ratón (A9044, Sigma) a una dilución de 1:10000, ambos conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) y en leche al 3%. Las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Tras esta incubación se procedió al lavado de la membrana: dos veces con TTBS y una vez con TBS durante 15 min cada uno.

- Durante el **revelado**, las bandas de proteínas marcadas con enzimas se hacen visibles por incubación con los sustratos apropiados para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína. En el presente estudio, se utilizaron anticuerpos marcados con peroxidasa de rábano, una enzima que cataliza la oxidación del reactivo luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciendo así una reacción quimioluminiscente que desprende energía en forma de luz. Para el revelado se usó el reactivo *ECL Advance* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) con el cual se incubaron las membranas durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se revelaron con el CHEMI DOC XRS (BIORAD, Barcelona, España), que realiza fotografías a las membranas a distintos tiempos de incubación con el *ECL Advance*.

4.4 Cuantificación de las bandas de proteína

Las proteínas se identificaron por su posición relativa a los marcadores de peso molecular: 36 kDa para I κ B- α , 65 kDa para NF- κ B (p65), 30 kDa para TFIIB y 42 kDa para β -actina. La cantidad relativa de cada una de estas proteínas se cuantificó mediante densitometría usando el software Quantity One, versión 4.4.0 (BIORAD, Barcelona, España). Los resultados se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

5. EXTRACCIÓN DEL ARN DE CÉLULAS MONONUCLEARES Y qRT-PCR DE GENES INFLAMATORIOS REGULADOS POR EL NF- κ B

5.1 Extracción del ARN

Las CMNs obtenidas de las muestras de sangre en los tiempos 0, 2 y 4 horas que, previamente fueron congeladas a -80°C en *TRIZOL*, se descongelaron e incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Tras la adición de 200 μL de CHCl_3 y agitación con vórtex, las muestras se dejaron 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 12000 rpm, 15 min a 4°C y al sobrenadante se le añadió 500 μL de isopropanol y se agitó con vórtex. Después de 10 min a temperatura ambiente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm, 10 min a 4°C . Una vez centrifugadas se procedió a su lavado. El primer lavado se realizó con 1 mL de etanol frío al 100 % y el segundo con 1 mL de etanol frío al 70 %, centrifugando al finalizar cada lavado a 12000 rpm, 10 min a 4°C . Una vez terminado este proceso se dejaron secar las muestras. El pellet, una vez seco, se resuspendió en H_2O libre de RNAsas y se congeló a -80°C . A todas las muestras se les calculó la concentración a 260 nm y la pureza del ARN (absorbancia a 260 nm / 280 nm, ratio entre 1,8 y 2) con el uso del espectrofotómetro “Nanodrop 1000 A”. La integridad de las muestras de ARN se verificó mediante electroforesis en un gel al 1,2 % de agarosa.

5.2 Eliminación del ADN

Para eliminar la posible contaminación de las muestras de ARN con ADN genómico, a continuación, se procedió al empleo del kit *AMP-DI* (Sigma), el cual consiste en el uso de una endonucleasa que digiere ADN de cadena sencilla y doble. A 1 μg de ARN diluido en H_2O libre de RNAsas se le añadió 1 μL de 10X *Reaction Buffer* (0.2 M Tris-HCl, pH=8,3, 0.020 M MgCl_2) y 0,33 μL de la enzima *DNase I* (1 unidad/ μL en 50 % glicerol, 0.010 M Tris-HCl, pH 7,5, 0.010 M CaCl_2 y 0.010 M MgCl_2). Se incubó durante 45 min a 30°C y, posteriormente se añadió 0,33 μL de *Stop solution* (0.050 M EDTA) para inactivar la enzima. Las muestras se calentaron 10 min a 70°C para inactivar la DNAsa I y se pusieron en hielo para, a continuación, realizar la transcripción inversa.

5.3 Transcripción inversa

Para su realización se usó el kit *iScript*TM *cDNA Síntesis* (Biorad). El propósito del kit es la conversión cuantitativa del ARN a ADN copia de cadena sencilla. Los reactivos del kit, al combinarlos, forman una mezcla de reacción, a la que se le añade la muestra de ARN. La mezcla de reacción fue la siguiente:

	<u>Concentración final</u>
- 5x <i>iScript</i> Reaction Mix	1X
- <i>iScript</i> Reverse Transcriptase	5U
- ARN	1 µg

La cantidad se ajustó en base al volumen final de la reacción (20 µL) con H₂O libre de RNAsas. Las condiciones de incubación usadas en el termociclador (PTC-100TM Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc) fueron las siguientes:

- 5 min a 25°C
- 30min a 42°C
- 5 min a 85°C

El ADN copia que se obtuvo del proceso se guardó a -80°C hasta la realización de la PCR cuantitativa o PCR a tiempo real.

5.4 PCR a tiempo real

Para la realización de la PCR cuantitativa se usó el kit *iQ*TM SYBR® Green Supermix 2X (BIORAD). Se midió la expresión de distintos genes regulados por el NF-κB: IκB-α, p65, TNF-α, MMP-9, MCP-1, MIF, IL-1β, IL-8 e IL-6 con el termociclador “iQ5” de BIORAD. Todas las medidas se realizaron por duplicado. La especificidad y el producto de PCR se comprobaron mediante la curva de “melting” (65-95°C con un rango de calentamiento de 0.5°C/s y la lectura continua de fluorescencia) y por electroforesis en un gel al 2% de agarosa. La expresión de cada gen se normalizó con la señal para el gen constitutivo de *Homo sapiens ribosomal protein L13a*. La mezcla de reacción por pocillo fue la siguiente:

	<u>Concentración final</u>
- <i>iQ</i> TM SYBR® Green Supermix 2X	1X
- Oligonucleótidos	10 µM
- ADN copia	10 ng
- H ₂ O libre de RNAsas	hasta volumen final

La cantidad se ajustó en base al volumen de reacción (20µL) y se añadió a la placa de 96 pocillos. Las condiciones usadas en el termociclador se representan en la **Tabla 3**:

Termociclador	Tiempos y temperaturas						
“iQ5” <i>Real-Time</i> <i>PCR System</i> (BIORAD)		40 ciclos de amplificación			Curva de <i>melting</i>		
	Paso inicial	Desnaturalización	Ensamblaje	Extensión			
	10 min 95 °C	30 seg 95 °C	30 seg 60 °C	30 seg 72 °C	1 min 95 °C	30 seg 65 °C	5 seg 95 °C

En la **Tabla 4** se presentan los oligonucleótidos usados en la PCR a tiempo real y la longitud, en pares de bases (pb), del producto amplificado:

Gen	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Producto PCR
RPL13a	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	126 pb
MIF	CTCTCCGAGCTCACCCAGCAG	CGCGTTCATGTCGTAATAGTT	255 pb
MMP-9	CCCATTTCGACGATGACGAGTTGTG	GGAGTAGGATTGGCCTTGGGAAGATG	296 pb
TNF-α	AAGAGTTCCCCAGGGACCTCT	CCTGGGAGTAGATGAGGTACA	233 pb
IL-6	CACCTCTTCAGAACGAATTGACAAC	CTCATTGAATCCAGATTGGAAGC	183 pb
P65	CCCTGTCCTGATGGTCAGCTCCCT	CTCAAACGCTGGTGTAGGCACAGGG	240 pb
MCP-1	CATGAAAGTCTCTGCCGCCCT	CACTTGCTGCTGGTGTATTCTTCTAT	176 pb
IκB-α	CACTCCATCCTGAAGGCTACCAAC	CACACTCAACAGGAGTGACACCAG	202 pb
IL-1β	CAGGGACAGGATATGGAGCAA	GCAGACTCAAATTCCAGCTTGTTA	251 pb
IL-8	GGTGCAGAGGGTTGTGGAGAAGTT	CATGAAGTGTTGAAGTAGATTTGC	200 pb

6. MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE CITOQUINAS Y ADIPOQUINAS

6.1 Cuantificación de la MCP-1 humana en plasma-citrato

La determinación se realizó mediante la técnica de ELISA (kit de R&D Systems). Las muestras de plasma, previamente congeladas a -80 °C, se diluyeron a la mitad con el *Calibrator Diluents RD6Q*. A cada pocillo de la placa se le añadió 50 µL de *Assay*

Diluent RD1Y y 200 μL de la muestra o estándar, incubándose durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lavó la placa 3 veces usando *Wash Buffer* a razón de 400 μL por pocillo. Posteriormente, se añadió 200 μL del *MCP-1 Conjugate* y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados, se añadió 200 μL de *Substrate Solution* a cada pocillo y, protegido de la luz, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Para parar la reacción se añadieron 50 μL de *Stop Solution* y se determinó la densidad óptica usando un lector de placas (SPECTRA Fluor, Tecan) a 450 nm con una corrección a 570 nm.

6.2 Determinación cuantitativa de la IL-6 humana en plasma-EDTA

Para la determinación de la IL-6 en plasma se utilizó la técnica de ELISA mediante el kit de la casa comercial R&D Systems de alta sensibilidad. Las muestras de plasma, previamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se diluyeron en *Calibrator Diluent RD6-11*. En primer lugar, a cada pocillo de la placa de ELISA se le añadió 100 μL de *Assay Diluent RD-75* y 100 μL del estándar o muestra. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en agitación suave. Tras 6 lavados con *Wash Buffer* se añadieron 200 μL de *IL-6 Conjugate* a cada pocillo y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente en agitación suave. A continuación, se repitió el proceso de lavado, se añadieron 50 μL de *Substrate Solution* y se dejó durante 60 min a temperatura ambiente. Tras este periodo, se añadió 50 μL de *Amplifier Solution* a cada pocillo y se dejó incubar durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, se añadió 50 μL de *Stop Solution* a cada pocillo y se determinó la densidad óptica usando un lector de placas (SPECTRA Fluor, Tecan) a 490 nm con una corrección a 650 nm.

6.3 Determinación cuantitativa del TNF- α humano en plasma-citrato

La determinación cuantitativa del TNF- α se realizó mediante la técnica de ELISA (kit de R&D Systems de alta sensibilidad). En cada pocillo se añadió 50 μL de *Assay Diluent RD1F* y 200 μL de muestra o estándar, incubando 3 h a temperatura ambiente. A continuación, se procedió al lavado de la placa. Tras 6 lavados con *Wash Buffer*, se añadieron 200 μL de *TNF- α Conjugate* y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se realizó un segundo lavado y se añadió 50 μL de *Substrate Solution*

durante 60 min a temperatura ambiente. Transcurrida esta incubación, se procedió a la adición de 50 μL de *Amplifier Solution*, dejándolo 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 50 μL de *Stop Solution* y se determinó la densidad óptica mediante el lector de placas (SPECTRA Fluor, Tecan) a 490 nm con una corrección a 690 nm.

6.4 Cuantificación de resistina humana en plasma-EDTA

La detección de resistina en plasma se realizó mediante la técnica de ELISA con un kit de la casa comercial R&D Systems. Se añadieron 100 μL de *Assay Diluet RDI-19* y 100 μL de muestra o estándar por pocillo, incubándolo 2 h a temperatura ambiente. Tras este periodo, se lavó la placa 4 veces con *Wash Buffer* y se añadieron 200 μL de *Resistin Conjugate*, incubando durante 2 h a temperatura ambiente. Tras 4 lavados, se añadió 200 μL de *Substrate Solution* a cada pocillo y, protegido de la luz, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Para parar la reacción se añadieron 50 μL de *Stop Solution* y se determinó la densidad óptica usando un lector de placas (SPECTRA Fluor, Tecan) a 450 nm con una corrección a 570 nm.

6.5 Determinación de leptina humana en plasma-EDTA

Para la determinación de Leptina se utilizó la técnica de ELISA (kit R&D Systems). En primer lugar, a cada pocillo se añadieron 100 μL de *Assay Diluet RDI-19* y 100 μL de muestra o estándar, incubándolos 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se procedió al lavado de la placa. Tras 4 lavados con *Wash Buffer*, se añadieron 200 μL de *Leptin Conjugate* y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se repitió el proceso de lavado y después se añadió 200 μL de *Substrate Solution* a cada pocillo, manteniendo la placa protegida de la luz durante 30 min a temperatura ambiente. Para parar la reacción se añadieron 50 μL de *Stop Solution* y se determinó la densidad óptica mediante un lector de placas (SPECTRA Fluor, Tecan) a 450 nm con una corrección a 570 nm.

6.6 Cuantificación de adiponectina humana en plasma-EDTA

La determinación de adiponectina en plasma se realizó mediante la técnica de ELISA con el kit de la casa comercial R&D Systems. Se añadieron 100 μL de *Assay Diluent RDIW* y 50 μL de muestra o estándar por pocillo, incubando 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se procedió al lavado de la placa. Tras 4 lavados con *Wash Buffer*, se añadieron 200 μL de *Adiponectin Conjugate* y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Tras este paso se repitió el lavado de la placa y se añadió 200 μL de *Substrate Solution* a cada pocillo donde, protegida de la luz, se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Para parar la reacción se añadieron 50 μL de *Stop Solution* y se determinó la densidad óptica usando un lector de placas (SPECTRA Fluor, Tecan) a 450 nm con una corrección a 570 nm.

7. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES EN PLASMA-EDTA

La determinación de los NEFA en plasma se realizó mediante un ensayo colorimétrico enzimático (kit de Roche Applied Science). En primer lugar, se mezcló en una cubeta 1 mL de *Reaction mix A* y 50 μL de muestra y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. En segundo lugar, se añadió 50 μL de *N-ethyl-maleinimide-solution*, se mezcló y se leyó la absorbancia de las soluciones. Posteriormente, se añadió 50 μL de *Reaction mix B* a cada cubeta y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, después se leyó la absorbancia de las soluciones. Los cálculos se realizaron mediante la diferencia entre la lectura de la segunda absorbancia con respecto a la lectura de la primera absorbancia.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como programa estadístico se usó el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, versión 17.0 for Windows Inc, USA). Todos los datos en el texto, las tablas y las figuras están expresados como $\text{media} \pm \text{error estándar de la media}$. La distribución

normal de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, siendo transformadas logarítmicamente todas aquellas variables que no cumplieran los criterios de normalidad. Con el fin de determinar el efecto de los distintos tipos de dieta consumidas sobre cada una de las variables estudiadas, así como el efecto de las distintas sobrecargas grasas administradas al final de cada periodo de intervención dietética sobre las respuestas postprandiales en los parámetros analizados, se realizó un test de *t* de Student, un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y un ANOVA para medias repetidas en el que ajustamos por las covariables de género y fumador. En este último análisis, estudiamos el efecto del tiempo y también los cambios de esta variable después de la ingesta de las distintas grasas del estudio sobre el periodo postprandial (representado como *P tiempo*); el efecto de la grasa administrada independientemente del tiempo en el estudio postprandial (representado como *P dieta*). Además, se estudió el efecto de la interacción entre las distintas grasas consumidas y el tiempo, lo cual es indicativo de la magnitud de la respuesta postprandial de cada sobrecarga grasa (representado como *P interacción*). Cuando se observaron diferencias significativas se utilizó el test de Bonferroni para identificar las diferencias existentes entre cada grupo. El contraste estadístico usado cuando el criterio de esfericidad no se cumplía fue el de *Greenhouse Geisser*. Por otro lado, para determinar la correlación existente de los marcadores inflamatorios entre sí y con los niveles plasmáticos de TG y de las LRTs se usó el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Se consideraron significativos los valores de $P < 0.05$.



VI. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES AL COMIENZO DEL ESTUDIO

Para la realización de este estudio se seleccionaron 75 pacientes (28 hombres y 47 mujeres) con criterios de SM. Todos ellos completaron el periodo de intervención dietética y el estudio de lipemia postprandial de las fases de pre- y post-intervención.

En la **Tabla 5** se muestran las características basales de los diferentes grupos de voluntarios seleccionados para el estudio (fase de pre-intervención).

	HSFA (n=17)	HMUFA (n=18)	LFHCC (n=20)	LFHCC n-3 (n=20)	Valor P
Edad (Años)	58.5±7.9	54.6±7.8	56.3±8.3	55.3±6.5	0.449
IMC (kg/m ²)	35.2±3.5	34.4±3.4	35.4±2.9	35.5±0.6	0.798
Presión sistólica (mmHg)	151.8±13.6	145.1±18.7	149.7±17.3	149.8±19.3	0.706
Presión diastólica (mmHg)	89.3±9.7	93.5±1.3	91.3±8.3	93.6±9.1	0.767
Colesterol total (mmol/L)	5.2±0.2	4.9±0.2	5.3±0.2	4.9±0.2	0.405
TG total (mmol/L)	1.9±0.3	1.6±0.1	1.6±0.1	1.5±0.2	0.654
c-LDL (mmol/L)	3.5±0.2	3.4±0.1	3.8±0.2	3.4±0.2	0.374
c-HDL (mmol/L)	1.1±0.06	1.1±0.06	1.1±0.06	1.1±0.05	0.834
Apolipoproteína B (g/L)	0.92±0.04	0.89±0.04	1.01±0.05	0.90±0.05	0.291
Apolipoproteína A-1 (g/L)	1.33±0.04	1.35±0.05	1.35±0.05	1.30±0.04	0.876
Glucosa (mmol/L)	6.1±0.2	6.3±0.2	5.7±0.12	6.2±0.3	0.288
Insulina (mU/L)	13.4±1.3	13.3±1.3	12.4±1.0	14.7±1.2	0.579
Indice HOMA	3.7±0.4	3.6±0.3	3.1±0.2	4.1±0.4	0.260
PCR (mg/L)	3.6±0.6	4.2±1.1	3.4±1.0	3.7±0.8	0.947

Tabla 5. Características basales de los participantes del estudio en la fase de pre-intervención.

Los resultados mostrados son la media±EEM de 75 voluntarios. ANOVA de un factor. IMC: índice de masa corporal; c-HDL: colesterol vehiculizado en la lipoproteína de alta densidad; c-LDL: colesterol vehiculizado en la lipoproteína de baja densidad. PCR: proteína C reactiva; HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; TG: triglicéridos; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

En el estado basal, no objetivamos diferencias significativas entre los grupos de pacientes asignados a cada una de las 4 dietas (periodo de ayunas).

2. COMPOSICIÓN DE LOS ALIMENTOS DEL ESTUDIO

	HSFA	HMUFA	LFHCC	LFHCC n-3
Objetivo				
%E de grasa	38	38	28	28
%E de SFA	16	8	8	8
%E de MUFA	12	20	11	11
%E de PUFA	6	6	6	6
EPA y DHA total (g/d)				1.24
N (Semana 0)	17	18	20	20
Energía (MJ/d)	8.8 ± 0.5	8.1 ± 0.4	8.5 ± 0.4	8.8 ± 0.4
%E de grasa	43.3 ± 1.3	42.8 ± 1.2	41.4 ± 1.1	45.5 ± 1.4
%E de SFA	11.6 ± 0.5	10.7 ± 0.5	10.2 ± 0.4	12.0 ± 0.4
%E de MUFA	20.9 ± 0.9	21.7 ± 0.7	20.4 ± 0.7	22.7 ± 0.9
%E de PUFA	4.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2
%E de HC	37.6 ± 1.3	38.9 ± 1.0	40.9 ± 1.3	36.6 ± 1.7
%E de protein	17.2 ± 0.5	17.7 ± 0.7	16.6 ± 0.6	16.8 ± 0.5
EPA y DHA total (g/d)	0.4 ± 0.06	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.07	0.4 ± 0.06
N (Semana 6)	17	18	20	20
Energía (MJ/d)	7.8 ± 0.4	7.8 ± 0.4	7.8 ± 0.4	8.7 ± 0.4
%E de grasa	40.4 ± 0.8*	38.5 ± 0.5*	26.5 ± 0.8†	26.7 ± 0.8†
%E de SFA	17.5 ± 0.5*	8.9 ± 0.3†	6.3 ± 0.4‡	6.6 ± 0.4‡
%E de MUFA	13.1 ± 0.4*	20.3 ± 0.4†	10.8 ± 0.4‡	11.2 ± 0.4‡
%E de PUFA	6.0 ± 0.2	5.7 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.1
%E de HC	38.5 ± 1.2*	41.8 ± 0.8*	51.9 ± 1.2†	52.9 ± 0.8†
%E de protein	18.9 ± 0.5	19.2 ± 0.5	20.5 ± 0.9	20.1 ± 0.6
EPA y DHA total (g/d)	0.4 ± 0.1*	0.5 ± 0.2*	0.5 ± 0.1*	1.7 ± 0.1†
N (Semana 12)	17	18	20	20
Energía (MJ/d)	8.2 ± 0.4	7.7 ± 0.4	7.7 ± 0.4	9.2 ± 0.5
%E de grasa	40.3 ± 0.5*	40.2 ± 0.7*	27.1 ± 0.5†	26.5 ± 0.5†
%E de SFA	17.9 ± 0.3*	9.1 ± 0.4†	6.6 ± 0.2‡	6.4 ± 0.3‡
%E de MUFA	12.8 ± 0.3*	21.1 ± 0.3†	11.5 ± 0.2‡	11.1 ± 0.3‡
%E de PUFA	6.1 ± 0.3	5.7 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.0 ± 0.2
%E de HC	38.3 ± 1.0*	40.7 ± 1.0*	51.2 ± 1.1†	54.1 ± 0.9†
%E de protein	19.2 ± 0.7*	19.2 ± 0.7*	21.2 ± 0.9†	18.8 ± 0.6*
EPA y DHA total (g/d)	0.4 ± 0.1*	0.4 ± 0.1*	0.5 ± 0.08*	1.8 ± 0.1†

Tabla 6. Composición de los alimentos consumidos al comienzo del estudio (semana 0), en el periodo intermedio (semana 6) y al final del periodo de intervención (semana 12), así como el objetivo dietético del estudio.

EPA y DHA total, % E de SFA, MUFA y grasas fueron transformados logarítmicamente antes del análisis estadístico. Los valores están representados como $\text{media} \pm \text{EEM}$. Las diferencias entre grupos ($P < 0.05$) se realizaron mediante una ANOVA de un factor. *, †, ‡ Los valores medios dentro de una misma fila con diferentes símbolos son estadísticamente significativos. E: energía; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

En la **Tabla 6** se muestra la composición de los alimentos al comienzo (semana 0), en el periodo intermedio (semana 6) y a la finalización del estudio (semana 12), así como el objetivo dietético que se deseaba alcanzar en el estudio. Aunque es difícil garantizar la adherencia a las instrucciones dietéticas en un ensayo de intervención, los estándares recomendados de los hábitos alimentarios fueron adecuados, a juzgar por los objetivos alcanzados en nuestro estudio.

Al comienzo del estudio (semana 0) no se observaron diferencias significativas en la composición de las dietas. Sin embargo, en la fase intermedia del estudio (semana 6) y al final del periodo de intervención dietética (semana 12) sí se observaron cambios significativos: el % de E en forma de grasa fue significativamente menor en las dietas bajas en grasa comparadas con las dos dietas altas en grasa. El % de E como SFA fue más alto en la dieta HSFA comparada con el resto de las dietas en estudio. Además, también se observó un % de E como SFA mayor en la dieta HMUFA comparado con las dos dietas bajas en grasa. Los niveles de MUFA en la dieta HMUFA fueron más altos comparados con el resto de las dietas. Además, el % E como MUFA también fue mayor en la dieta HSFA si lo comparamos con las dietas LFHCC y LFHCC n-3. Los porcentajes de HC fueron mayores en las dos dietas bajas en grasa comparadas con las dietas HSFA y HMUFA. Los niveles de EPA y DHA (g/d) fueron más elevados en la dieta LFHCC n-3 que en el resto de las dietas del estudio.

3. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES TRAS EL PERIODO DE INTERVENCIÓN DIETÉTICA

En la **Tabla 7** se muestran las características basales de los pacientes del estudio después del periodo de intervención dietética (periodo post-intervención).

	HSFA (n=17)	HMUFA (n=18)	LFHCC (n=20)	LFHCC n-3 (n=20)	Valor P
Edad (Años)	58.5±1.9	54.6±1.8	56.3±1.3	55.3±1.4	0.449
IMC (kg/m ²)	35.2±0.9	34.8±0.8	35.0±0.7	34.7±0.8	0.904
Presión sistólica (mmHg)	148.0±3.6	133.7±3.8	140.9±3.2	143.9±3.1	0.628
Presión diastólica (mmHg)	87.2±2.4	89.7±2.2	90.3±1.8	87.8±2.4	0.961
Colesterol total (mmol/L)	5.1±0.2	4.8±0.1	4.9±0.2	4.6±0.2	0.362
TG total (mmol/L)	1.7±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1	1.4±0.1	0.614
c-LDL (mmol/L)	3.4±0.1	3.3±0.1	3.4±0.2	3.1±0.2	0.520
c-HDL (mmol/L)	1.05±0.05	1.09±0.06	1.05±0.05	1.01±0.04	0.728
Apolipoproteína B (g/L)	0.88±0.02	0.87±0.03	0.93±0.04	0.85±0.05	0.574
Apolipoproteína A-1 (g/L)	1.32±0.04	1.30±0.05	1.24±0.03	1.19±0.04	0.167
Glucosa (mmol/L)	5.9±0.2	6.2±0.2	5.5±0.19	6.0±0.2	0.076
Insulina (mU/L)	13.4±1.5	14.3±1.6	11.7±1.2	14.3±1.0	0.435
Indice HOMA	3.5±0.4	3.6±0.3	2.9±0.3	3.5±0.2	0.239
PCR (mg/L)	4.3±0.7	3.9±0.9	4.2±1.0	3.7±1.0	0.972

Tabla 7. Características basales de los participantes del estudio en la fase de post-intervención.

Los resultados mostrados son la media±EEM de 75 voluntarios. ANOVA de un factor. IMC: índice de masa corporal; c-HDL: colesterol vehiculado en la lipoproteína de alta densidad; c-LDL: colesterol vehiculado en la lipoproteína de baja densidad. TG: triglicéridos; PCR: Proteína C reactiva; HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA FASE DE PRE-INTERVENCIÓN DEL ESTUDIO

En la **Tabla 8** se muestra el análisis de expresión génica en la fase de pre-intervención del estudio: durante el periodo de ayunas (hora 0 o basal) y en el periodo postprandial (horas 2 y 4), después de la sobrecarga grasa.

Expresión génica pre-intervención	HSFA (N=17)	HMUFA (N=18)	LFHCC (N=20)	LFHCC n-3 (N=20)	P global tiempo	P global dieta	P global interacción
IκB-α	0h	0.25±0.06	0.32±0.06	0.25±0.06	0.007	0.872	0.533
	2h	0.34±0.05	0.34±0.05	0.31±0.05			
	4h	0.36±0.06	0.36±0.06	0.35±0.06			
p65	0h	0.09±0.02	0.13±0.02	0.08±0.02	0.089	0.526	0.758
	2h	0.12±0.03	0.10±0.03	0.15±0.03			
	4h	0.12±0.03	0.16±0.03	0.09±0.03			
IL-1β	0h	0.06±0.02	0.09±0.02	0.13±0.02	<0.001	0.259	0.336
	2h	0.10±0.04	0.12±0.03	0.10±0.03			
	4h	0.12±0.03	0.12±0.03	0.16±0.03			
TNF-α	0h	0.48±0.08	0.27±0.08	0.40±0.08	0.014	0.276	0.431
	2h	0.64±0.13	0.39±0.13	0.43±0.12			
	4h	0.49±0.07	0.35±0.07	0.42±0.07			
IL-6	0h	0.14±0.03	0.14±0.03	0.15±0.03	0.003	0.359	0.431
	2h	0.21±0.05	0.21±0.05	0.16±0.04			
	4h	0.25±0.05	0.26±0.05	0.18±0.05			
MCP-1	0h	0.04±0.02	0.07±0.02	0.04±0.02	0.019	0.508	0.828
	2h	0.05±0.04	0.09±0.04	0.06±0.04			
	4h	0.06±0.04	0.10±0.04	0.07±0.03			

Expresión génica pre-intervención	HSFA (N=17)	HMUFA (N=18)	LFHCC (N=20)	LFHCC n-3 (N=20)	P global tiempo	P global dieta	P global interacción
IL-8	0h	0.02±0.006	0.01±0.006	0.02±0.006	<0.001	0.396	0.322
	2h	0.05±0.02	0.06±0.02	0.03±0.02			
	4h	0.07±0.02	0.05±0.02	0.08±0.02			
MIF	0h	0.13±0.02	0.16±0.01	0.15±0.01	0.177	0.344	0.522
	2h	0.14±0.01	0.13±0.01	0.15±0.01			
	4h	0.15±0.01	0.15±0.01	0.16±0.01			
MMP-9	0h	0.17±0.04	0.10±0.04	0.05±0.03	0.111	0.030	0.741
	2h	0.23±0.05	0.15±0.04	0.07±0.05			
	4h	0.19±0.06	0.17±0.06	0.08±0.06			

Tabla 8: Análisis de expresión génica en la fase de pre-intervención del estudio.

IKB- α , p65, IL-1 β , IL-6, IL-8 y MMP-9 fueron transformados logarítmicamente antes del análisis estadístico. Los resultados mostrados son la media \pm EEM de 75 voluntarios. ANOVA para medidas repetidas. MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos; MMP-9: metaloproteasa 9; Ikb (α y β): subunidades inhibidoras de NF-kB; TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; IL-6: interleuquina 6; p65: subunidad activadora de NF-kB. IL-8: interleuquina 8; IL-1 β : interleuquina 1 beta; HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

En el periodo de pre-intervención encontramos que, en los genes Ikb- α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 e IL-8, observamos un aumento en su expresión postprandial independientemente de la sobrecarga grasa consumida. Además, en los resultados del gen MMP-9 objetivamos una mayor expresión con la sobrecarga HSFA respecto a la LFHCC (P dieta=0.030).

5. EFECTO DE LA INGESTA A CORTO Y LARGO PLAZO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE GRASA. RESPUESTA INFLAMATORIA EN AYUNAS Y DURANTE EL PERIODO POSTPRANDIAL

Cada voluntario fue aleatorizado para recibir uno de los cuatro periodos de intervención dietética de 12 semanas de duración de las que consta el estudio. En el periodo de post-intervención (semana 12) y tras 12 horas de ayuno, a los pacientes se les realizó un estudio de lipemia postprandial, en el que consumieron una sobrecarga grasa en forma de desayuno con la misma composición que el periodo de intervención dietética que acababan de finalizar para así analizar el efecto, a corto y largo plazo, de la calidad y cantidad de la grasa de la dieta sobre la respuesta inflamatoria (marcadores inflamatorios, citoquinas y adipoquinas). Las extracciones sanguíneas para el tiempo basal se realizaron tras 12 horas de ayuno y antes de tomar el desayuno. Después de la sobrecarga grasa se realizaron extracciones de sangre a las 2 y 4 horas, con el objetivo de medir y analizar la expresión génica en CMNs y los niveles en plasma de citoquinas y adipoquinas. Además, a las 4 horas se recogieron muestras de sangre para la medición y análisis de la actividad de NF- κ B y la expresión de proteínas citoplasmáticas y nucleares en CMNs. Durante el periodo postprandial los participantes no consumieron más alimentos, aunque sí pudieron tomar agua. Cada uno de los parámetros de este estudio se analizaron mediante un ANOVA para medidas repetidas: *P tiempo*: efecto del tiempo, *P dieta*: efecto de la dieta, *P interacción*: efecto de la interacción entre el tiempo y la dieta administrada. Además, analizamos las posibles diferencias estadísticamente significativas que pudieran existir según el género y la condición de fumador en los pacientes del estudio, ya que estos factores podrían tener una influencia significativa sobre los parámetros inflamatorios medidos, tanto en las CMNs como en el plasma. En este sentido, los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados respecto a estos dos factores, si lo comparábamos con el análisis previo.

5.1 Actividad nuclear del NF- κ B

Con el objeto de valorar el efecto de la calidad y la cantidad de grasa de la dieta sobre la respuesta inflamatoria, se realizó la medición de la actividad nuclear del NF- κ B

(p65) en CMNs en el tiempo basal (hora 0) y a las 4 horas de consumir las distintas sobrecargas grasas.

El análisis del efecto a largo plazo del consumo de las distintas dietas no mostró diferencias en la actividad nuclear del NF-kB (p65). Sin embargo, al analizar los resultados de este factor de transcripción durante el periodo postprandial, objetivamos un descenso en su actividad nuclear tras el consumo de la sobrecarga HMUFA (hora 4 vs basal) respecto al resto de sobrecargas analizadas ($P=0.027$). En la **Figura 4** se representan los cambios postprandiales ocurridos después del consumo de cada una de las sobrecargas grasas (tiempo 4 h vs 0 h).

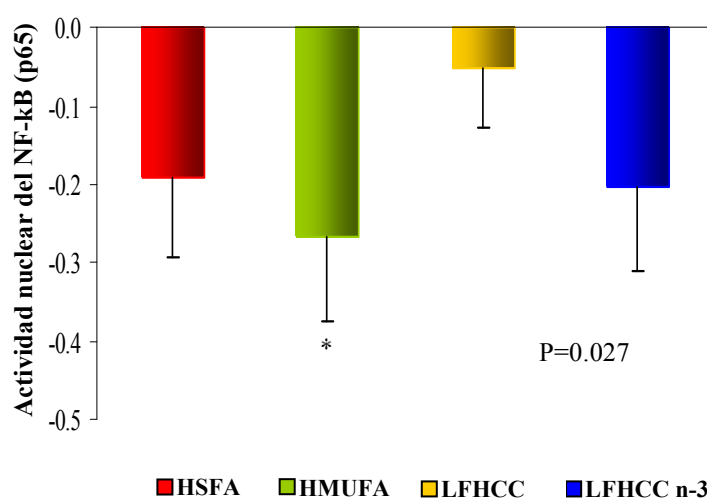


Figura 4. Actividad nuclear del NF-kB.

Los resultados mostrados son la media ± EEM. * $P=0.027$, HMUFA (hora 4 vs basal). NF-kB: factor de transcripción nuclear kappa B. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.2 Niveles de expresión proteica de las subunidades activadora (p65) e inhibidora (I κ B- α) del NF-kB.

Seguidamente, analizamos el efecto del tipo de grasa consumida en las distintas dietas sobre la expresión nuclear de la proteína p65, como subunidad activadora de NF-kB, y la expresión citoplasmática de la proteína I κ B- α , como una de las subunidades inhibitoras de este factor de transcripción. Estas medidas se llevaron a cabo en lisados nucleares y citoplasmáticos de las CMNs de los pacientes del estudio.

5.2.1 Proteína p65 nuclear

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la proteína p65 nuclear en CMNs se muestran en la **figura 5**. La menor actividad del NF-kB postprandial con la dieta HMUFA se asoció con un descenso postprandial en los niveles de proteína p65 nuclear después de la sobrecarga HMUFA (hora 4 vs basal, $P=0.002$). Además, observamos un descenso postprandial en los niveles de proteína p65 nuclear tras el consumo de la sobrecarga HMUFA respecto a la HSFA ($P=0.009$, HMUFA vs HSFA) y a la LFHCC ($P=0.003$, HMUFA vs LFHCC).

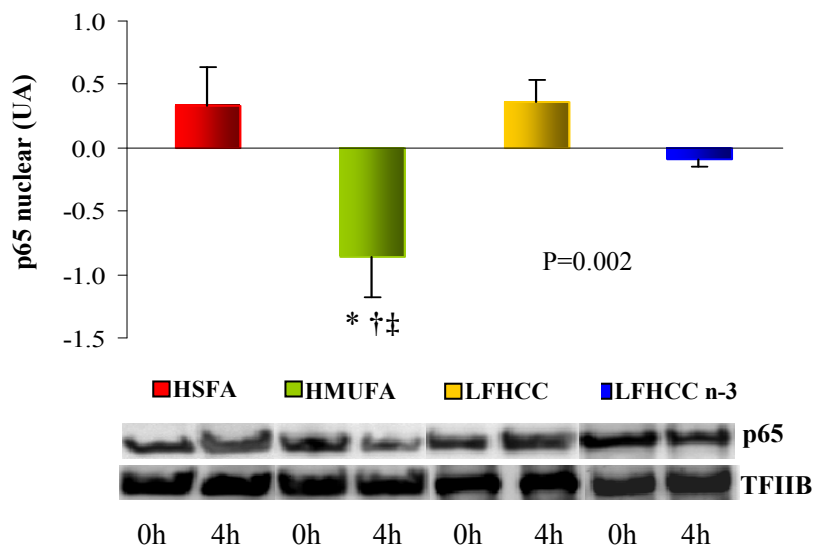


Figura 5. Cambios postprandiales en la proteína p65 nuclear. Los resultados mostrados son la media±EEM. * $P=0.002$, HMUFA (hora 4 vs hora 0) † $P=0.009$ HMUFA vs HSFA y ‡ $P=0.003$ HMUFA vs LFHCC. p65: Subunidad activadora de NF-kB. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.2.2 Proteína IκB-α citoplasmática

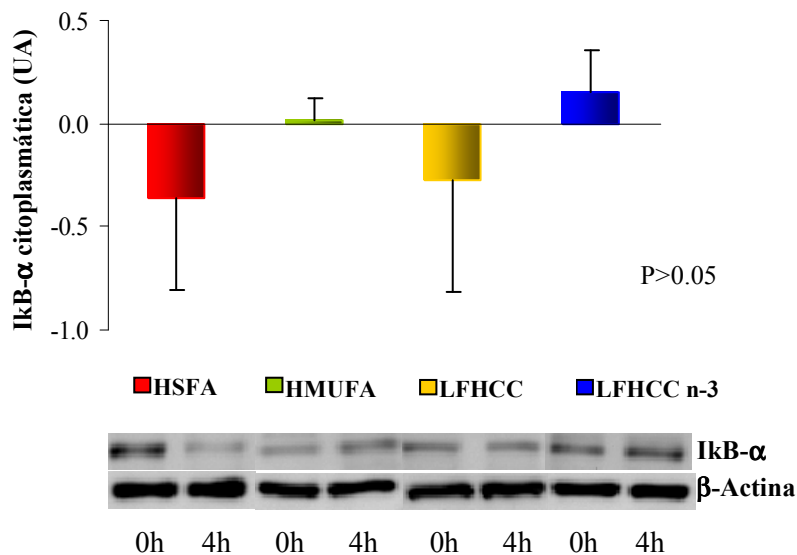


Figura 6. Cambios postprandiales en la expresión de la proteína IκB-α citoplasmática. Los resultados mostrados son la media±EEM. IκB-α: Subunidad inhibidora de NF-κB. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

Sin embargo, al analizar los datos para la proteína IκB-α citoplasmática no hallamos diferencias significativas en el periodo basal ni durante el postprandio con ninguna de las dietas consumidas.

5.3 Expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y regulados por el NF-κB.

Posteriormente, analizamos el efecto de la calidad y cantidad de grasa de la dieta sobre la expresión de genes regulados por el NF-κB. A continuación se muestran los resultados obtenidos, a corto y largo plazo, tras la cuantificación del ARNm de los genes: IκB-α, p65, IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP-1, IL-8, MIF y MMP-9 en las CMNs de los pacientes del estudio con SM.

5.3.1 Expresión génica relativa del IκB-α

En la **figura 7** observamos que tras el consumo a largo plazo (hora 0) de la dieta LFHCC n-3 se produjo un aumento en la expresión del ARNm de IκB-α si lo comparamos con los resultados obtenidos tras el consumo a largo plazo de las dietas HSFA ($P=0.015$, LFHCC n-3 vs HSFA) y HMUFA ($P=0.023$, LFHCC n-3 vs HMUFA).

Por otro lado, 4 horas después de consumir la sobrecarga HMUFA se produjo un aumento en los niveles postprandiales de IκB-α al compararlos con los obtenidos tras las sobrecargas HSFA ($P=0.017$, HMUFA vs HSFA) y LFHCC n-3 ($P=0.043$, HMUFA vs LFHCC n-3).

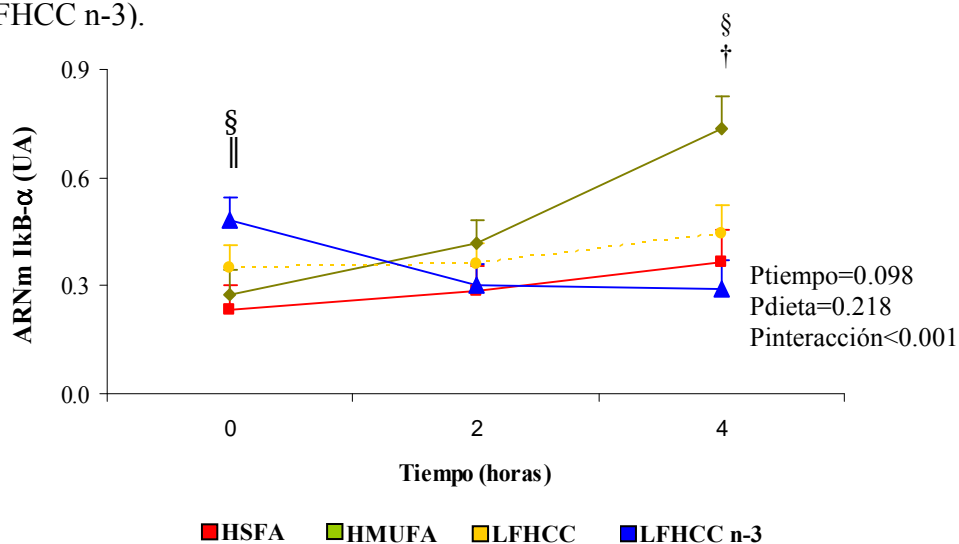


Figura 7. Cuantificación del ARNm de I κ B- α mediante PCR a tiempo real.

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. $P < 0.05$ [†]HMUFA vs HSFA; $P < 0.05$ [§]HMUFA vs LFHCC n-3; $P < 0.05$ ^{||}LFHCC n-3 vs HSFA. I κ B- α : subunidad inhibidora de NF- κ B. UA: Unidades Arbitrarias. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.3.2 Expresión génica relativa de p65

Los resultados obtenidos en la cuantificación del ARNm del gen p65 en CMNs se muestran en la **figura 8**. No hallamos diferencias significativas al analizar el efecto de las distintas dietas del estudio sobre la expresión de este gen.

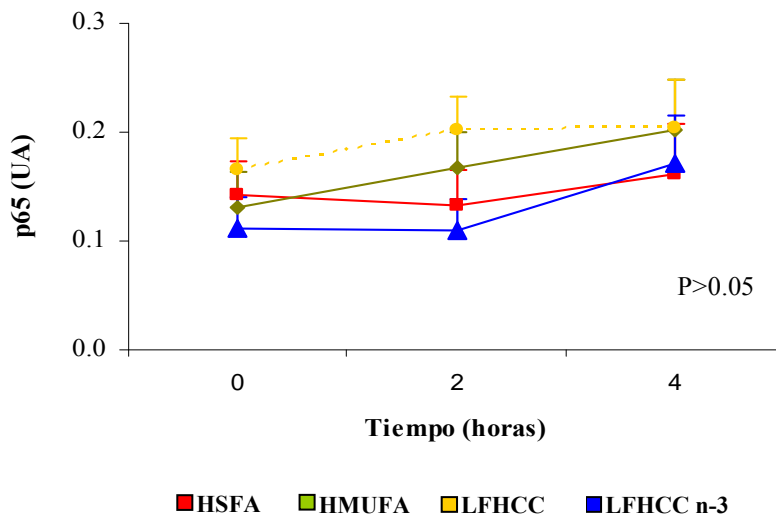


Figura 8. Cuantificación del ARNm de p65 mediante PCR a tiempo real.

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. p65: Subunidad activadora de NF- κ B. UA: Unidades Arbitrarias. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.3.3 Expresión génica relativa de la IL-1 β

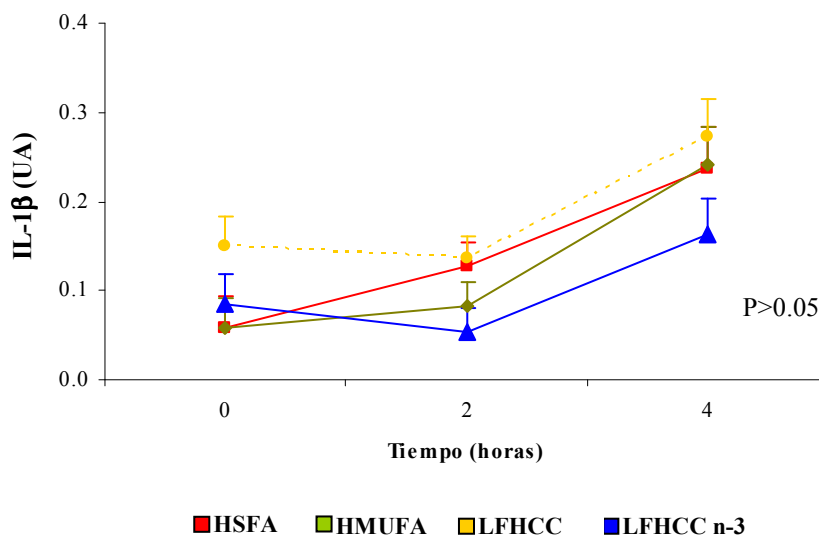


Figura 9. Cuantificación del ARNm de la IL-1 β mediante PCR a tiempo real.

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. IL-1 β : Interleuquina 1 beta. UA: unidades arbitrarias. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

No se hallaron diferencias significativas cuando analizamos el efecto de las distintas dietas sobre la expresión génica de la IL-1 β , sin embargo, objetivamos un efecto significativo del tiempo al observar un aumento postprandial en la expresión de esta citoquina independientemente del tipo de grasa consumida ($P < 0.001$).

5.3.4 Expresión génica relativa del TNF- α

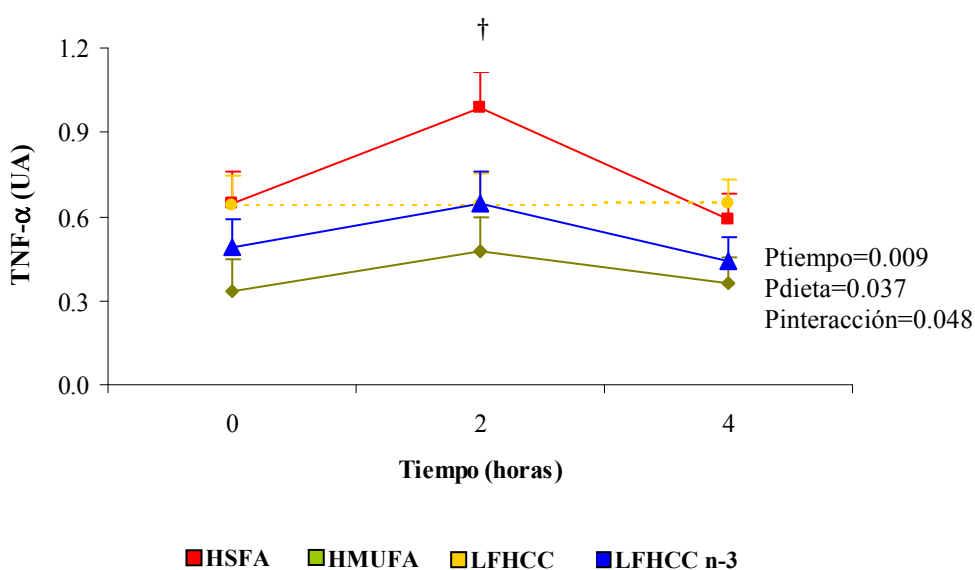


Figura 10. Cuantificación del ARNm del TNF- α mediante PCR a tiempo real.

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. † $P=0.022$ HMUFA vs HSFA. TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α . UA: unidades arbitrarias. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

El análisis del efecto a largo plazo (hora 0) del consumo de las distintas dietas no mostró diferencias en la expresión del gen TNF- α . Sin embargo, a las 2 horas de la ingesta de la sobrecarga HSFA los niveles postprandiales de TNF- α fueron mayores respecto a los observados tras el consumo de la sobrecarga HMUFA ($P=0.022$, HMUFA vs HSFA).

5.3.5 Expresión génica relativa de la IL-6

Los resultados obtenidos en la cuantificación del ARNm del gen IL-6 se muestran en la **figura 11**. No se hallaron diferencias significativas cuando analizamos el efecto de

los distintas dietas del estudio sobre la expresión génica de la IL-6, aunque sí observamos un efecto del tiempo ya que se produce un aumento postprandial en los niveles de expresión de esta citoquina con todas las dietas estudiadas ($P < 0.001$).

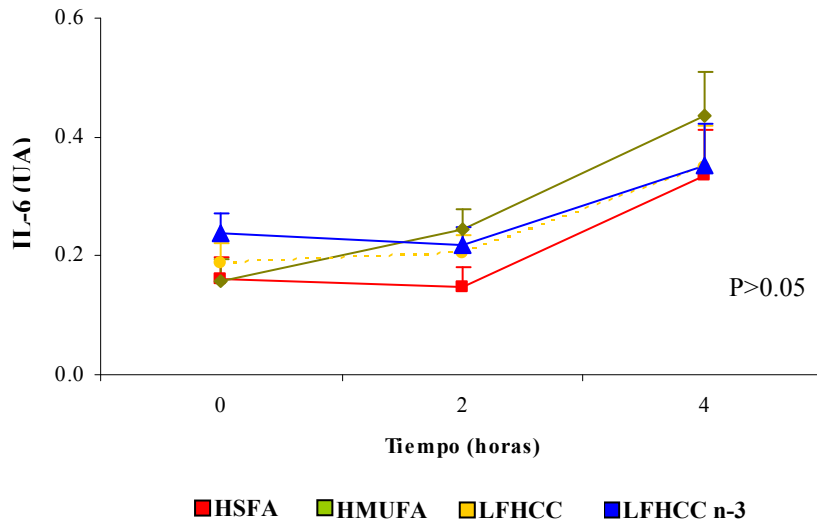


Figura 11. Cuantificación del ARNm de la IL-6 mediante PCR a tiempo real. Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. IL-6: Interleuquina 6. UA: Unidades Arbitrarias. EEM: error estándar de la media; HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.3.6 Expresión génica relativa de la MCP-1

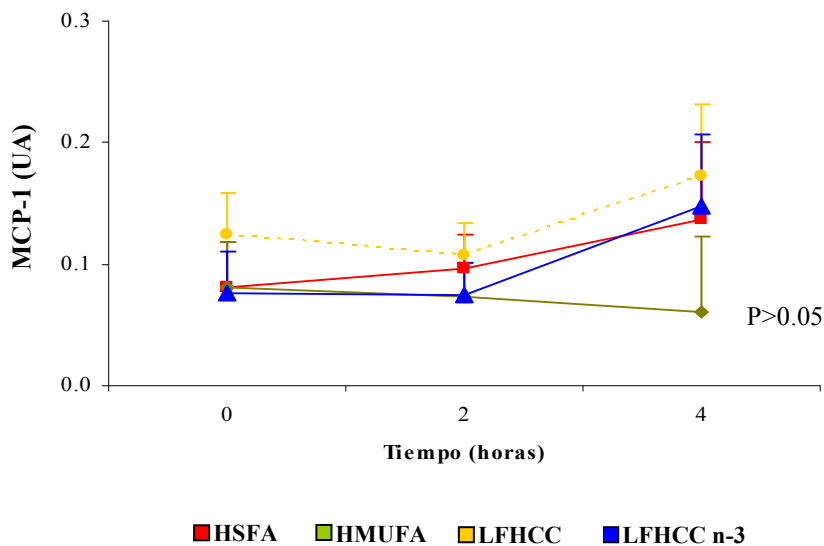


Figura 12. Cuantificación del ARNm de la MCP-1 mediante PCR a tiempo real. Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos. UA: Unidades Arbitrarias. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

No se encontraron diferencias significativas, a corto o a largo plazo, para la expresión génica de la MCP-1 con ninguna de las dietas del estudio.

5.3.7 Expresión génica relativa de la IL-8

Los resultados obtenidos en la cuantificación del ARNm del gen de la IL-8 en CMNs se muestran en la **figura 13**. Al igual que ocurría con la expresión de la IL-6 y de la IL-1 β , no encontramos diferencias significativas en función de la cantidad y calidad de la grasa estudiada, sin embargo, objetivamos un efecto del tiempo ya que se produce un aumento postprandial en los niveles de expresión de esta citoquina independientemente de la dieta analizada ($P < 0.001$).

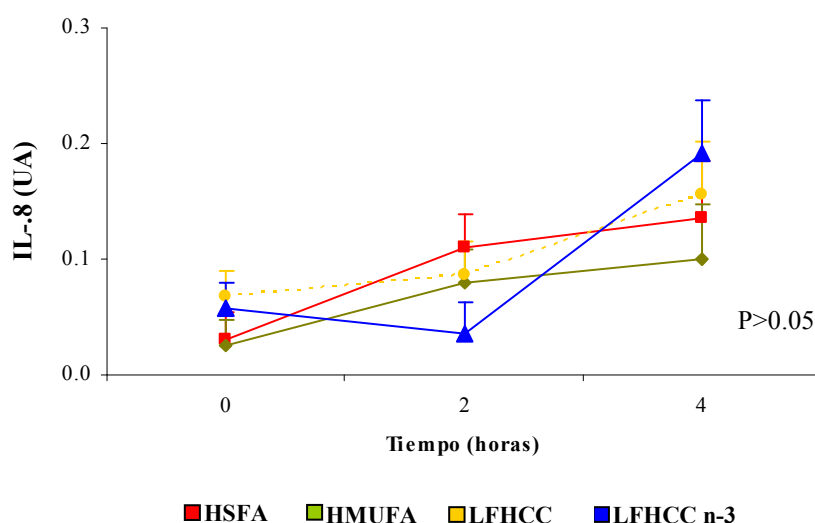


Figura 13. Cuantificación del ARNm de la IL-8 mediante PCR a tiempo real. Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. UA: unidades arbitrarias. IL-8: Interleuquina 8. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.3.8 Expresión génica relativa del MIF

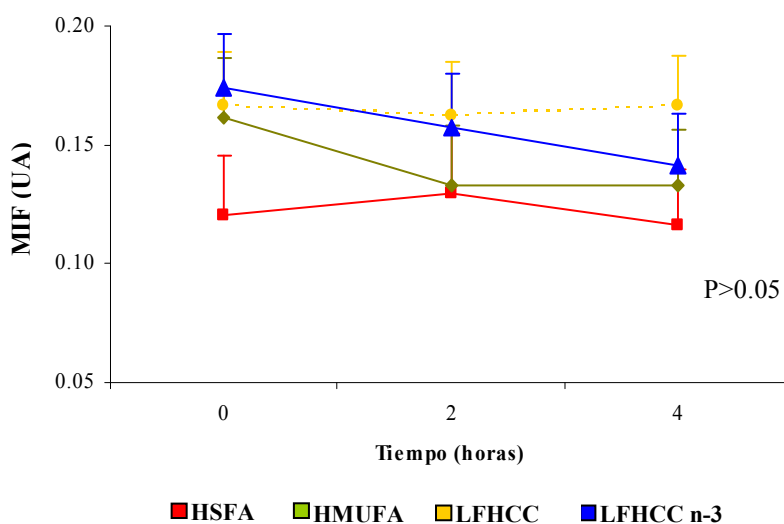


Figura 14. Cuantificación del ARNm del MIF mediante PCR a tiempo real.

Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos. UA: Unidades Arbitrarias. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

No hallamos diferencias significativas al analizar la expresión de este gen con ninguna de las dietas consumidas durante el estudio.

5.3.9 Expresión génica relativa de la MMP-9

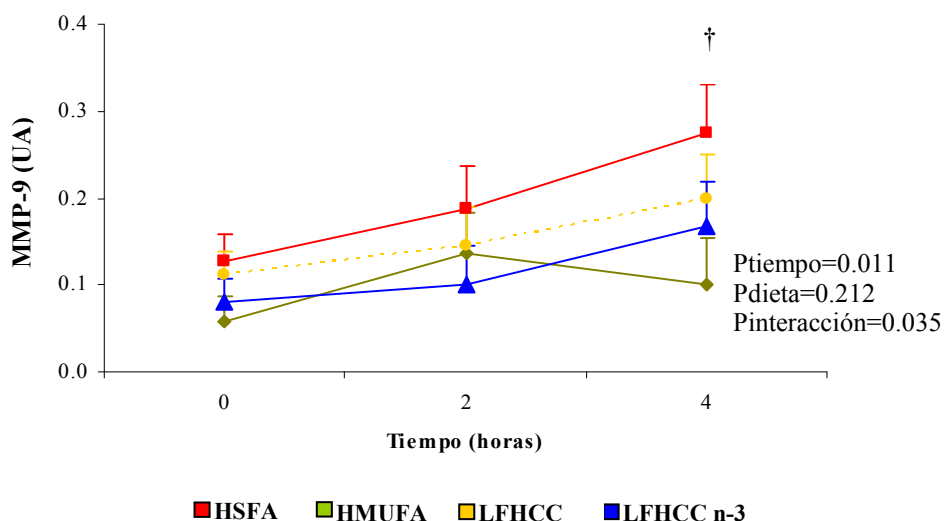


Figura 15. Cuantificación del ARNm de la MMP-9 mediante PCR a tiempo real.

Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. MMP-9: Metaloproteasa 9. †P=0.05 HMUFA vs HSFA. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos tras ninguno de los periodos de intervención dietética. Sin embargo, al analizar la expresión génica de la MMP-9 durante los sucesivos tiempos de la lipemia observamos un efecto del tipo de grasa ingerida, de forma que los voluntarios que consumieron la sobrecarga HMUFA (rica en aceite de oliva) mostraron menores niveles de ARNm de la MMP-9 en CMNs que los que tomaron la HSFA (rica en mantequilla) a las 4 horas en el postprandio.

5.4 Análisis de las concentraciones plasmáticas de citoquinas y adipoquinas que intervienen en la respuesta inflamatoria.

Posteriormente, determinamos las concentraciones plasmáticas del TNF- α , IL-6, MCP-1, adiponectina, resistina y leptina tras el periodo de intervención dietética y durante el postprandio, con el objeto de determinar el efecto del tipo de grasa de la dieta, del tiempo y de la interacción entre la grasa consumida y el tiempo a los pacientes con SM que participaron en el estudio.

5.4.1 Niveles plasmáticos del TNF- α

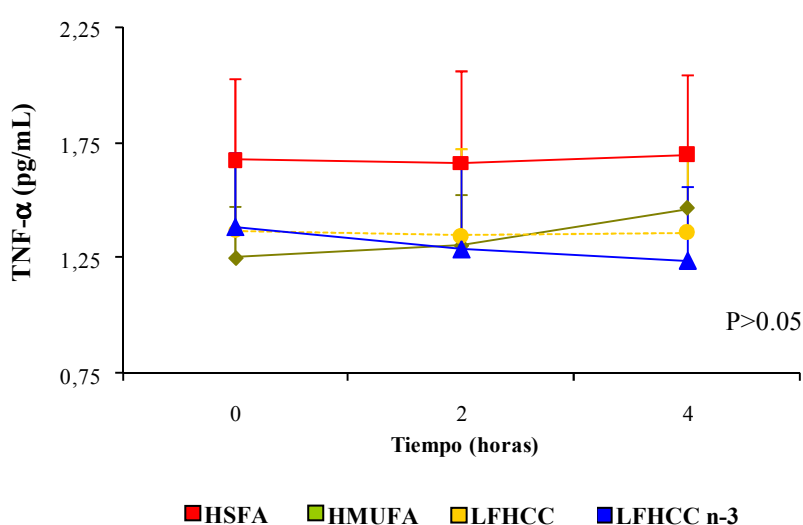


Figura 16. Niveles plasmáticos del TNF- α .

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α . HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

Aunque los mayores niveles de TNF- α plasmáticos se obtienen tras el consumo de la dieta HSFA, al comparar el efecto de las cuatro grasas administradas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

5.4.2 Concentración de la IL-6 plasmática

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de la IL-6 (**Figura 17**) tras los distintos periodos de intervención dietética. Sin embargo, sí hubo un efecto del tiempo, de modo que observamos un aumento postprandial en los niveles de esta proteína independientemente de la grasa consumida ($P < 0,001$).

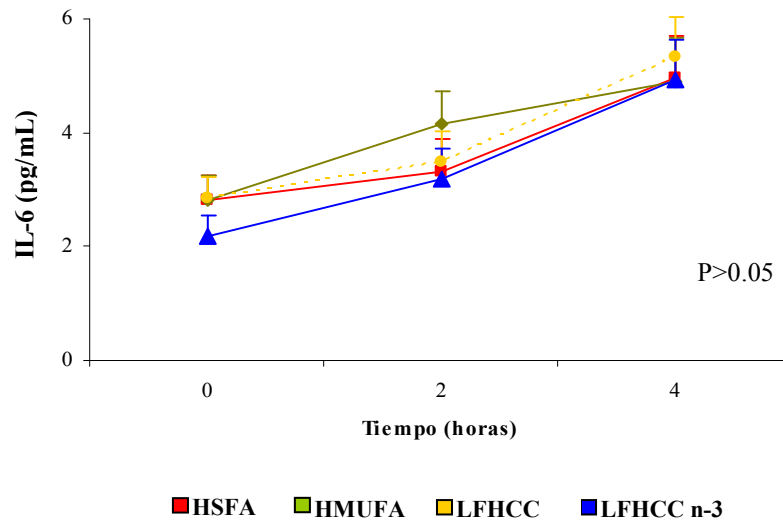


Figura 17. Concentración de la IL-6 plasmática.

Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. IL-6: Interleuquina 6. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.4.3 MCP-1 en plasma

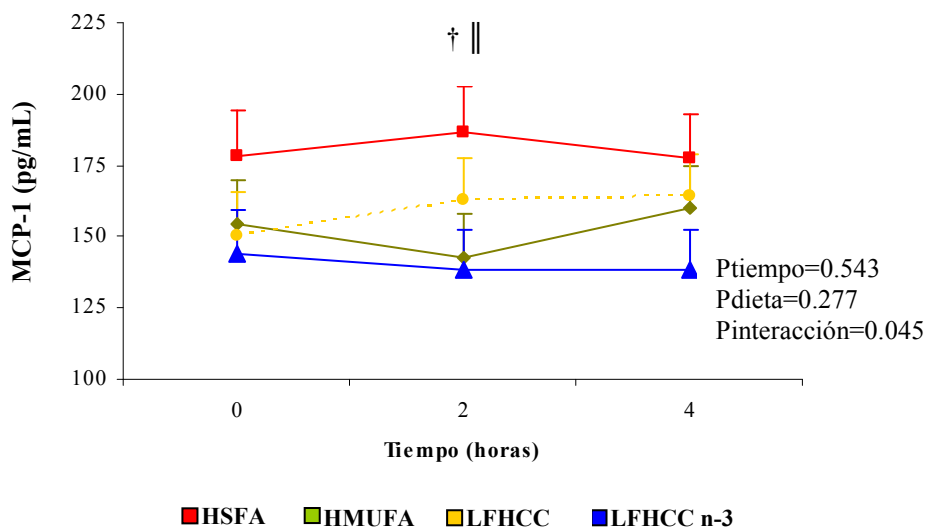


Figura 18. MCP-1 en plasma.

Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. $P=0.046$ †HMUFA vs HSFA; $P=0.026$ †HSFA vs LFHCC n-3. MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

No hallamos diferencias significativas al analizar el efecto de las 12 semanas de intervención dietética sobre los niveles de la MCP-1 en plasma (hora 0). Respecto a los resultados postprandiales, observamos un efecto de la interacción dieta*tiempo de tal forma que, después de 2 horas del consumo de la sobrecarga HSFA objetivamos un aumento en la concentración plasmática de MCP-1 si la comparamos con los niveles

encontrados tras las sobrecargas HMUFA ($P=0.046$, HMUFA vs HSFA) y LFHCC n-3 ($P=0.026$, HSFA vs LFHCC n-3).

5.4.4 Niveles de adiponectina en plasma

Los resultados obtenidos en la concentración de adiponectina en plasma se muestran en la **Figura 19**. No hallamos diferencias significativas al analizar el efecto de los distintos tipos de grasa administradas sobre los niveles plasmáticos de adiponectina.

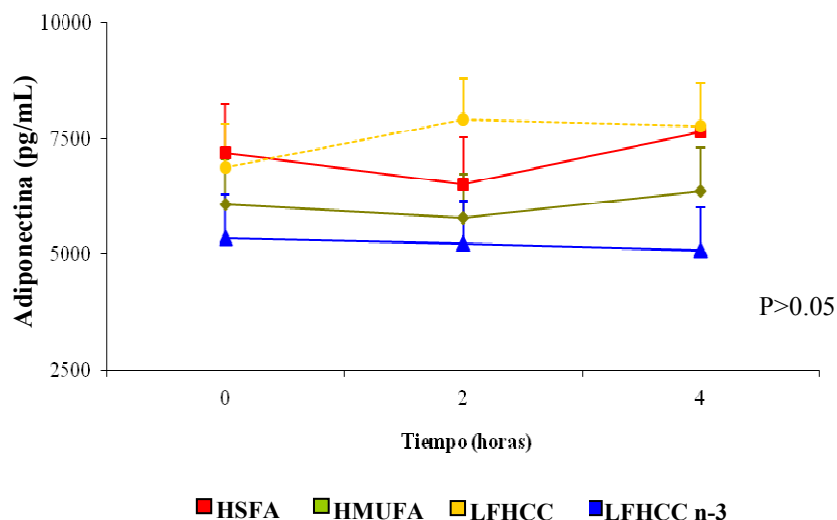


Figura 19. Niveles de adiponectina en plasma.

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. EEM: error estándar de la media; HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.4.5 Concentración de resistina en plasma

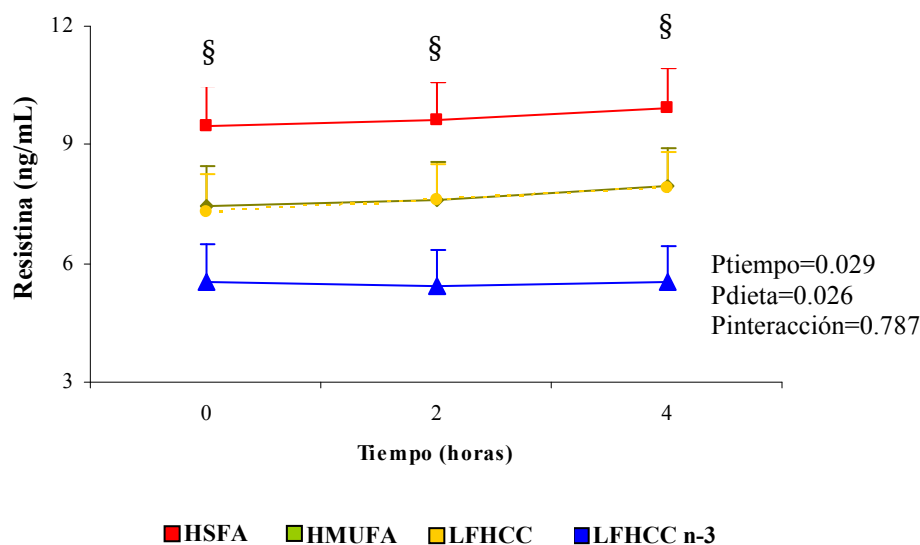


Figura 20. Concentración de resistina en plasma.

Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. §P=0.016 HSFA vs LFHCC n-3. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

Al analizar el efecto de los distintos periodos de intervención dietética (hora 0) sobre la resistina observamos que tras el consumo a largo plazo de la dieta HSFA se produjo un aumento en los niveles de este parámetro respecto a los obtenidos tras la ingesta de la dieta LFHCC n-3 ($P=0.016$, HSFA vs LFHCC n-3). Además, este aumento en los niveles de resistina se mantuvo constante a lo largo del postprandio, hallándose un efecto significativo a las 2 y a las 4 horas, tras el consumo de la sobrecarga HSFA respecto a la LFHCC n-3 ($P=0.016$, HSFA vs LFHCC n-3).

5.4.6 Niveles plasmáticos de leptina

Los resultados obtenidos para los niveles plasmáticos de leptina se muestran en la **Figura 21**. No hallamos diferencias significativas al analizar el efecto de los distintos tipos de grasa administrados sobre los niveles plasmáticos de este parámetro.

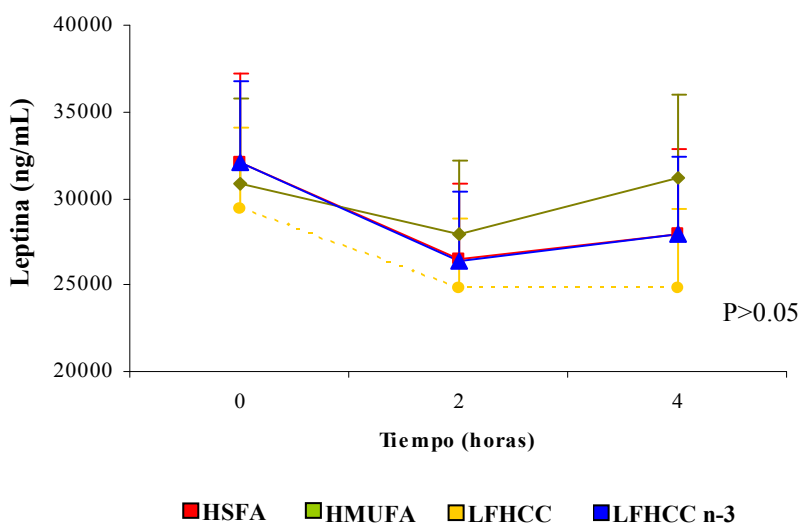


Figura 21. Niveles plasmáticos de leptina.

Los resultados mostrados son la media±EEM. ANOVA para medidas repetidas. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

5.5 Estudio de los niveles de ácidos grasos libres no esterificados en plasma

Los niveles plasmáticos de NEFAs tras las distintas dietas del estudio se muestran en la **figura 22**. No hallamos diferencias significativas al analizar el efecto de las 12 semanas de intervención dietética (hora 0) sobre los niveles de NEFAs en plasma.

Por otro lado, al comparar el efecto de las 4 sobrecargas grasas consumidas en los niveles plasmáticos de NEFAs, observamos que existe un efecto del tiempo, ya que se produce un descenso a las 2 horas de la ingesta de las distintas sobrecargas grasas si lo comparamos con los niveles en el tiempo basal y a las 4 horas del postprandio ($P < 0.001$).

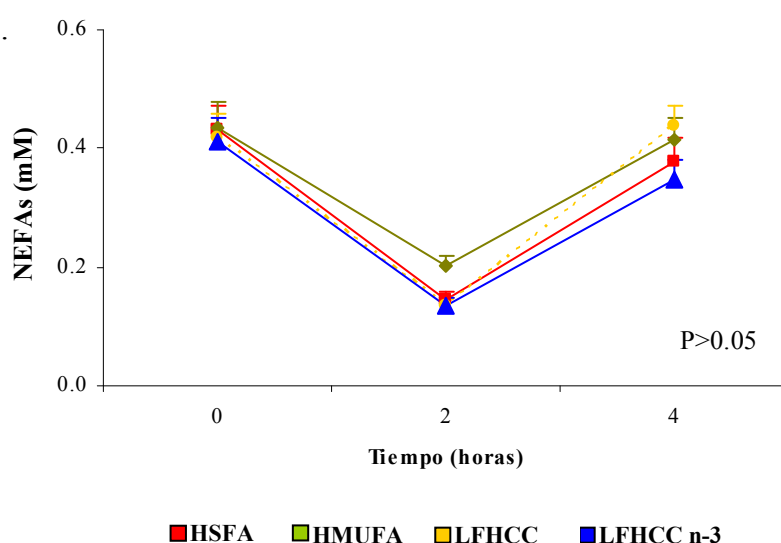


Figura 22. Niveles de NEFAs en plasma.

Los resultados mostrados son la media \pm EEM. ANOVA para medidas repetidas. NEFAs: Ácidos grasos libres no esterificados. HSFA: dieta alta en ácidos grasos saturados; HMUFA: dieta alta en ácidos grasos monoinsaturados; LFHCC: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono complejos; LFHCC n-3: dieta baja en grasa, alta en hidratos de carbono y suplementada en poliinsaturados n-3 de cadena larga y de origen marino.

6. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

A continuación, estudiamos la relación existente entre la actividad nuclear del NF- κ B, la expresión de las proteínas p65 e I κ B- α y la expresión génica de las distintas citoquinas estudiadas con los niveles plasmáticos de TG y de las LRTs (quilomicrones y sus remanentes).

Los niveles plasmáticos de TG se correlacionaron positivamente con la expresión del ARNm de la MMP-9 ($r=0.272$, $P=0.020$) durante las 2 primeras horas del postprandio.

Los niveles de TG en quilomicrones se correlacionaron positivamente con la expresión génica de la MMP-9 ($r=0.251$, $P=0.032$) a las 2 horas del postprandio.

Los TG en remanentes de quilomicrones se correlacionaron positivamente con la expresión de la MMP-9 a las 2 horas ($r=0.291$, $P=0.014$) y a las 4 horas ($r=0.312$, $P=0.008$) durante el periodo postprandial.

Por otro lado, también analizamos la relación existente entre la actividad nuclear del NF- κ B, la expresión de sus subunidades activadora (p65) e inhibidora (I κ B- α) y la expresión génica de la IL-1 β y del TNF- α , entre ellas y con el resto de citoquinas estudiadas.

NF- κ B es uno de los principales factores de transcripción en la respuesta inflamatoria y sabemos que regula los niveles de expresión génica de distintas citoquinas. La actividad nuclear de NF- κ B (p65) se correlacionó positivamente con la expresión del gen TNF- α ($r=0.283$, $P=0.040$) a las 4 horas en el postprandio. Además, la expresión génica relativa del TNF- α , molécula que favorece la síntesis de otras citoquinas, correlacionó positivamente con los genes de la IL-6 ($r=0.245$, $P=0.037$) y la MMP-9 ($r=0.423$, $P<0.001$) en el periodo basal (hora 0). También observamos que durante el postprandio existió una correlación positiva entre el gen TNF- α y la expresión génica de la MMP-9 ($r=0.279$, $P=0.017$), la IL-6 ($r=0.276$, $P=0.018$) y el MCP-1 ($r=0.268$, $P=0.022$) a las 4 horas durante el periodo postprandial.

Con respecto a la IL-1 β , sabemos que favorece la síntesis de otras citoquinas como la IL-6, la MCP-1, la IL-8 o la MMP-9. Al realizar el análisis de la IL-1 β encontramos que en el periodo basal (hora 0) existía una correlación positiva con el ARNm de la IL-8 ($r=0.656$, $P<0.01$), la MMP-9 ($r=0.376$, $P=0.001$), el p65 ($r=0.387$, $P=0.001$) y la IL-6 ($r=0.255$, $P=0.033$). La IL-1 β también se correlacionó positivamente con el gen de la IL-8 ($r=0.769$, $P<0.001$) y los niveles en plasma de resitina ($r=0.265$, $P=0.025$) a las 2 horas durante el postprandio. También existió una correlación positiva entre la IL-1 β y la expresión génica de la MMP-9 ($r=0.348$, $P=0.003$), de la IL-6 ($r=0.393$, $P=0.001$), del p65 ($r=0.379$, $P=0.001$) y con los niveles plasmáticos de NEFAs ($r=0.327$, $P=0.005$) a las 4 horas durante el periodo postprandial. Además, los niveles de expresión de la proteína I κ B- α citoplasmática correlacionaron negativamente con la

expresión del gen IL-1 β ($r=-0.310$, $P=0.034$) a las 4 horas de la ingesta de la sobrecarga grasa.

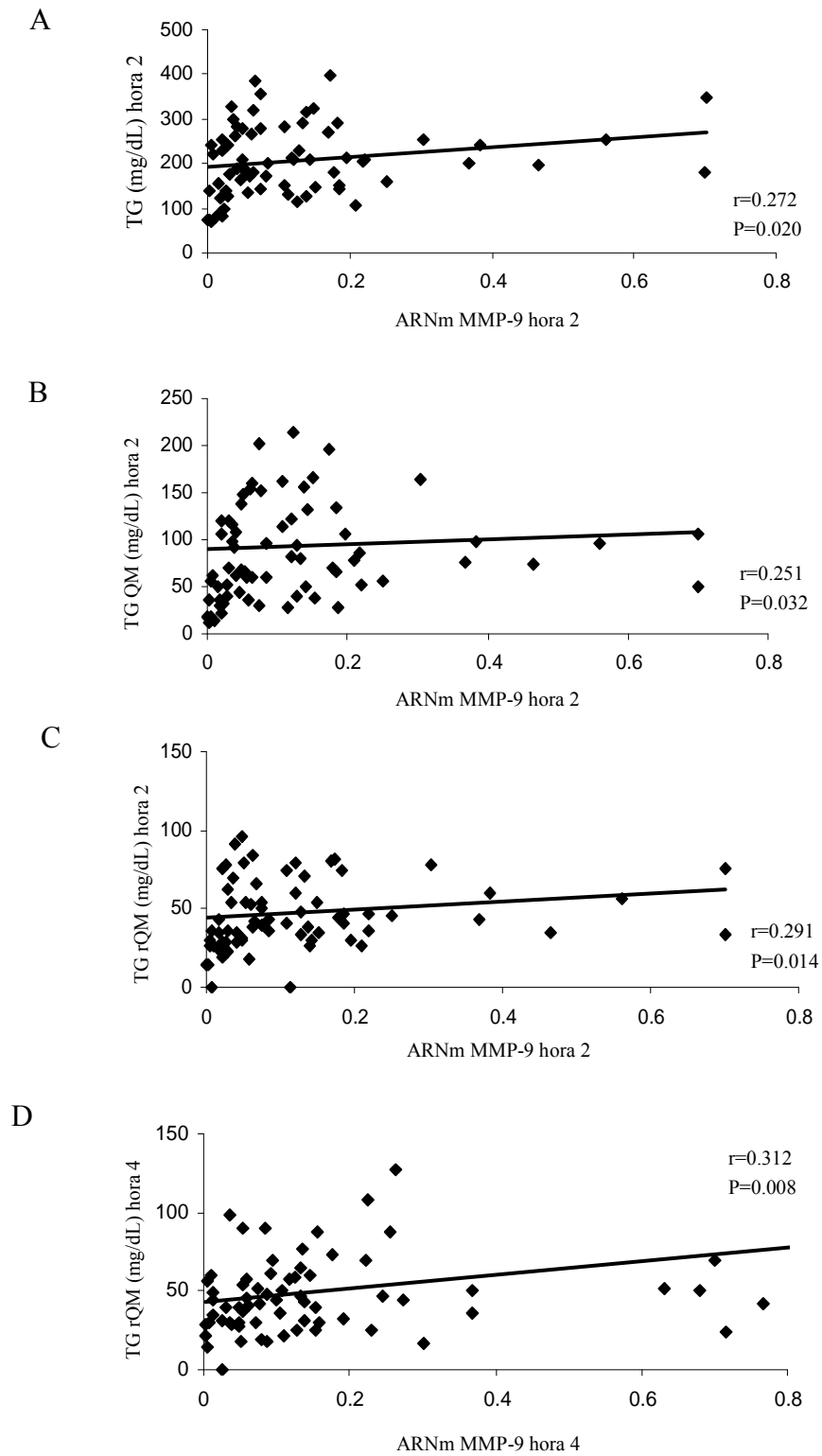


Figura 23. Análisis de la correlación existente entre los niveles plasmáticos de TG y de las LRTs con la expresión del ARNm de la MMP-9.

(A) Correlación entre los niveles en plasma de TG y el ARNm de la MMP-9 a las 2 horas del estado postprandial. (B) Correlación entre los niveles de TG en quilomicrones y el ARNm de la MMP-9 a las 2

horas durante el postprandio. Correlación entre los niveles de TG en remanentes de quilomicrones y el ARNm de la MMP-9 a las 2 horas (C) y a las 4 horas (D) del postprandio.

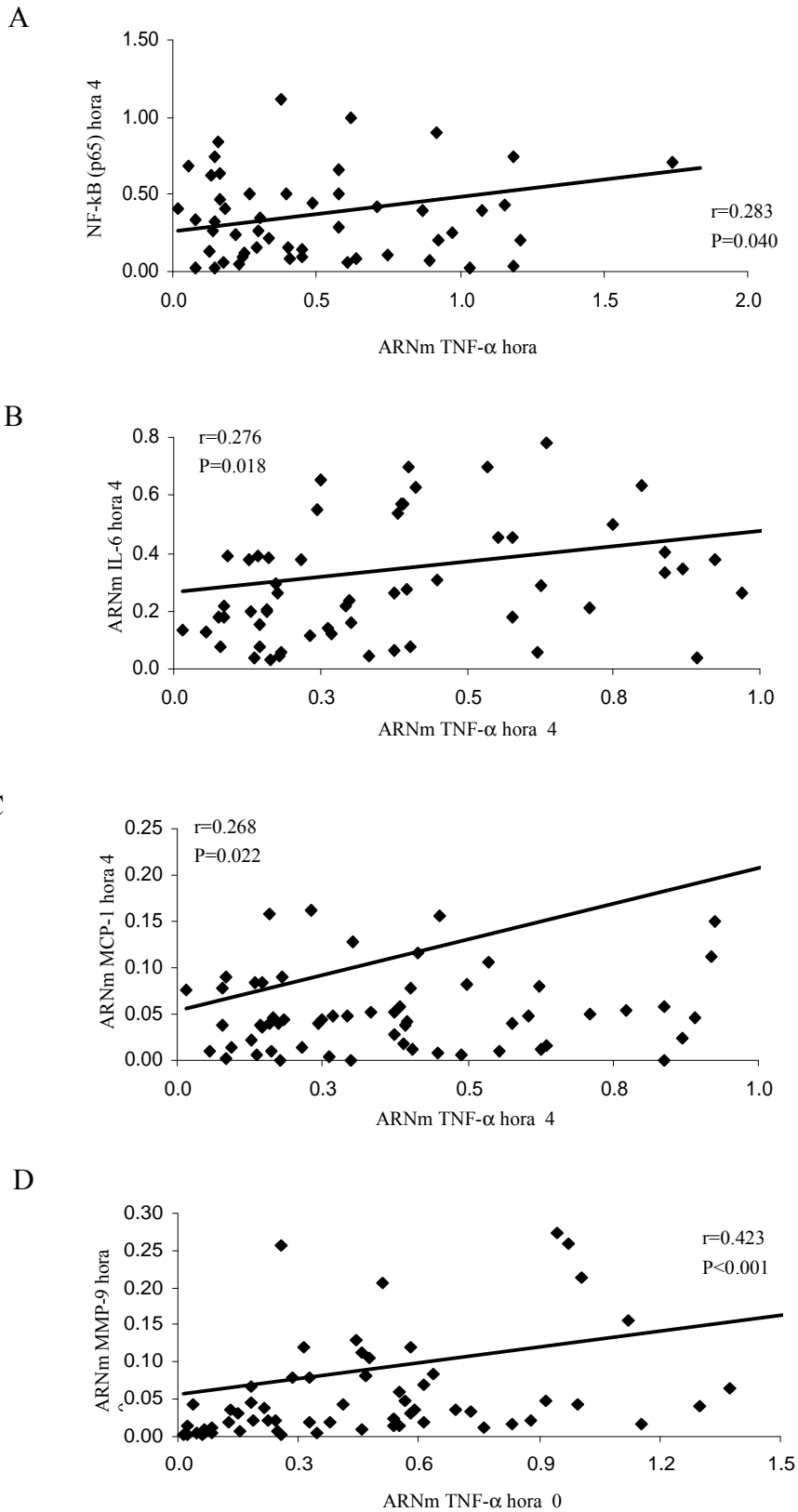


Figura 24. Análisis de la correlación existente entre la expresión del ARNm del TNF- α y los parámetros inflamatorios estudiados.

Correlación entre la expresión del ARNm del TNF α y la actividad del NF-kB (A), el ARNm de la IL-6 (B) y el ARNm de la MCP-1 (C) a las 4 horas del estado postprandial. Correlación entre el ARNm del TNF α y de la MMP-9 en el basal (D).

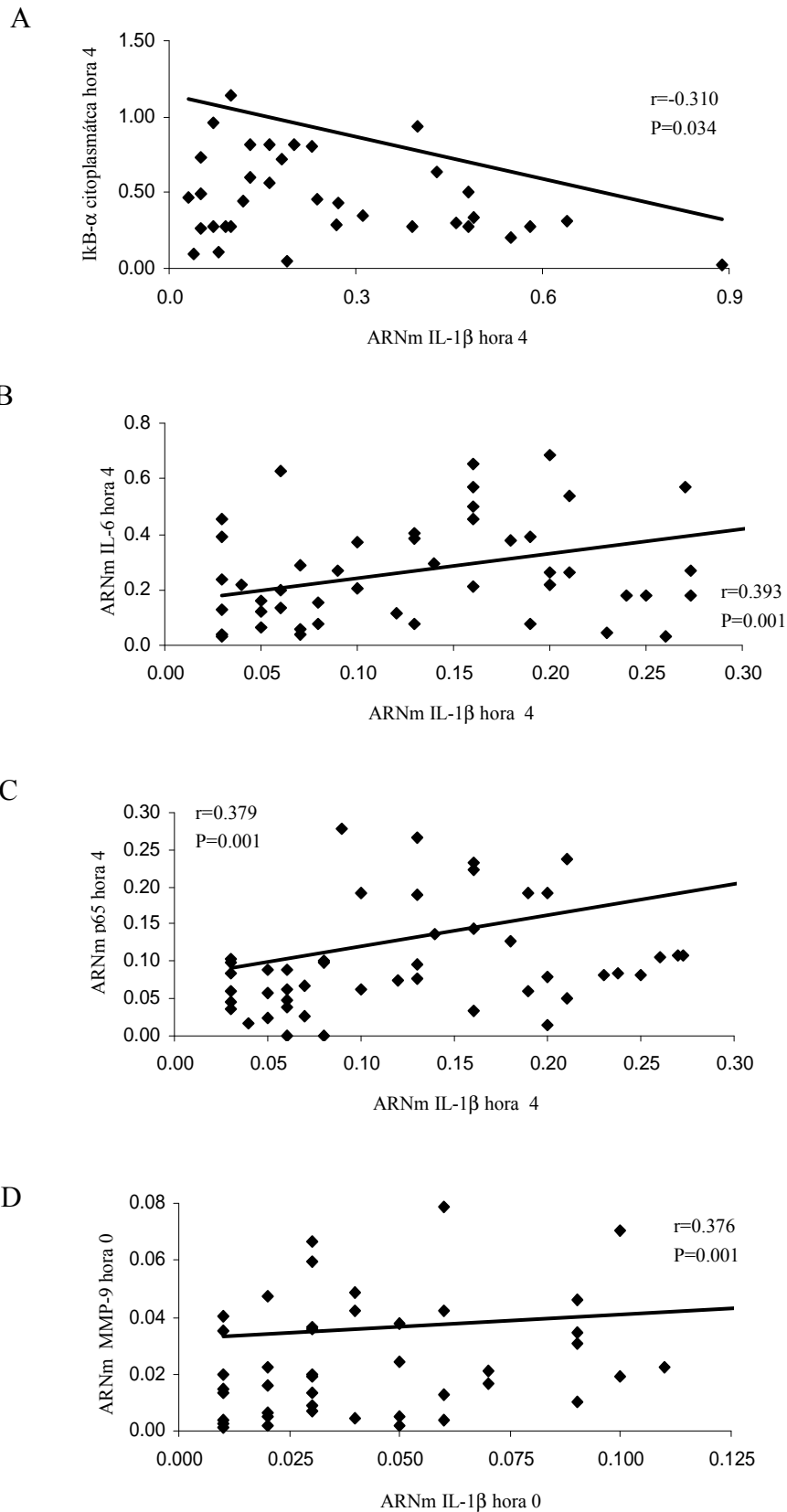


Figura 25. Análisis de la correlación existente entre la expresión del ARNm de la IL-1 β y los parámetros inflamatorios estudiados.

Correlación entre la expresión del ARNm de la IL-1 β y los niveles de proteína I κ B- α citoplasmática (A), el ARNm de la IL-6 (B) y el ARNm del p65 (C) a las 4 horas del estado postprandial. Correlación entre el ARNm de la IL-1 β y de la MMP-9 en el basal (D).



VII. DISCUSIÓN

La etiología del SM se debe a una compleja interacción entre factores genéticos, epigenéticos, metabólicos y ambientales, entre los que destaca la dieta y sobre todo la calidad y la cantidad de grasa consumida. El exceso de nutrientes, la ingesta de modelos de alimentación fundamentalmente a expensas de grasa saturada y el sedentarismo, generan un estado de estrés oxidativo y un incremento en la expresión de citoquinas, moléculas de adhesión, quimioquinas, proteínas coagulantes y enzimas inflamatorias, lo que podría generar fenómenos ateroscleróticos o de RI, sobre todo en individuos genética o metabólicamente predispuestos.

El presente estudio demuestra que la grasa de la dieta modifica la respuesta inflamatoria en las CMNs de pacientes con SM. Así, nuestros resultados sugieren que la ingesta de una dieta HSFA, modelo de alimentación habitual en los países occidentales, induce una activación de la respuesta inflamatoria. Por el contrario, el consumo de modelos de alimentación saludables como las dietas ricas en MUFA o en PUFA n-3, atenúan dicha respuesta inflamatoria mediada por el sistema NF-kB. En este sentido, hemos observado que tras el consumo crónico de una dieta HMUFA y 4 horas después de la sobrecarga rica en este tipo de grasa (a expensas de aceite de oliva), se produce una disminución postprandial en la actividad nuclear del NF-kB y en los niveles de la proteína p65 nuclear en pacientes con SM. Asimismo, objetivamos una disminución postprandial en la expresión de esta proteína tras el consumo de una dieta HMUFA comparado con las dietas HSFA y LFHCC. Por otro lado, tras analizar los datos de expresión del gen *IkB- α* , subunidad inhibidora del NF-kB, observamos un aumento postprandial tras el consumo de una dieta HMUFA y 4 horas después de la sobrecarga rica en esta grasa.

Como hemos comentado previamente, el SM se ha convertido en un problema de salud de creciente prevalencia asociado a estilos de vida poco saludables y cuya característica más importante es la RI. Según estudios previos, la inflamación crónica y la RI están estrechamente relacionadas, de tal manera que, los procesos inflamatorios crónicos pueden disminuir la sensibilidad a la insulina y, por tanto, son importantes en la patogénesis del SM^{419, 420}. Evidencias previas sugieren un papel importante de la inflamación en todos los procesos de la aterosclerosis^{58, 59}. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria con presencia de depósitos lipídicos intra y extracelulares en las arterias. Los macrófagos tienen un papel clave tanto en la génesis como en la

progresión de la lesión, siendo estos leucocitos los mediadores de la respuesta inflamatoria en un estadio temprano de la enfermedad^{421, 422}. Por tanto, la inflamación desempeña un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, siendo determinados marcadores como la PCR, el TNF- α y la IL-6, factores de riesgo para el desarrollo de ECV^{65, 423}.

Dentro de los elementos que pueden modular los factores de riesgo cardiovascular y los mecanismos relacionados con el comienzo y la progresión de las placas de ateroma, se encuentra la dieta y, dentro de ésta, la calidad de la grasa. El grado de insaturación de los ácidos grasos de la dieta afecta a la composición de las lipoproteínas y a la expresión de factores relacionados con la inflamación. Además, se ha demostrado que los MUFA^{424, 425} y los PUFA n-3^{426, 427} podrían ser beneficiosos para la salud. Sin embargo, los lípidos insaturados, sobre todo los PUFA, son susceptibles a la oxidación, lo que hace dudar que sea realmente beneficioso reemplazar las grasas saturadas por insaturadas. Una consecuencia de esta oxidación es que las partículas LDL sufren modificaciones que facilitan su internalización dentro de los macrófagos. La dieta y, sobre todo, los ácidos grasos pueden modular determinados factores de transcripción, como el NF- κ B, que desempeña un gran papel en la patogénesis de la arteriosclerosis y está involucrado en la regulación de genes proinflamatorios como citoquinas, moléculas de adhesión, quimioquinas, proteínas coagulantes y enzimas inflamatorias^{428, 429, 430, 431}. Existen estudios que evidencian que la cantidad y el tipo de grasa de la dieta, tales como un alto consumo de SFA, inducen un proceso inflamatorio y contribuyen al desarrollo de SM ya que producen un aumento en la actividad nuclear del NF- κ B y, por tanto, un incremento en la expresión de IL-6, TNF- α y otras citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria⁴⁷. Un trabajo realizado por Williams y cols⁴³² demostraba que un modelo de DM enriquecido en MUFA podría proteger, e incluso tratar, enfermedades relacionadas con la inflamación crónica, incluyendo el SM. Asimismo, existen varios artículos publicados por nuestro grupo donde demostramos que el consumo de dietas enriquecidas en MUFA, a expensas de aceite de oliva, mejoran el estado inflamatorio comparado con el consumo de SFA^{113, 407, 433, 434, 435}.

El primero en sugerir que la arteriosclerosis era un fenómeno postprandial fue Zilversmit, en 1979³⁸¹. Sin embargo, muchos de los conocimientos que se tienen hoy en día de la relación existente entre lípidos, metabolismo de las lipoproteínas y desarrollo

de arteriosclerosis provienen de estudios realizados en situación de ayunas. Estos conocimientos son una base importante pero no hay que olvidar que nos encontramos la mayor parte del día en estado postprandial, con una fluctuación continua del grado de lipemia a lo largo del día³⁸⁰, por lo que el efecto que los alimentos pueden tener sobre estas alteraciones no deben estudiarse de forma aislada ya que el estudio de una ingesta aguda de grasa no se puede separar de los efectos potenciales de un consumo crónico.

La importancia de nuestro trabajo radica en el estudio del periodo postprandial tras el consumo crónico de distintos tipos de dieta. Hay pocos estudios que hayan investigado el comportamiento de los marcadores inflamatorios durante el estado postprandial y cómo los diferentes ácidos grasos de la dieta modifican dichos efectos. Además, en la actualidad no existen trabajos publicados acerca del efecto que el consumo a largo plazo de una dieta ejerce sobre la respuesta inflamatoria en pacientes con SM.

En condiciones normales, en ausencia de estímulos que puedan resultar perjudiciales para la célula, NF-kB (p50/p65) se encuentra inactivo en el citoplasma, unido a su inhibidor IκB. Ante ciertos estímulos se produce la fosforilación, ubiquitinación y degradación de la proteína IκB, lo que provoca la translocación nuclear del NF-kB y su unión a la región promotora de diversos genes para incrementar su expresión¹²⁰. En un estudio previo realizado en nuestro grupo¹¹³ demostramos que el consumo a largo plazo de una DM, rica en aceite de oliva, disminuía la activación del NF-kB en las CMNs, comparada con una dieta típica Occidental, rica en SFA, en una población de individuos jóvenes y sanos. Además, también hemos demostrado que la ingesta aguda de una sobrecarga grasa puede modular la actividad del NF-kB, así, en un trabajo publicado por Bellido y cols⁴⁰⁷ encontramos un efecto diferencial del tipo de ácido graso en la activación del NF-kB, observando que la ingesta de una comida rica en MUFA disminuía la activación de este factor de transcripción comparada con una comida rica en SFA, en las CMNs de individuos sanos. Estos resultados confirman que durante el postprandio se desencadena una respuesta inflamatoria aguda que, probablemente, se mantenga a lo largo del día lo que conllevaría a un aumento en los niveles de ROS, una mayor actividad nuclear del NF-kB y elevados niveles de las citoquinas pro-inflamatorias que están bajo su influencia^{320, 321, 406}. Este hecho es importante debido a que en los pacientes con SM subyace un estado de inflamación crónica de bajo grado⁴⁷. De acuerdo con esta afirmación, Aljada y cols¹⁸⁷ demostraron que el consumo de una

sobrecarga grasa incrementaba la actividad nuclear del NF-kB, acompañado de una disminución en la proteína IκB-α citoplasmática, en las CMNs de sujetos sanos.

En nuestros resultados observamos que, tras el consumo a largo plazo de una dieta HMUFA y 4 horas después de la sobrecarga grasa, a expensas de aceite de oliva, se produce una disminución de la actividad postprandial del NF-kB. De acuerdo con este resultado, hallamos una disminución postprandial en los niveles de la proteína p65 nuclear 4 h después de la sobrecarga rica en MUFA. Además, objetivamos una disminución postprandial en esta proteína siguiendo el consumo de una dieta HMUFA comparado con las dietas HSFA y LFHCC. Sin embargo, al analizar los datos para la proteína IκB-α citoplasmática no obtuvimos resultados significativos. La duración de la respuesta inflamatoria aguda es importante porque el periodo transcurrido entre las distintas comidas diarias suele ser de 4-5 horas, por lo que, un periodo postprandial anormal o prolongado conllevaría a un aumento en los niveles de ROS, una mayor actividad nuclear del NF-kB y elevados niveles de las citoquinas pro-inflamatorias que están bajo su influencia²⁵. Estos datos apoyarían las evidencias que apuntan a los MUFA, concretamente al ácido oleico del aceite de oliva, como el componente clave de la DM y el responsable de su efecto protector mejorando los fenómenos inflamatorios³³⁶. Además, se ha sugerido que el consumo de MUFA podría contribuir a la prevención de la aterogénesis a través del desplazamiento selectivo de los SFA en los fosfolípidos de la membrana celular y a una modulación de la expresión de los genes involucrados en el reclutamiento de los monocitos.

Por otro lado, observamos un incremento postprandial en la transcripción del ARNm de IκB-α en las CMNs 4 horas después de la sobrecarga grasa enriquecida en MUFA, en comparación con las sobrecargas altas en SFA y en PUFA n-3. Estos resultados podrían ser explicados debido a que otros factores de transcripción podrían modular la expresión de los genes IκB, además del NF-kB. Datos previos sugieren que existen distintos factores de transcripción que podrían unirse a la región promotora de los genes de la familia IκB e incrementar su expresión. En este sentido, una hipótesis sería que estos factores podrían estar modulados por los MUFA. Algunos de estos factores de transcripción podrían ser los miembros de la familia “*forkhead box transcription factor O (FoxO)*”^{436, 437, 438} o, tal vez, el factor de transcripción *Sp1*⁴³⁹, aunque esta hipótesis necesita ser investigada. La molécula de IκB-α nuevamente

sintetizada podría interrumpir la unión del NF- κ B al ADN y promover su translocación desde el núcleo al citoplasma, donde NF- κ B permanecería inactivo unido a su inhibidor I κ B, con lo cual, se produciría una disminución de la respuesta inflamatoria en las CMNs^{440, 441}. De acuerdo con nuestros resultados existen varios trabajos publicados en los que se objetivó un aumento postprandial en la expresión génica de I κ B- α tras el consumo de una DM, a expensas de aceite de oliva, comparado con una dieta alta en SFA y otra enriquecida en PUFA n-3 de origen vegetal (ácido α -linolénico), en las CMNs de personas de edad avanzada^{433, 434}.

Por otra parte, observamos un aumento en los niveles del gen I κ B- α en el periodo basal (ayunas) tras las 12 semanas del consumo de una dieta LFHCC n-3, comparado con el consumo de las dietas HSFA y HMUFA. Este resultado podría explicar el efecto beneficioso del consumo a largo plazo de los PUFA n-3 de cadena larga y de origen marino mejorando los procesos inflamatorios asociados con el SM^{349, 350}.

Una de las citoquinas pro-inflamatorias que juega un importante papel en el SM es el TNF- α , ya que se relaciona con la RI, la obesidad, la HTA o la dislipemia²²⁵. En células endoteliales, el TNF- α induce una disminución de la fosforilación en tirosina del receptor de la insulina, así como una menor expresión del mismo²⁹³. Además, esta citoquina también disminuye la expresión del transportador de glucosa (GLUT)-4. En nuestro estudio hallamos que tras el consumo a largo plazo de una dieta HMUFA se redujo la expresión postprandial del gen TNF- α comparado con los valores de expresión obtenidos tras la dieta HSFA. Estos resultados corroboran datos previos en donde se observó una mayor expresión génica del TNF- α tras consumir una dieta típica Occidental (HSFA), respecto al consumo de una DM, en las CMNs de personas jóvenes y sanas⁴³⁵. Además, recientemente se ha demostrado una menor expresión del gen TNF- α tras el consumo de una DM, a expensas de aceite de oliva, respecto al consumo de una dieta baja en grasa y enriquecida en PUFA n-3 de origen vegetal, en las CMNs de personas de edad avanzada⁴³³.

Estudios previos han demostrado un incremento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en las CMNs y en el tejido adiposo de sujetos obesos^{106, 107}. Las CMNs tienen un papel clave tanto en la génesis como en la progresión de la lesión aterosclerótica. La infiltración del tejido adiposo por macrófagos induce la activación de los adipocitos y aumenta la expresión de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias,

hecho que se ha correlacionado de forma directa con el IMC²²². Asimismo, el TNF- α estimula la lipólisis que a su vez promueve la RI, la hiperinsulinemia y la HTA²⁹⁷. De este modo, el aumento de expresión del TNF- α en el tejido adiposo podría ser la unión entre obesidad y RI y, en última instancia, tener un papel muy importante en el desarrollo de SM²⁹⁸.

Diversos estudios en humanos indican que la obesidad y la RI están asociadas con la activación de las CMNs debido a cambios en la expresión génica de una gran variedad de citoquinas relacionadas con las respuestas inmune e inflamatoria^{107, 442, 443}. En nuestro estudio, el hecho de que observemos un efecto beneficioso de la dieta HMUFA comparado con la dieta HSFA en la expresión génica de TNF- α en las CMNs de nuestros pacientes sin encontrar diferencias significativas en los niveles plasmáticos, podría explicarse porque la vida media en plasma de TNF- α sea relativamente corta⁴⁴², por la diferencia entre el tiempo de síntesis y secreción de esta proteína^{435, 443, 444} y/o la existencia de diferentes mecanismos reguladores de la secreción de esta molécula en las CMNs⁴⁴⁴.

Un factor importante en la aterosclerosis es la estabilidad de la placa, ya que su ruptura ocasiona la mayoría de los síndromes coronarios agudos. Las placas ateroscleróticas están formadas por un acúmulo de macrófagos enriquecidos en lípidos, células del músculo liso y matriz extracelular^{445, 446}. Los factores determinantes de la inestabilidad y de la ruptura de la placa son la acumulación continua de lípidos, un proceso inflamatorio crónico y el desequilibrio entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular, este último evento se vincula de forma directa con las MMPs de matriz, y concretamente con la MMP-9, implicada en varios estadios de la aterosclerosis a través del remodelado de la matriz extracelular⁴⁴⁵. Las células espumosas segregan más cantidad de MMP-9 en respuesta a las LDL oxidadas y a las citoquinas¹⁸⁶. La expresión de MMP-9 en las placas ateroscleróticas coincide con la producción de radicales libres, que se encuentran en mayores niveles en pacientes con SM¹⁰⁵. Además, la MMP-9 podría ser un potente mediador de la producción de ROS dependiente de la NADPH oxidasa en los procesos de aterosclerosis. Estudios previos sugieren que la actividad NADPH oxidasa incrementa significativamente después del consumo de una sobrecarga grasa¹⁸⁷.

Robert y cols²²⁸ observaron una disminución en los niveles plasmáticos de MMP-9, en sujetos con SM, tras el consumo de una dieta saludable (baja en grasa y alta en fibra)

y la realización de ejercicio físico. Al analizar nuestros resultados, observamos una reducción postprandial en la expresión génica de la MMP-9 después del consumo de la dieta HMUFA y un incremento postprandial tras el consumo de la dieta HSFA, en CMNs de pacientes con SM. Estos resultados confirman que la grasa de la dieta no solo puede influir en el desarrollo y progresión de la placa aterosclerótica sino que también es determinante en la estabilidad de la placa⁴⁴⁷.

El mecanismo responsable del aumento postprandial en la expresión génica del TNF- α y de la MMP-9, tras 12 semanas del consumo de la dieta HSFA, no se ha determinado pero podría ser debido a un incremento en la producción de ROS que inducirían la activación de una respuesta inflamatoria cuando este tipo de grasa es consumida. Asimismo, la disminución de la actividad transcripcional de los genes TNF- α y MMP-9 tras el consumo de la dieta HMUFA, es consistente con una disminución en la actividad nuclear del NF-kB y también con una mejora del estado pro-inflamatorio asociado al SM. Investigaciones previas concluyen que el TNF- α puede estimular la producción de la MMP-9, aunque el mecanismo de activación no está claro¹³³. Por otro lado, un estudio realizado en individuos delgados y obesos, demostró que en las CMNs de los obesos existía una mayor actividad del NF-kB y de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α y MMP-9, entre otras), comparada con las CMNs de los delgados, indicando que la obesidad y la inflamación se encuentran estrechamente relacionadas¹⁰⁷.

La MCP-1 es una quimioquina observada en las lesiones ricas en macrófagos y en las placas ateromatosas humanas. Una de las funciones de la MCP-1 es regular la migración e infiltración de los monocitos y otras células mononucleares en los sitios de inflamación¹⁵⁸. En el desarrollo de la aterosclerosis esta quimioquina funciona reclutando a los monocitos en la capa subendotelial¹⁵⁹, además, en presencia de factores de riesgo ateroscleróticos la expresión de la MCP-1 se incrementa en las lesiones¹⁶⁰. Nuestro objetivo fue determinar el efecto de la grasa de la dieta sobre la expresión génica en las CMNs y las concentraciones plasmáticas de la MCP-1, ya que en modelos animales se ha observado que la enfermedad ateromatosa se puede prevenir si determinadas quimioquinas, como la MCP-1 y la IL-8 son inhibidas^{448, 449}.

Nuestros resultados muestran que tras el consumo de la dieta HSFA y a las 2 h de la sobrecarga grasa se produce un incremento postprandial en la concentración plasmática de la MCP-1, comparada con el consumo de MUFA y de PUFA n-3 de cadena larga y

de origen marino. Sin embargo, al analizar los datos obtenidos en la expresión génica no obtuvimos diferencias significativas con ninguna de las dietas del estudio. Además de ser secretada por los macrófagos de la sangre, la MCP-1 puede ser expresada en células del músculo liso, células endoteliales, células hepáticas o macrófagos infiltrados en el tejido adiposo, entre otras, por lo que los niveles plasmáticos de esta proteína podrían corresponder a la suma de la expresión de estas células, sobre todo a los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo, ya que nuestros pacientes presentan obesidad abdominal y SM⁴⁵⁰. De hecho, existen evidencias indicando que la concentración de citoquinas plasmáticas es mayor en sujetos obesos que en delgados, además, se ha correlacionado positivamente la masa del tejido adiposo con altos niveles circulantes de citoquinas en sujetos obesos⁴⁵¹.

Trabajos previos han confirmado la estrecha relación existente entre la concentración de resistina en plasma, la inflamación y enfermedades como la aterosclerosis, la RI y la DMT2. Sin embargo, también existen estudios que afirman que no existe relación alguna entre la resistina y los marcadores lipídicos o metabólicos⁴⁵². Aunque no está claro cuál es el efecto diferencial que la grasa de la dieta puede ejercer en los niveles de resistina en plasma, en este trabajo observamos que tras la ingesta a largo plazo de una dieta LFHCC n-3 y en ayunas se obtuvieron los menores niveles de resistina plasmática comparados con el consumo a largo plazo de una dieta HSFA. Además, este efecto se mantuvo a lo largo del postprandio indicando que los ácidos grasos de la dieta pueden modular los niveles de esta adipoquina en pacientes con SM.

Un estudio transversal demostró que la concentración de resistina en plasma se encontraba asociada con los niveles de MCP-1 plasmáticos en adultos no diabéticos sin ECV³⁷. Asimismo, investigaciones previas concluyeron que el TNF- α y la IL-6 estimulaban la producción de resistina en CMNs de sangre⁴⁵³, además, también se ha demostrado que la resistina puede potenciar la expresión del TNF- α y la IL-6 en CMNs de sangre, vía NF- κ B⁴⁵⁴. Se conoce que los PUFA n-3 presentan propiedades anti-inflamatorias e inmunomoduladoras^{349, 350} y que mejoran la sensibilidad a la insulina³⁵¹. Del mismo modo, el consumo a largo plazo de EPA y DHA puede ocasionar una mayor estabilidad de la placa de ateroma al reducir la migración e infiltración de células inflamatorias y/o mediante una menor actividad de estas células una vez que se han infiltrado en la placa^{411, 455}.

Estudios observacionales han descrito que los sujetos con SM presentan elevadas concentraciones de moléculas pro-trombóticas y pro-inflamatorias asociadas con el desarrollo de HTA, alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa, así como una disfunción del endotelio e inflamación vascular^{220, 226, 227}. Estas moléculas pro-inflamatorias pueden inducir la secreción de diferentes adipocinas en el tejido adiposo²²², así como bajas concentraciones de adiponectina^{217, 218, 219}. La disminución plasmática de adiponectina promueve la adherencia de monocitos al endotelio dando lugar a uno de los eventos clave en el desarrollo de la aterosclerosis^{223, 224}. Los resultados obtenidos en nuestro estudio tras analizar los niveles plasmáticos de adiponectina y leptina, así como, la expresión génica del MIF y de p65 en CMNs no revelaron cambios significativos tras el periodo de intervención dietética ni durante el postprandio. Teniendo en cuenta las condiciones de nuestro estudio, estos resultados nos hacen pensar que dichos parámetros podrían no estar modulados por los ácidos grasos de la dieta, o al menos que este hecho no ocurra en pacientes con SM en los que ya existe un estado inflamatorio crónico de bajo grado.

Por otro lado, observamos un incremento postprandial en el ARNm de la IL-6, IL-8 e IL-1 β en CMNs, además de los niveles plasmáticos de la IL-6 y de los NEFAs, independientemente de la cantidad y la calidad de la grasa consumida durante la intervención dietética y en la sobrecarga grasa. Estos resultados apoyan la hipótesis de la inducción de una respuesta inflamatoria aguda durante el postprandio y confirman la relación existente entre la ingesta de comida, el daño oxidativo, la inflamación y la aterosclerosis¹⁸⁷. Según nuestros resultados, esta respuesta inflamatoria postprandial se atenúa cuando se consumen modelos de alimentación saludables, como las dietas HMUFA o LFHCC n-3.

Estudios previos sugieren que la lipemia postprandial induce una disfunción endotelial³⁹⁶ que se acompaña de una respuesta inflamatoria aguda³⁹⁷, un estado pro-trombótico³⁹⁸ y un aumento en los niveles de EO³⁹⁹. En este contexto, estudiamos la relación existente entre la actividad postprandial del NF-kB, la expresión de las proteínas p65 e IKB- α y la expresión génica de las distintas citoquinas estudiadas con los niveles plasmáticos de TG y de las LRTs (quilomicrones y sus remanentes), dado que estudios previos han sugerido que en el postprandio las LRTs podrían modular la inflamación.

Los datos obtenidos en el análisis de correlación confirman que durante el periodo postprandial se desencadena una respuesta inflamatoria aguda y se produce un aumento en las ROS, ya que existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de TG y de las lipoproteínas ricas en TG (quilomicrones y sus remanentes) con la MMP-9, molécula que se expresa en mayor cantidad con el aumento de radicales libres y moléculas de LDL oxidadas y que también está implicada en la estabilidad de la placa aterosclerótica.

Por otro lado, observamos una correlación positiva entre las distintas moléculas pro-inflamatorias estudiadas, tanto en ayunas como durante el postprandio, lo que nos hace pensar que la respuesta inflamatoria es una reacción altamente compleja del organismo frente a una agresión, en nuestro caso el exceso de grasa, en la que intervienen múltiples moléculas y en la que se producen cambios metabólicos que, a largo plazo, podrían comprometer la integridad de los órganos diana.

La obtención de muestras de cualquier tejido es una limitación en la mayoría de los estudios, sobre todo en los realizados en humanos. Las CMNs de la sangre se usan cada vez más al ser una muestra fácil de recoger y aislar y, además, se pueden obtener en grandes cantidades y de forma repetida sin producir un perjuicio para el paciente, a diferencia de otro tipo de tejidos como el hígado o el tejido adiposo⁴⁵⁶. Se ha demostrado que la medida de la expresión génica en CMNs es muy útil para caracterizar posibles adaptaciones metabólicas a la ingesta de alimentos en los sujetos normopeso, además, también pueden reflejar los diferentes cambios homeostáticos que puedan ocurrir en condiciones de obesidad^{107, 457, 458}. Las CMNs de sangre tienen un papel clave tanto en la génesis como en la progresión de la placa aterosclerótica. Además, la inflamación de bajo grado está asociada con la activación de las CMNs y con cambios en la expresión génica de una gran variedad de citoquinas relacionadas con las repuestas inmune e inflamatoria^{107, 456}.

Los resultados de este estudio sugieren que las CMNs de la sangre pueden proporcionar una visión representativa del estado pro-inflamatorio, en términos de activación de factores de transcripción, marcadores inflamatorios en plasma y cambios en la expresión de genes pro-inflamatorios en pacientes con SM. Sabemos que la ingesta de macronutrientes induce un estado pro-oxidante, un aumento en los biomarcadores inflamatorios y moléculas de adhesión celular e induce una disfunción endotelial, todos ellos proceso implicados en la génesis de la aterosclerosis. Además,

estos efectos se encuentran incrementados en individuos con obesidad abdominal y RI, como ocurre en pacientes con SM. Así, las CMNs de sangre se pueden utilizar como un modelo para evaluar la inflamación sistémica y su relación con la RI en pacientes obesos y con SM¹⁰⁷.

La importancia de nuestro estudio radica en su diseño. La integración del análisis del periodo postprandial tras el consumo crónico de distintos tipos de dieta durante las 12 semanas es interesante desde el punto de vista metodológico ya que nos proporciona una información dinámica de lo que ocurre durante el postprandio. Por último, hay que destacar que nuestro estudio presenta algunas limitaciones. Por un lado, siempre es difícil garantizar la adherencia a las instrucciones dietéticas en un ensayo de intervención, sin embargo, la adherencia a los estándares recomendados de los hábitos alimentarios fue adecuada, a juzgar por nuestras mediciones. Por otro lado, nuestro diseño tiene la fortaleza de reproducir las condiciones de la vida real, fundamentalmente en el consumo de alimentos típicos de nuestra DM, lo que refleja la práctica habitual y lo que nos permitiría generar recomendaciones nutricionales a este grupo de pacientes.

En definitiva y a modo de resumen, nuestros resultados sugieren que durante el periodo postprandial la dieta HMUFA induce una disminución en la actividad nuclear del NF- κ B, disminuye los niveles de la proteína p65 nuclear, la expresión génica del TNF- α y de la MMP-9, así como, la concentración de la MCP-1 en plasma, lo que se traduce en una menor respuesta inflamatoria en las CMNs de pacientes con SM. Además, tras el consumo de la dieta enriquecida en PUFA n-3 (LFHCC n-3) disminuyen los niveles postprandiales de la MCP-1 en plasma y, además, se observan los menores niveles de resistina plasmática en pacientes con SM. En contraposición, el consumo de la dieta HSFA, típica de los países occidentales, induce una mayor respuesta inflamatoria en pacientes con SM.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que la calidad y la cantidad de grasa de la dieta modulan la respuesta inflamatoria en pacientes con SM. Los resultados obtenidos sugieren que un modelo de dieta saludable, con alto contenido en MUFA o en PUFA n-3 de cadena larga, mejoran el estado inflamatorio postprandial en pacientes con SM. De este modo, estos modelos de dietas saludables podrían ser apropiados como terapia nutricional para prevenir el desarrollo de ECV en pacientes con SM.



VIII. CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN PRINCIPAL

El consumo de una dieta rica en grasa monoinsaturada (HMUFA), seguida de una sobrecarga grasa a expensas de aceite de oliva, reduce la activación postprandial del factor de transcripción nuclear- κ B respecto a una dieta rica en grasa saturada (HSFA) y dos dietas bajas en grasa enriquecidas o no con poliinsaturados n-3 de cadena larga, en las células mononucleares de pacientes con Síndrome Metabólico.

CONCLUSIONES SECUNDARIAS

1. Durante el estado postprandial el consumo de la dieta HMUFA, a expensas de aceite de oliva, disminuye los niveles proteicos de p65 nuclear en las células mononucleares de pacientes con Síndrome Metabólico, comparado con la dieta HSFA y con otra dieta baja en grasa y rica en hidratos de carbono complejos (LFHCC). No se observaron diferencias significativas en la proteína I κ B- α citoplasmática tras las diferentes dietas.

2. La ingesta de la dieta HMUFA atenúa el estado inflamatorio postprandial al inducir un aumento en la expresión génica de I κ B- α comparado con el consumo de la dieta HSFA y de otra baja en grasa y enriquecida en poliinsaturados n-3 de cadena larga (LFHCC n-3). Además, el efecto de la dieta HMUFA se encuentra reforzado al disminuir la expresión postprandial de los genes TNF- α y MMP-9 comparado con la dieta HSFA, en las células mononucleares de pacientes con Síndrome Metabólico. No observamos diferencias significativas tras la ingesta de los cuatro modelos de alimentación en los genes p65, IL-1 β , IL-6, MCP-1, IL-8 y MIF.

3. El consumo de las dietas HMUFA y LFHCC n-3, inducen un descenso postprandial en la concentración plasmática de la proteína MCP-1 respecto a la ingesta de la dieta HSFA. Además, el consumo de la dieta LFHCC n-3, tanto a largo plazo como durante el estado postprandial, produce una reducción en los niveles plasmáticos de resistina comparado con la ingesta de la dieta HSFA, en pacientes con Síndrome Metabólico. Los resultados obtenidos en los niveles plasmáticos de TNF- α , IL-6, adiponectina, leptina y ácidos grasos libres no revelaron cambios significativos con ninguna de las dietas estudiadas.

4. Las variaciones observadas en la expresión génica de la MMP-9 de los diferentes modelos de alimentación de nuestro estudio, se correlacionan positivamente con las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y sus remanentes) en el periodo postprandial. Sin embargo, no encontramos relación entre el grado de respuesta de las lipoproteínas ricas en triglicéridos con el resto de genes inflamatorios analizados.



IX. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Enzi, G., L. Busetto, E.M. Inelmen, A. Coin, and G. Sergi. **Historical perspective: visceral obesity and related comorbidity in Joannes Baptista Morgagni's 'De sedibus et causis morborum per anatomen indagata'**. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. 27(4): p. 534-5.
2. E, K. **Studien über das Hypertonie-Hyperglykemie-Hyperurikemie syndrome**. *Zentralblatt für Innere Medizin*, 1923. 44: p. 105-127.
3. Marañón, G. **'Prädiabetische Zustände'**. **Abhandlungen aus den grenzgebiete der Inneren Secretion**. *Wissenschaftliche Verlags Buchhandlung Rudolf Novak.*, 1927: p. 12-42.
4. Vague, J. **La différentiation sexuelle**. *Presse Med*, 1947. 55(30): p. 339-340.
5. Reaven, G., A. Calciano, R. Cody, C. Lucas, and R. Miller. **Carbohydrate Intolerance and Hyperlipemia in Patients with Myocardial Infarction without Known Diabetes Mellitus**. *J Clin Endocrinol Metab*, 1963. 23: p. 1013-23.
6. Camus, J.P. **[Gout, diabetes, hyperlipemia: a metabolic trisyndrome]**. *Rev Rhum Mal Osteoartic*, 1966. 33(1): p. 10-4.
7. Avogaro P, C.C. **European association for the study of diabetes**. *Diabetologia*, 1965. 1: p. 137.
8. Mehnert, H. and H. Kuhlmann. **[Hypertension and diabetes mellitus]**. *Dtsch Med J*, 1968. 19(16): p. 567-71.
9. Hanefeld M, L.W. **Das metabolische syndrom**. *Dt Gesundh Wesen*, 1981. 36: p. 545-551.
10. Modan, M., H. Halkin, S. Almog, A. Lusky, A. Eshkol, M. Shefi, A. Shitrit, and Z. Fuchs. **Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance**. *J Clin Invest*, 1985. 75(3): p. 809-17.
11. Reaven, G.M. **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease**. *Diabetes*, 1988. 37(12): p. 1595-607.
12. Bjorntorp, P. **Metabolic implications of body fat distribution**. *Diabetes Care*, 1991. 14(12): p. 1132-43.
13. DeFronzo, R.A. and E. Ferrannini. **Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease**. *Diabetes Care*, 1991. 14(3): p. 173-94.
14. Haffner, S.M., R.A. Valdez, H.P. Hazuda, B.D. Mitchell, P.A. Morales, and M.P. Stern. **Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X)**. *Diabetes*, 1992. 41(6): p. 715-22.
15. Ferrannini, E., S.M. Haffner, B.D. Mitchell, and M.P. Stern. **Hyperinsulinaemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome**. *Diabetologia*, 1991. 34(6): p. 416-22.
16. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation**. *Diabet Med*, 1998. 15(7): p. 539-53.
17. Balkau, B. and M.A. Charles. **Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)**. *Diabet Med*, 1999. 16(5): p. 442-3.
18. **Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood**

- Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report.** *Circulation*, 2002. 106(25): p. 3143-421.
19. **American College of Endocrinology Task Force on the Insulin Resistance Syndrome: American College of Endocrinology Position Statement on the Insulin Resistance Syndrome.** *Endocr Pract*, 2003. 9: p. 236-252.
 20. Ford, E.S., W.H. Giles, and W.H. Dietz. **Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey.** *Jama*, 2002. 287(3): p. 356-9.
 21. ES., F. **Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S.** *Diabetes Care*, 2005. 28(11): p. 2745-2749.
 22. Isomaa, B., P. Almgren, T. Tuomi, B. Forsen, K. Lahti, M. Nissen, M.R. Taskinen, and L. Groop. **Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome.** *Diabetes Care*, 2001. 24(4): p. 683-9.
 23. McNeill, A.M., W.D. Rosamond, C.J. Girman, S.H. Golden, M.I. Schmidt, H.E. East, C.M. Ballantyne, and G. Heiss. **The metabolic syndrome and 11-year risk of incident cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study.** *Diabetes Care*, 2005. 28(2): p. 385-90.
 24. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw. **The metabolic syndrome--a new worldwide definition.** *Lancet*, 2005. 366(9491): p. 1059-62.
 25. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet. **The metabolic syndrome.** *Lancet*, 2005. 365(9468): p. 1415-28.
 26. Shiwaku, K., E. Anuurad, B. Enkhmaa, K. Kitajima, and Y. Yamane. **Appropriate BMI for Asian populations.** *Lancet*, 2004. 363(9414): p. 1077.
 27. Tan, C.E., S. Ma, D. Wai, S.K. Chew, and E.S. Tai. **Can we apply the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel definition of the metabolic syndrome to Asians?** *Diabetes Care*, 2004. 27(5): p. 1182-6.
 28. Kahn, R., J. Buse, E. Ferrannini, and M. Stern. **The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.** *Diabetes Care*, 2005. 28(9): p. 2289-304.
 29. Liao, Y., S. Kwon, S. Shaughnessy, P. Wallace, A. Hutto, A.J. Jenkins, R.L. Klein, and W.T. Garvey. **Critical evaluation of adult treatment panel III criteria in identifying insulin resistance with dyslipidemia.** *Diabetes Care*, 2004. 27(4): p. 978-83.
 30. Reaven, G.M. **The metabolic syndrome: is this diagnosis necessary?** *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(6): p. 1237-47.
 31. Mente, A., S. Yusuf, S. Islam, M.J. McQueen, S. Tanomsup, C.L. Onen, S. Rangarajan, H.C. Gerstein, and S.S. Anand. **Metabolic syndrome and risk of acute myocardial infarction a case-control study of 26,903 subjects from 52 countries.** *J Am Coll Cardiol*. 55(21): p. 2390-8.
 32. Grundy, S.M., J.I. Cleeman, S.R. Daniels, K.A. Donato, R.H. Eckel, B.A. Franklin, D.J. Gordon, R.M. Krauss, P.J. Savage, S.C. Smith, Jr., J.A. Spertus, and F. Costa. **Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement.** *Circulation*, 2005. 112(17): p. 2735-52.
 33. Alberti, K.G., R.H. Eckel, S.M. Grundy, P.Z. Zimmet, J.I. Cleeman, K.A. Donato, J.C. Fruchart, W.P. James, C.M. Loria, and S.C. Smith, Jr. **Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and**

- Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 2009. 120(16): p. 1640-5.**
34. Alessi, M.C. and I. Juhan-Vague. **Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis.** *Thromb Haemost*, 2008. 99(6): p. 995-1000.
 35. Saltevo, J., M. Vanhala, H. Kautiainen, E. Kumpusalo, and M. Laakso. **Association of C-reactive protein, interleukin-1 receptor antagonist and adiponectin with the metabolic syndrome.** *Mediators Inflamm*, 2007. 2007: p. 93573.
 36. Hung, J., B.M. McQuillan, P.L. Thompson, and J.P. Beilby. **Circulating adiponectin levels associate with inflammatory markers, insulin resistance and metabolic syndrome independent of obesity.** *Int J Obes (Lond)*, 2008. 32(5): p. 772-9.
 37. Aquilante, C.L., L.A. Kosmiski, S.D. Knutsen, and I. Zineh. **Relationship between plasma resistin concentrations, inflammatory chemokines, and components of the metabolic syndrome in adults.** *Metabolism*, 2008. 57(4): p. 494-501.
 38. Sutherland, J.P., B. McKinley, and R.H. Eckel. **The metabolic syndrome and inflammation.** *Metab Syndr Relat Disord*, 2004. 2(2): p. 82-104.
 39. Wajchenberg, B.L., M. Nery, M.R. Cunha, and M.E. Silva. **Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis.** *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2009. 53(2): p. 145-50.
 40. Elks, C.M. and J. Francis. **Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome.** *Curr Hypertens Rep*. 12(2): p. 99-104.
 41. Hamaguchi, M., T. Kojima, N. Takeda, T. Nakagawa, H. Taniguchi, K. Fujii, T. Omatsu, T. Nakajima, H. Sarui, M. Shimazaki, T. Kato, J. Okuda, and K. Ida. **The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease.** *Ann Intern Med*, 2005. 143(10): p. 722-8.
 42. Suzuki, T., K. Hirata, M.S. Elkind, Z. Jin, T. Rundek, Y. Miyake, B. Boden-Albala, M.R. Di Tullio, R. Sacco, and S. Homma. **Metabolic syndrome, endothelial dysfunction, and risk of cardiovascular events: the Northern Manhattan Study (NOMAS).** *Am Heart J*, 2008. 156(2): p. 405-10.
 43. Furukawa, S., T. Fujita, M. Shimabukuro, M. Iwaki, Y. Yamada, Y. Nakajima, O. Nakayama, M. Makishima, M. Matsuda, and I. Shimomura. **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *J Clin Invest*, 2004. 114(12): p. 1752-61.
 44. Van Guilder GP, H.G., Greiner JJ,. **Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults.** *Obesity (Silver Spring)*. 2006. 14(12): p. 2127-2131.
 45. Zimmet, P., K.G. Alberti, and J. Shaw. **Global and societal implications of the diabetes epidemic.** *Nature*, 2001. 414(6865): p. 782-7.
 46. Zimmet, P.Z., K.G. Alberti, and J.E. Shaw. **Mainstreaming the metabolic syndrome: a definitive definition.** *Med J Aust*, 2005. 183(4): p. 175-6.
 47. Fulop, T., D. Tessier, and A. Carpentier. **The metabolic syndrome.** *Pathol Biol (Paris)*, 2006. 54(7): p. 375-86.
 48. Grundy, S.M. **Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis.** *Circulation*, 2002. 105(23): p. 2696-8.
 49. Grundy, S.M., H.B. Brewer, Jr., J.I. Cleeman, S.C. Smith, Jr., and C. Lenfant. **Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and**

- Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(2): p. e13-8.
50. Magliano, D.J., J.E. Shaw, and P.Z. Zimmet. **How to best define the metabolic syndrome.** *Ann Med*, 2006. 38(1): p. 34-41.
 51. Laakso, M. and P.T. Kovanen. **Metabolic syndrome: to be or not to be?** *Ann Med*, 2006. 38(1): p. 32-3.
 52. Regueiro, J., López, C., González, S., Martínez, E. . **Células y tejidos del sistema inmune.** *Panamericana*, 2000: p. 9-20.
 53. Fleck, A. **Clinical and nutritional aspects of changes in acute-phase proteins during inflammation.** *Proc Nutr Soc*, 1989. 48(3): p. 347-54.
 54. Gabay, C. and I. Kushner. **Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation.** *N Engl J Med*, 1999. 340(6): p. 448-54.
 55. Michie, H.R. **Metabolism of sepsis and multiple organ failure.** *World J Surg*, 1996. 20(4): p. 460-4.
 56. Schlag, G. and H. Redl. **Mediators of injury and inflammation.** *World J Surg*, 1996. 20(4): p. 406-10.
 57. Bone, R.C. **Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation.** *Crit Care Med*, 1996. 24(1): p. 163-72.
 58. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri. **Inflammation and atherosclerosis.** *Circulation*, 2002. 105(9): p. 1135-43.
 59. Corti, R., V. Fuster, and J.J. Badimon. **Pathogenetic concepts of acute coronary syndromes.** *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41(4 Suppl S): p. 7S-14S.
 60. Ross, R. **Atherosclerosis--an inflammatory disease.** *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
 61. Brand, K., S. Page, G. Rogler, A. Bartsch, R. Brandl, R. Knuechel, M. Page, C. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle, and D. Neumeier. **Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion.** *J Clin Invest*, 1996. 97(7): p. 1715-22.
 62. Brand, K., S. Page, A.K. Walli, D. Neumeier, and P.A. Baeuerle. **Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis.** *Exp Physiol*, 1997. 82(2): p. 297-304.
 63. Hajra, L., A.I. Evans, M. Chen, S.J. Hyduk, T. Collins, and M.I. Cybulsky. **The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(16): p. 9052-7.
 64. Ridker, P.M., N. Rifai, M.J. Stampfer, and C.H. Hennekens. **Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.** *Circulation*, 2000. 101(15): p. 1767-72.
 65. Ridker, P.M., N. Rifai, M. Pfeffer, F. Sacks, S. Lepage, and E. Braunwald. **Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction.** *Circulation*, 2000. 101(18): p. 2149-53.
 66. Ferrari, R. **The role of TNF in cardiovascular disease.** *Pharmacol Res*, 1999. 40(2): p. 97-105.
 67. Tartiere, J.M., O.F. Henry, H. Safar, J.M. Bureau, X. Girerd, M.E. Safar, and J. Blacher. **Carotid intima-media thickness and carotid and/or iliofemoral plaques: comparison of two markers of cardiovascular risk in hypertensive patients.** *J Hypertens*, 2003. 21(4): p. 739-46.

68. Thakore, A.H., C.Y. Guo, M.G. Larson, D. Corey, T.J. Wang, R.S. Vasan, R.B. D'Agostino, Sr., I. Lipinska, J.F. Keaney, Jr., E.J. Benjamin, and C.J. O'Donnell. **Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study).** *Am J Cardiol*, 2007. 99(11): p. 1598-602.
69. Branen, L., L. Hovgaard, M. Nitulescu, E. Bengtsson, J. Nilsson, and S. Jovinge. **Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(11): p. 2137-42.
70. Gotlieb, A.I., and Langille, B.L. **The role of rheology in atherosclerotic coronary artery disease.** . *Atherosclerosis and coronary artery disease*, 1996. 1: p. 595-606.
71. McMillan, D.E. **Blood flow and the localization of atherosclerotic plaques.** *Stroke*, 1985. 16(4): p. 582-7.
72. Nakashima, Y., E.W. Raines, A.S. Plump, J.L. Breslow, and R. Ross. **Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(5): p. 842-51.
73. Kaplan, M. and M. Aviram. **Retention of oxidized LDL by extracellular matrix proteoglycans leads to its uptake by macrophages: an alternative approach to study lipoproteins cellular uptake.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(3): p. 386-93.
74. Witztum, J.L. and D. Steinberg. **Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis.** *J Clin Invest*, 1991. 88(6): p. 1785-92.
75. Hoff, H.F., N. Zyromski, D. Armstrong, and J. O'Neil. **Aggregation as well as chemical modification of LDL during oxidation is responsible for poor processing in macrophages.** *J Lipid Res*, 1993. 34(11): p. 1919-29.
76. Reddy, S.T., V. Grijalva, C. Ng, K. Hassan, S. Hama, R. Mottahedeh, D.J. Wadleigh, M. Navab, and A.M. Fogelman. **Identification of genes induced by oxidized phospholipids in human aortic endothelial cells.** *Vascul Pharmacol*, 2002. 38(4): p. 211-8.
77. Cushing, S.D., J.A. Berliner, A.J. Valente, M.C. Territo, M. Navab, F. Parhami, R. Gerrity, C.J. Schwartz, and A.M. Fogelman. **Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(13): p. 5134-8.
78. Rajavashisth, T.B., H. Yamada, and N.K. Mishra. **Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(10): p. 1591-8.
79. Leitinger, N., T.R. Tyner, L. Oslund, C. Rizza, G. Subbanagounder, H. Lee, P.T. Shih, N. Mackman, G. Tigyi, M.C. Territo, J.A. Berliner, and D.K. Vora. **Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(21): p. 12010-5.
80. Mitchinson, M.J. **The new face of atherosclerosis.** *Br J Clin Pract*, 1994. 48(3): p. 149-51.
81. Glagov, S., E. Weisenberg, C.K. Zarins, R. Stankunavicius, and G.J. Kolettis. **Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries.** *N Engl J Med*, 1987. 316(22): p. 1371-5.

82. Libby, P., and Ross, R. **Cytokines and growth regulatory molecules.** *Atherosclerosis and coronary artery disease.* , 1996. 1: p. 585-594.
83. Raines, E.W., Rosenfeld, M.E., Ross, R. . **The role of macrophages.** . *Atherosclerosis and coronary artery disease.*, 1996. 1: p. 539-555.
84. Falk, E., Shah, P.K., Fuster, V. **Phatogenesis of plaque disruption.** *Atherosclerosis and coronary artery disease.*, 1996. 2: p. 492-510.
85. Bauriedel, G., S. Schluckebier, U. Welsch, K. Klingel, R. Kandolf, and G. Steinbeck. **[Incidence and localization of apoptosis bodies in human arteriosclerosis lesions].** *Z Kardiol*, 1996. 85(7): p. 509-18.
86. Bjorkerud, S. and B. Bjorkerud. **Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability.** *Am J Pathol*, 1996. 149(2): p. 367-80.
87. Han, D.K., C.C. Haudenschild, M.K. Hong, B.T. Tinkle, M.B. Leon, and G. Liau. **Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model.** *Am J Pathol*, 1995. 147(2): p. 267-77.
88. Libby, P. **Molecular bases of the acute coronary syndromes.** *Circulation*, 1995. 91(11): p. 2844-50.
89. Kinlay, S., P. Libby, and P. Ganz. **Endothelial function and coronary artery disease.** *Curr Opin Lipidol*, 2001. 12(4): p. 383-9.
90. Kataoka, H., N. Kume, S. Miyamoto, M. Minami, H. Moriwaki, T. Murase, T. Sawamura, T. Masaki, N. Hashimoto, and T. Kita. **Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions.** *Circulation*, 1999. 99(24): p. 3110-7.
91. Llorente-Cortes, V., J. Martinez-Gonzalez, and L. Badimon. **LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(6): p. 1572-9.
92. Yu, K.C. and J.C. Mamo. **Binding and uptake of chylomicron remnants by cultured arterial smooth muscle cells from normal and Watanabe-heritable-hyperlipidemic rabbits.** *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1346(3): p. 212-20.
93. Woolf, N., Davies, M.J. **Arterial plaque and thrombus formation.** *Sci Med*, 1994. 1(4): p. 38.
94. Ross, R. **The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
95. Brown, M.S. and J.L. Goldstein. **Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis.** *Annu Rev Biochem*, 1983. 52: p. 223-61.
96. Sakr, S.W., R.J. Eddy, H. Barth, F. Wang, S. Greenberg, F.R. Maxfield, and I. Tabas. **The uptake and degradation of matrix-bound lipoproteins by macrophages require an intact actin Cytoskeleton, Rho family GTPases, and myosin ATPase activity.** *J Biol Chem*, 2001. 276(40): p. 37649-58.
97. Haberland, M.E., G. Mottino, M. Le, and J.S. Frank. **Sequestration of aggregated LDL by macrophages studied with freeze-etch electron microscopy.** *J Lipid Res*, 2001. 42(4): p. 605-19.
98. Steinberg, D. **Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime.** *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1211-7.
99. Griendling, K.K. and R.W. Alexander. **Oxidative stress and cardiovascular disease.** *Circulation*, 1997. 96(10): p. 3264-5.

100. Guyton, J.R. and K.F. Klemp. **Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. 16(1): p. 4-11.
101. Fuster, V. **Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronary events.** *Am J Cardiol*, 1995. 76(9): p. 24C-33C.
102. Amento, E.P., N. Ehsani, H. Palmer, and P. Libby. **Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb*, 1991. 11(5): p. 1223-30.
103. Sukhova, G.K., U. Schonbeck, E. Rabkin, F.J. Schoen, A.R. Poole, R.C. Billingham, and P. Libby. **Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques.** *Circulation*, 1999. 99(19): p. 2503-9.
104. Horton, D.B., P. Libby, and U. Schonbeck. **Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity.** *Ann N Y Acad Sci*, 2001. 947: p. 329-36.
105. Zalba, G., A. Fortuno, J. Orbe, G. San Jose, M.U. Moreno, M. Belzunce, J.A. Rodriguez, O. Beloqui, J.A. Paramo, and J. Diez. **Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(3): p. 587-93.
106. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr. **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1796-808.
107. Ghanim, H., A. Aljada, D. Hofmeyer, T. Syed, P. Mohanty, and P. Dandona. **Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state.** *Circulation*, 2004. 110(12): p. 1564-71.
108. Mach, F., U. Schonbeck, J.Y. Bonnefoy, J.S. Pober, and P. Libby. **Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor.** *Circulation*, 1997. 96(2): p. 396-9.
109. Ghosh, S., M.J. May, and E.B. Kopp. **NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.** *Annu Rev Immunol*, 1998. 16: p. 225-60.
110. Monaco, C., E. Andreaskos, S. Kiriakidis, C. Mauri, C. Bicknell, B. Foxwell, N. Cheshire, E. Paleolog, and M. Feldmann. **Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(15): p. 5634-9.
111. Karin, M. **The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation.** *J Biol Chem*, 1999. 274(39): p. 27339-42.
112. Siebenlist, U., G. Franzoso, and K. Brown. **Structure, regulation and function of NF-kappa B.** *Annu Rev Cell Biol*, 1994. 10: p. 405-55.
113. Perez-Martinez, P., J. Lopez-Miranda, L. Blanco-Colio, C. Bellido, Y. Jimenez, J.A. Moreno, J. Delgado-Lista, J. Egido, and F. Perez-Jimenez. **The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men.** *Atherosclerosis*, 2007. 194(2): p. e141-6.
114. Piva, R., G. Belardo, and M.G. Santoro. **NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival.** *Antioxid Redox Signal*, 2006. 8(3-4): p. 478-86.

115. Arenzana-Seisdedos, F., J. Thompson, M.S. Rodriguez, F. Bachelierie, D. Thomas, and R.T. Hay. **Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B.** *Mol Cell Biol*, 1995. 15(5): p. 2689-96.
116. Thompson, J.E., R.J. Phillips, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Ghosh. **I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B.** *Cell*, 1995. 80(4): p. 573-82.
117. Karin, M. and Y. Ben-Neriah. **Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.** *Annu Rev Immunol*, 2000. 18: p. 621-63.
118. Nemoto, S., J.A. DiDonato, and A. Lin. **Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase.** *Mol Cell Biol*, 1998. 18(12): p. 7336-43.
119. Kumar, A., Y. Takada, A.M. Boriek, and B.B. Aggarwal. **Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease.** *J Mol Med (Berl)*, 2004. 82(7): p. 434-48.
120. Courtois, G. and T.D. Gilmore. **Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease.** *Oncogene*, 2006. 25(51): p. 6831-43.
121. Pomerantz, J.L. and D. Baltimore. **Two pathways to NF-kappaB.** *Mol Cell*, 2002. 10(4): p. 693-5.
122. Karin, M., Y. Yamamoto, and Q.M. Wang. **The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development.** *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(1): p. 17-26.
123. Parry, G.C. and N. Mackman. **A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain kappa B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers.** *J Biol Chem*, 1994. 269(33): p. 20823-5.
124. Arend, W.P. and J.M. Dayer. **Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum*, 1990. 33(3): p. 305-15.
125. Dripps, D.J., E. Verderber, R.K. Ng, R.C. Thompson, and S.P. Eisenberg. **Interleukin-1 receptor antagonist binds to the type II interleukin-1 receptor on B cells and neutrophils.** *J Biol Chem*, 1991. 266(30): p. 20311-5.
126. Dinarello, C.A., Moldawer, L.L. **Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians.** *Thousands Oaks, Amgen Inc*, 1999: p. 19-35.
127. Dinarello, C.A. **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood*, 1996. 87(6): p. 2095-147.
128. Dinarello, C.A. **The IL-1 family and inflammatory diseases.** *Clin Exp Rheumatol*, 2002. 20(5 Suppl 27): p. S1-13.
129. Laurincova, B. **Interleukin-1 family: from genes to human disease.** *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med*, 2000. 143: p. 19-29.
130. Bemelmans, M.H., L.J. van Tits, and W.A. Buurman. **Tumor necrosis factor: function, release and clearance.** *Crit Rev Immunol*, 1996. 16(1): p. 1-11.
131. Hajjar, K.A., D.P. Hajjar, R.L. Silverstein, and R.L. Nachman. **Tumor necrosis factor-mediated release of platelet-derived growth factor from cultured endothelial cells.** *J Exp Med*, 1987. 166(1): p. 235-45.
132. Vanden Berghe, W., L. Vermeulen, G. De Wilde, K. De Bosscher, E. Boone, and G. Haegeman. **Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6.** *Biochem Pharmacol*, 2000. 60(8): p. 1185-95.

133. Lee, C.W., C.C. Lin, W.N. Lin, K.C. Liang, S.F. Luo, C.B. Wu, S.W. Wang, and C.M. Yang. **TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 292(3): p. L799-812.
134. Shingu, M., Y. Nagai, T. Isayama, T. Naono, M. Nobunaga, and Y. Nagai. **The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells.** *Clin Exp Immunol*, 1993. 94(1): p. 145-9.
135. Jovinge, S., A. Hamsten, P. Tornvall, A. Proudler, P. Bavenholm, C.G. Ericsson, I. Godtsland, U. de Faire, and J. Nilsson. **Evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease.** *Metabolism*, 1998. 47(1): p. 113-8.
136. Baumann, H. and J. Gauldie. **The acute phase response.** *Immunol Today*, 1994. 15(2): p. 74-80.
137. Lotz, M. **Interleukin-6.** *Cancer Invest*, 1993. 11(6): p. 732-42.
138. Fernandez-Botran, R., P.M. Chilton, and Y. Ma. **Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy.** *Adv Immunol*, 1996. 63: p. 269-336.
139. Mohamed-Ali, V., J.H. Pinkney, and S.W. Coppel. **Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ.** *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998. 22(12): p. 1145-58.
140. Schobitz, B., G. Pezeshki, T. Pohl, U. Hemmann, P.C. Heinrich, F. Holsboer, and J.M. Reul. **Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo.** *Faseb J*, 1995. 9(8): p. 659-64.
141. Papanicolaou, D.A., R.L. Wilder, S.C. Manolagas, and G.P. Chrousos. **The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease.** *Ann Intern Med*, 1998. 128(2): p. 127-37.
142. McGhee, J.R., J. Mestecky, C.O. Elson, and H. Kiyono. **Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins.** *J Clin Immunol*, 1989. 9(3): p. 175-99.
143. Rivera, F., Campos, A., Parera, M., Rodrigo, C., Egado, J., Olivares, J. **Síntesis de interleucina-6 por células mononucleares de sangre periférica en la nefropatía IgA idiopática.** *Nefrología*, 1996. 16(6): p. 513-518.
144. Rus, H.G., R. Vlaicu, and F. Niculescu. **Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall.** *Atherosclerosis*, 1996. 127(2): p. 263-71.
145. Willerson, J.T. and P.M. Ridker. **Inflammation as a cardiovascular risk factor.** *Circulation*, 2004. 109(21 Suppl 1): p. II2-10.
146. Ikeda, U., T. Ito, and K. Shimada. **Interleukin-6 and acute coronary syndrome.** *Clin Cardiol*, 2001. 24(11): p. 701-4.
147. Ceciliani, F., A. Giordano, and V. Spagnolo. **The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins.** *Protein Pept Lett*, 2002. 9(3): p. 211-23.
148. Noronha, I.L., Z. Niemir, H. Stein, and R. Waldherr. **Cytokines and growth factors in renal disease.** *Nephrol Dial Transplant*, 1995. 10(6): p. 775-86.
149. Premack, B.A. and T.J. Schall. **Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection.** *Nat Med*, 1996. 2(11): p. 1174-8.
150. Murphy, P.M. **The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors.** *Annu Rev Immunol*, 1994. 12: p. 593-633.

151. Lodi, P.J., D.S. Garrett, J. Kuszewski, M.L. Tsang, J.A. Weatherbee, W.J. Leonard, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. **High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR.** *Science*, 1994. 263(5154): p. 1762-7.
152. Rollins, B.J. **Chemokines.** *Blood*, 1997. 90(3): p. 909-28.
153. Shyy, Y.J., Y.S. Li, and P.E. Kolattukudy. **Activation of MCP-1 gene expression is mediated through multiple signaling pathways.** *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 192(2): p. 693-9.
154. Xiao, D., Z. Wang, and M. She. **Minimally modified low-density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 expression in vivo and a novel model for monocyte adhesion to arterial intima.** *Chin Med J (Engl)*, 1999. 112(5): p. 438-42.
155. Harkness, K.A., J.D. Sussman, G.A. Davies-Jones, J. Greenwood, and M.N. Woodroffe. **Cytokine regulation of MCP-1 expression in brain and retinal microvascular endothelial cells.** *J Neuroimmunol*, 2003. 142(1-2): p. 1-9.
156. Shyy, Y.J., L.L. Wickham, J.P. Hagan, H.J. Hsieh, Y.L. Hu, S.H. Telian, A.J. Valente, K.L. Sung, and S. Chien. **Human monocyte colony-stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemotactic protein-1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers.** *J Clin Invest*, 1993. 92(4): p. 1745-51.
157. Loetscher, P., M. Seitz, M. Baggiolini, and B. Moser. **Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes.** *J Exp Med*, 1996. 184(2): p. 569-77.
158. Krishnaswamy, G., J. Kelley, L. Yerra, J.K. Smith, and D.S. Chi. **Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease.** *J Interferon Cytokine Res*, 1999. 19(2): p. 91-104.
159. Seino, Y., U. Ikeda, M. Takahashi, Y. Hojo, M. Irokawa, T. Kasahara, and K. Shimada. **Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular tissue.** *Cytokine*, 1995. 7(6): p. 575-9.
160. Young, J.L., P. Libby, and U. Schonbeck. **Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis.** *Thromb Haemost*, 2002. 88(4): p. 554-67.
161. Klouche, M., S. Gottschling, V. Gerl, W. Hell, M. Husmann, B. Dorweiler, M. Messner, and S. Bhakdi. **Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(9): p. 1376-85.
162. Han, K.H., R.K. Tangirala, S.R. Green, and O. Quehenberger. **Chemokine receptor CCR2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis in human monocytes. A regulatory role for plasma LDL.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(12): p. 1983-91.
163. Gerszten, R.E., E.A. Garcia-Zepeda, Y.C. Lim, M. Yoshida, H.A. Ding, M.A. Gimbrone, Jr., A.D. Luster, F.W. Luscinskas, and A. Rosenzweig. **MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.** *Nature*, 1999. 398(6729): p. 718-23.
164. van Aken, B.E., P.H. Reitsma, and F.R. Rosendaal. **Interleukin 8 and venous thrombosis: evidence for a role of inflammation in thrombosis.** *Br J Haematol*, 2002. 116(1): p. 173-7.
165. Takahashi, A., K. Iwabuchi, M. Suzuki, K. Ogasawara, J. Nishihira, and K. Onoe. **Antisense macrophage migration inhibitory factor (MIF) prevents**

- anti-IgM mediated growth arrest and apoptosis of a murine B cell line by regulating cell cycle progression.** *Microbiol Immunol*, 1999. 43(1): p. 61-7.
166. Nishino, T., J. Bernhagen, H. Shiiki, T. Calandra, K. Dohi, and R. Bucala. **Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland.** *Mol Med*, 1995. 1(7): p. 781-8.
 167. David, J.R. **Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966. 56(1): p. 72-7.
 168. Nathan, C.F., M.L. Karnovsky, and J.R. David. **Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes.** *J Exp Med*, 1971. 133(6): p. 1356-76.
 169. Nathan, C.F., H.G. Remold, and J.R. David. **Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions.** *J Exp Med*, 1973. 137(2): p. 275-90.
 170. Churchill, W.H., Jr., W.F. Piessens, C.A. Sulis, and J.R. David. **Macrophages activated as suspension cultures with lymphocyte mediators devoid of antigen become cytotoxic for tumor cells.** *J Immunol*, 1975. 115(3): p. 781-6.
 171. Herriott, M.J., H. Jiang, C.A. Stewart, D.J. Fast, and R.W. Leu. **Mechanistic differences between migration inhibitory factor (MIF) and IFN-gamma for macrophage activation. MIF and IFN-gamma synergize with lipid A to mediate migration inhibition but only IFN-gamma induces production of TNF-alpha and nitric oxide.** *J Immunol*, 1993. 150(10): p. 4524-31.
 172. Bernhagen, J., R.A. Mitchell, T. Calandra, W. Voelter, A. Cerami, and R. Bucala. **Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF).** *Biochemistry*, 1994. 33(47): p. 14144-55.
 173. Weber, C., A. Schober, and A. Zernecke. **Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(11): p. 1997-2008.
 174. Calandra, T., J. Bernhagen, C.N. Metz, L.A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami, and R. Bucala. **MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production.** *Nature*, 1995. 377(6544): p. 68-71.
 175. Calandra, T. and R. Bucala. **Macrophage migration inhibitory factor: a counter-regulator of glucocorticoid action and critical mediator of septic shock.** *J Inflamm*, 1995. 47(1-2): p. 39-51.
 176. Onodera, S., K. Kaneda, Y. Mizue, Y. Koyama, M. Fujinaga, and J. Nishihira. **Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis.** *J Biol Chem*, 2000. 275(1): p. 444-50.
 177. Libby, P. and R.T. Lee. **Matrix matters.** *Circulation*, 2000. 102(16): p. 1874-6.
 178. Shah, P.K. and Z.S. Galis. **Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain.** *Circulation*, 2001. 104(16): p. 1878-80.
 179. Visse, R. and H. Nagase. **Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.** *Circ Res*, 2003. 92(8): p. 827-39.
 180. Patterson, M.L., S.J. Atkinson, V. Knauper, and G. Murphy. **Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin**

- domain and not the fibronectin-like domain.** *FEBS Lett*, 2001. 503(2-3): p. 158-62.
181. Nelson, A.R., B. Fingleton, M.L. Rothenberg, and L.M. Matrisian. **Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications.** *J Clin Oncol*, 2000. 18(5): p. 1135-49.
 182. Galis, Z.S. and J.J. Khatri. **Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.** *Circ Res*, 2002. 90(3): p. 251-62.
 183. Szmitko, P.E., C.H. Wang, R.D. Weisel, G.A. Jeffries, T.J. Anderson, and S. Verma. **Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation: Part II.** *Circulation*, 2003. 108(17): p. 2041-8.
 184. Murphy, G., R.M. Hembry, C.E. Hughes, A.J. Fosang, and T.E. Hardingham. **Role and regulation of metalloproteinases in connective tissue turnover.** *Biochem Soc Trans*, 1990. 18(5): p. 812-5.
 185. Johnatty, R.N., D.D. Taub, S.P. Reeder, S.M. Turcovski-Corrales, D.W. Cottam, T.J. Stephenson, and R.C. Rees. **Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes.** *J Immunol*, 1997. 158(5): p. 2327-33.
 186. Rodríguez, J.A., Orbe, J., Páramo, J.A. . **Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos.** . *Páramo Rev Esp Cardiol*, 2007. 60: p. 959-967.
 187. Aljada, A., P. Mohanty, H. Ghanim, T. Abdo, D. Tripathy, A. Chaudhuri, and P. Dandona. **Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect.** *Am J Clin Nutr*, 2004. 79(4): p. 682-90.
 188. Marx, N., J. Froehlich, L. Siam, J. Ittner, G. Wierse, A. Schmidt, H. Scharnagl, V. Hombach, and W. Koenig. **Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(2): p. 283-8.
 189. Ahima, R.S. and J.S. Flier. **Adipose tissue as an endocrine organ.** *Trends Endocrinol Metab*, 2000. 11(8): p. 327-32.
 190. Mehta, N.N., Reilly, M.P. **Mechanisms of the metabolic syndrome** *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 2004. 1(2): p. 187-194.
 191. Ahmed, I. and B.J. Goldstein. **Cardiovascular risk in the spectrum of type 2 diabetes mellitus.** *Mt Sinai J Med*, 2006. 73(5): p. 759-68.
 192. Guzik, T.J., D. Mangalat, and R. Korbut. **Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function?** *J Physiol Pharmacol*, 2006. 57(4): p. 505-28.
 193. Ouchi, N., S. Kihara, T. Funahashi, Y. Matsuzawa, and K. Walsh. **Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease.** *Curr Opin Lipidol*, 2003. 14(6): p. 561-6.
 194. Chandran, M., S.A. Phillips, T. Ciaraldi, and R.R. Henry. **Adiponectin: more than just another fat cell hormone?** *Diabetes Care*, 2003. 26(8): p. 2442-50.
 195. Yatagai, T., S. Nagasaka, A. Taniguchi, M. Fukushima, T. Nakamura, A. Kuroe, Y. Nakai, and S. Ishibashi. **Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus.** *Metabolism*, 2003. 52(10): p. 1274-8.
 196. Hotta, K., T. Funahashi, N.L. Bodkin, H.K. Ortmeier, Y. Arita, B.C. Hansen, and Y. Matsuzawa. **Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during**

- the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys.** *Diabetes*, 2001. 50(5): p. 1126-33.
197. Argente, J., Moreno-Martos, G.A., Hernandez, M. **El tejido adiposo como glándula endocrina. Obesidad y síndrome metabólico.** *BOL PEDIATR*, 2006. 46: p. 269-274.
 198. Palomer, X., Perez, A., Blanco-Vaca, F. **Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular.** *Med Clin (Barc)*, 2005. 124(10): p. 388-395.
 199. Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B.B. Kahn, and T. Kadowaki. **Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase.** *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1288-95.
 200. Pi-Sunyer, F.X. **Pathophysiology and Long-Term Management of the Metabolic Syndrome.** *Obesity Research* 2004. 12: p. 174S-180S.
 201. Yang, W.S., W.J. Lee, T. Funahashi, S. Tanaka, Y. Matsuzawa, C.L. Chao, C.L. Chen, T.Y. Tai, and L.M. Chuang. **Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(8): p. 3815-9.
 202. Rask-Madsen, C. and G.L. King. **Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes.** *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. 3(1): p. 46-56.
 203. Kawanami, D., K. Maemura, N. Takeda, T. Harada, T. Nojiri, Y. Imai, I. Manabe, K. Utsunomiya, and R. Nagai. **Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 314(2): p. 415-9.
 204. Steppan, C.M., S.T. Bailey, S. Bhat, E.J. Brown, R.R. Banerjee, C.M. Wright, H.R. Patel, R.S. Ahima, and M.A. Lazar. **The hormone resistin links obesity to diabetes.** *Nature*, 2001. 409(6818): p. 307-12.
 205. Stejskal, D., S. Adamovska, J. Bartek, R. Jurakova, and J. Proskova. **Resistin - concentrations in persons with type 2 diabetes mellitus and in individuals with acute inflammatory disease.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2003. 147(1): p. 63-9.
 206. Simon, S., del Barrio, A.S. **Leptina y obesidad.** *Anales Sis san Navarra*, 2002. 25 (suppl 1): p. 53-64.
 207. Licinio, J., C. Mantzoros, A.B. Negrao, G. Cizza, M.L. Wong, P.B. Bongiorno, G.P. Chrousos, B. Karp, C. Allen, J.S. Flier, and P.W. Gold. **Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function.** *Nat Med*, 1997. 3(5): p. 575-9.
 208. Sanchez-Muñoz, F., Garcia-Macedo, R., Alarcon-Aguilar, F. Cruz, M. **Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune.** *Gac Méd Méx* 2005. 141(6): p. 505-512.
 209. Shimabukuro, M., K. Koyama, G. Chen, M.Y. Wang, F. Trieu, Y. Lee, C.B. Newgard, and R.H. Unger. **Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(9): p. 4637-41.

210. Muoio, D.M., G.L. Dohm, F.T. Fiedorek, Jr., E.B. Tapscott, and R.A. Coleman. **Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle.** *Diabetes*, 1997. 46(8): p. 1360-3.
211. Guilherme, A., J.V. Virbasius, V. Puri, and M.P. Czech. **Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.** *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(5): p. 367-77.
212. Lowell, B.B. and G.I. Shulman. **Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes.** *Science*, 2005. 307(5708): p. 384-7.
213. Roden, M., T.B. Price, G. Perseghin, K.F. Petersen, D.L. Rothman, G.W. Cline, and G.I. Shulman. **Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans.** *J Clin Invest*, 1996. 97(12): p. 2859-65.
214. Roden, M., H. Stingl, V. Chandramouli, W.C. Schumann, A. Hofer, B.R. Landau, P. Nowotny, W. Waldhausl, and G.I. Shulman. **Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans.** *Diabetes*, 2000. 49(5): p. 701-7.
215. Griffin, M.E., M.J. Marcucci, G.W. Cline, K. Bell, N. Barucci, D. Lee, L.J. Goodyear, E.W. Kraegen, M.F. White, and G.I. Shulman. **Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade.** *Diabetes*, 1999. 48(6): p. 1270-4.
216. Santomauro, A.T., G. Boden, M.E. Silva, D.M. Rocha, R.F. Santos, M.J. Ursich, P.G. Strassmann, and B.L. Wajchenberg. **Overnight lowering of free fatty acids with Acipimox improves insulin resistance and glucose tolerance in obese diabetic and nondiabetic subjects.** *Diabetes*, 1999. 48(9): p. 1836-41.
217. Bahia, L., L.G. Aguiar, N. Villela, D. Bottino, A.F. Godoy-Matos, B. Geloneze, M. Tambascia, and E. Bouskela. **Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome.** *Clinics (Sao Paulo)*, 2006. 61(5): p. 433-40.
218. Nishida, M., T. Moriyama, K. Ishii, S. Takashima, K. Yoshizaki, Y. Sugita, and K. Yamauchi-Takahara. **Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis.** *Clin Chim Acta*, 2007. 384(1-2): p. 99-104.
219. Choi, K.M., O.H. Ryu, K.W. Lee, H.Y. Kim, J.A. Seo, S.G. Kim, N.H. Kim, D.S. Choi, and S.H. Baik. **Serum adiponectin, interleukin-10 levels and inflammatory markers in the metabolic syndrome.** *Diabetes Res Clin Pract*, 2007. 75(2): p. 235-40.
220. Pi-Sunyer, F.X. **The relation of adipose tissue to cardiometabolic risk.** *Clin Cornerstone*, 2006. 8 Suppl 4: p. S14-23.
221. Garcia-Moll, X., Kaski, J.C. **Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular.** *Rev. Esp. Cardiol*, 1999. 52: p. 990-1003.
222. Hotamisligil, G.S., P. Arner, J.F. Caro, R.L. Atkinson, and B.M. Spiegelman. **Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance.** *J Clin Invest*, 1995. 95(5): p. 2409-15.
223. Gable, D.R., S.J. Hurel, and S.E. Humphries. **Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Atherosclerosis*, 2006. 188(2): p. 231-44.
224. Salas-Salvado, J., M. Granada, M. Bullo, A. Corominas, P. Casas, and M. Foz. **Plasma adiponectin distribution in a Mediterranean population and its association with cardiovascular risk factors and metabolic syndrome.** *Metabolism*, 2007. 56(11): p. 1486-92.

225. Xydakis, A.M., C.C. Case, P.H. Jones, R.C. Hoogeveen, M.Y. Liu, E.O. Smith, K.W. Nelson, and C.M. Ballantyne. **Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact of rapid weight loss through caloric restriction.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(6): p. 2697-703.
226. Nawrocki, A.R. and P.E. Scherer. **The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation.** *Curr Opin Pharmacol*, 2004. 4(3): p. 281-9.
227. Greenberg, A.S. and M.S. Obin. **Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism.** *Am J Clin Nutr*, 2006. 83(2): p. 461S-465S.
228. Roberts, C.K., D. Won, S. Pruthi, S. Kurtovic, R.K. Sindhu, N.D. Vaziri, and R.J. Barnard. **Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors.** *J Appl Physiol*, 2006. 100(5): p. 1657-65.
229. Goodpaster, B.H., S. Krishnaswami, T.B. Harris, A. Katsiaras, S.B. Kritchevsky, E.M. Simonsick, M. Nevitt, P. Holvoet, and A.B. Newman. **Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women.** *Arch Intern Med*, 2005. 165(7): p. 777-83.
230. Piche, M.E., S.J. Weisnagel, L. Corneau, A. Nadeau, J. Bergeron, and S. Lemieux. **Contribution of abdominal visceral obesity and insulin resistance to the cardiovascular risk profile of postmenopausal women.** *Diabetes*, 2005. 54(3): p. 770-7.
231. Barness, L.A., J.M. Opitz, and E. Gilbert-Barness. **Obesity: genetic, molecular, and environmental aspects.** *Am J Med Genet A*, 2007. 143A(24): p. 3016-34.
232. Zimmet, P. **Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the Domsday scenario be averted?** *J Intern Med*, 2000. 247(3): p. 301-10.
233. Hossain, P., B. Kavar, and M. El Nahas. **Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge.** *N Engl J Med*, 2007. 356(3): p. 213-5.
234. Aranceta-Bartrina, J., Serra-Majem, L., Foz-Sala, M. **Prevalencia de Obesidad en España.** *Med Clin*, 2005. 125(12): p. 460-466.
235. Alegría, E., Cordero, A., Laclaustra, M. **Prevalencia del síndrome metabólico en población laboral española: registro MESYAS.** *Rev Esp Cardiol*, 2005. 58(7): p. 797-806.
236. Haslam, D.W. and W.P. James. **Obesity.** *Lancet*, 2005. 366(9492): p. 1197-209.
237. Matsuzawa, Y. **The metabolic syndrome and adipocytokines.** *FEBS Lett*, 2006. 580(12): p. 2917-21.
238. Barbarroja, N., R. Lopez-Pedreira, M.D. Mayas, E. Garcia-Fuentes, L. Garrido-Sanchez, M. Macias-Gonzalez, R. El Bekay, A. Vidal-Puig, and F.J. Tinahones. **The obese healthy paradox: is inflammation the answer?** *Biochem J*. 430(1): p. 141-9.
239. Beck, E., N. Esser, N. Paquot, and A.J. Scheen. **[Metabolically obese normal-weight individuals and metabolically healthy, but obese, subjects].** *Rev Med Suisse*, 2009. 5(214): p. 1644-6, 1648-9.
240. Beck, E. and A.J. Scheen. **[Metabolically obese with normal weight individuals: an intriguing phenotype].** *Rev Med Liege*, 2009. 64(1): p. 16-24.
241. Virtue, S. and A. Vidal-Puig. **Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective.** *Biochim Biophys Acta*. 1801(3): p. 338-49.

242. Perreault, M. and A. Marette. **Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle.** *Nat Med*, 2001. 7(10): p. 1138-43.
243. Hotamisligil, G.S., N.S. Shargill, and B.M. Spiegelman. **Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance.** *Science*, 1993. 259(5091): p. 87-91.
244. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg. **Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid.** *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(3): p. 847-50.
245. Samad, F., K. Yamamoto, M. Pandey, and D.J. Loskutoff. **Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice.** *Mol Med*, 1997. 3(1): p. 37-48.
246. Weyer, C., J.S. Yudkin, C.D. Stehouwer, C.G. Schalkwijk, R.E. Pratley, and P.A. Tataranni. **Humoral markers of inflammation and endothelial dysfunction in relation to adiposity and in vivo insulin action in Pima Indians.** *Atherosclerosis*, 2002. 161(1): p. 233-42.
247. Sartipy, P. and D.J. Loskutoff. **Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(12): p. 7265-70.
248. De Pergola, G. and N. Pannaciuoli. **Coagulation and fibrinolysis abnormalities in obesity.** *J Endocrinol Invest*, 2002. 25(10): p. 899-904.
249. Samad, F., K. Yamamoto, and D.J. Loskutoff. **Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide.** *J Clin Invest*, 1996. 97(1): p. 37-46.
250. Samad, F., M. Pandey, and D.J. Loskutoff. **Tissue factor gene expression in the adipose tissues of obese mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(13): p. 7591-6.
251. Sheu, W.H., T.M. Chang, W.J. Lee, H.C. Ou, C.M. Wu, L.N. Tseng, H.F. Lang, C.S. Wu, C.J. Wan, and I.T. Lee. **Effect of weight loss on proinflammatory state of mononuclear cells in obese women.** *Obesity (Silver Spring)*, 2008. 16(5): p. 1033-8.
252. Ceska, R. **Clinical implications of the metabolic syndrome.** *Diab Vasc Dis Res*, 2007. 4 Suppl 3: p. S2-4.
253. Dullaart, R.P., W.J. Sluiter, L.D. Dikkeschei, K. Hoogenberg, and A. Van Tol. **Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism.** *Eur J Clin Invest*, 1994. 24(3): p. 188-94.
254. Boden, G. **Obesity and free fatty acids.** *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008. 37(3): p. 635-46, viii-ix.
255. Turner, R.C., H. Millns, H.A. Neil, I.M. Stratton, S.E. Manley, D.R. Matthews, and R.R. Holman. **Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS: 23).** *Bmj*, 1998. 316(7134): p. 823-8.
256. Lamarche, B., A. Tchernof, S. Moorjani, B. Cantin, G.R. Dagenais, P.J. Lupien, and J.P. Despres. **Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study.** *Circulation*, 1997. 95(1): p. 69-75.
257. Austin, M.A. and K.L. Edwards. **Small, dense low density lipoproteins, the insulin resistance syndrome and noninsulin-dependent diabetes.** *Curr Opin Lipidol*, 1996. 7(3): p. 167-71.

258. Cardona, F., Tinahones, F.J. **Relation Of Postprandial Hypertriglyceridemia with Insulin Resistance in Patients with the Metabolic Syndrome. Postprandial hypertriglyceridemia & metabolic syndrome.** *Endocrinología y Nutrición*, 2006. 53(5): p. 345-352.
259. Soumian, S., C. Albrecht, A.H. Davies, and R.G. Gibbs. **ABCA1 and atherosclerosis.** *Vasc Med*, 2005. 10(2): p. 109-19.
260. Ruan, X.Z., Z. Varghese, S.H. Powis, and J.F. Moorhead. **Dysregulation of LDL receptor under the influence of inflammatory cytokines: a new pathway for foam cell formation.** *Kidney Int*, 2001. 60(5): p. 1716-25.
261. Watson, T., P.K. Goon, and G.Y. Lip. **Endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in hypertension.** *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10(6): p. 1079-88.
262. Abdilla, N., M.C. Tormo, M.J. Fabia, F.J. Chaves, G. Saez, and J. Redon. **Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension.** *J Hum Hypertens*, 2007. 21(1): p. 68-75.
263. Ferrannini, E. **Is insulin resistance the cause of the metabolic syndrome?** *Ann Med*, 2006. 38(1): p. 42-51.
264. Verma, S., C.H. Wang, S.H. Li, A.S. Dumont, P.W. Fedak, M.V. Badiwala, B. Dhillon, R.D. Weisel, R.K. Li, D.A. Mickle, and D.J. Stewart. **A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis.** *Circulation*, 2002. 106(8): p. 913-9.
265. Venugopal, S.K., S. Devaraj, I. Yuhanna, P. Shaul, and I. Jialal. **Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells.** *Circulation*, 2002. 106(12): p. 1439-41.
266. Verma, S., S.H. Li, M.V. Badiwala, R.D. Weisel, P.W. Fedak, R.K. Li, B. Dhillon, and D.A. Mickle. **Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein.** *Circulation*, 2002. 105(16): p. 1890-6.
267. Devaraj, S., D.Y. Xu, and I. Jialal. **C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis.** *Circulation*, 2003. 107(3): p. 398-404.
268. Cardillo, C. and J.A. Panza. **Impaired endothelial regulation of vascular tone in patients with systemic arterial hypertension.** *Vasc Med*, 1998. 3(2): p. 138-44.
269. Panza, J.A., A.A. Quyyumi, J.E. Brush, Jr., and S.E. Epstein. **Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension.** *N Engl J Med*, 1990. 323(1): p. 22-7.
270. Bermudez, E.A., N. Rifai, J. Buring, J.E. Manson, and P.M. Ridker. **Interrelationships among circulating interleukin-6, C-reactive protein, and traditional cardiovascular risk factors in women.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(10): p. 1668-73.
271. Chae, C.U., R.T. Lee, N. Rifai, and P.M. Ridker. **Blood pressure and inflammation in apparently healthy men.** *Hypertension*, 2001. 38(3): p. 399-403.
272. Sung, K.C., J.Y. Suh, B.S. Kim, J.H. Kang, H. Kim, M.H. Lee, J.R. Park, and S.W. Kim. **High sensitivity C-reactive protein as an independent risk factor for essential hypertension.** *Am J Hypertens*, 2003. 16(6): p. 429-33.

273. Dalekos, G.N., M. Elisaf, E. Bairaktari, O. Tsolas, and K.C. Siamopoulos. **Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients?** *J Lab Clin Med*, 1997. 129(3): p. 300-8.
274. Skoog, T., W. Dichtl, S. Boquist, C. Skoglund-Andersson, F. Karpe, R. Tang, M.G. Bond, U. de Faire, J. Nilsson, P. Eriksson, and A. Hamsten. **Plasma tumour necrosis factor-alpha and early carotid atherosclerosis in healthy middle-aged men.** *Eur Heart J*, 2002. 23(5): p. 376-83.
275. Wang, L., J.E. Manson, J.M. Gaziano, S. Liu, B. Cochrane, N.R. Cook, P.M. Ridker, N. Rifai, and H.D. Sesso. **Circulating inflammatory and endothelial markers and risk of hypertension in white and black postmenopausal women.** *Clin Chem*. 57(5): p. 729-36.
276. Steinberg, H.O., G. Paradisi, G. Hook, K. Crowder, J. Cronin, and A.D. Baron. **Free fatty acid elevation impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production.** *Diabetes*, 2000. 49(7): p. 1231-8.
277. Steinberg, H.O., M. Tarshoby, R. Monestel, G. Hook, J. Cronin, A. Johnson, B. Bayazeed, and A.D. Baron. **Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation.** *J Clin Invest*, 1997. 100(5): p. 1230-9.
278. Tham, D.M., B. Martin-McNulty, Y.X. Wang, D.W. Wilson, R. Vergona, M.E. Sullivan, W. Dole, and J.C. Rutledge. **Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs.** *Physiol Genomics*, 2002. 11(1): p. 21-30.
279. Verma, S. and T.J. Anderson. **Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist.** *Circulation*, 2002. 105(5): p. 546-9.
280. Esposito, K., A. Pontillo, C. Di Palo, G. Giugliano, M. Masella, R. Marfella, and D. Giugliano. **Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial.** *Jama*, 2003. 289(14): p. 1799-804.
281. Aronne, L.J. **Classification of obesity and assessment of obesity-related health risks.** *Obes Res*, 2002. 10 Suppl 2: p. 105S-115S.
282. Ferrario, C.M. and W.B. Strawn. **Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease.** *Am J Cardiol*, 2006. 98(1): p. 121-8.
283. Russo, C., O. Olivieri, D. Girelli, G. Faccini, M.L. Zenari, S. Lombardi, and R. Corrocher. **Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension.** *J Hypertens*, 1998. 16(9): p. 1267-71.
284. Chaves, F.J., M.L. Mansego, S. Blesa, V. Gonzalez-Albert, J. Jimenez, M.C. Tormos, O. Espinosa, V. Giner, A. Iradi, G. Saez, and J. Redon. **Inadequate cytoplasmic antioxidant enzymes response contributes to the oxidative stress in human hypertension.** *Am J Hypertens*, 2007. 20(1): p. 62-9.
285. Sjostrom, L., K. Narbro, C.D. Sjostrom, K. Karason, B. Larsson, H. Wedel, T. Lystig, M. Sullivan, C. Bouchard, B. Carlsson, C. Bengtsson, S. Dahlgren, A. Gummesson, P. Jacobson, J. Karlsson, A.K. Lindroos, H. Lonroth, I. Naslund, T. Olbers, K. Stenlof, J. Torgerson, G. Agren, and L.M. Carlsson. **Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects.** *N Engl J Med*, 2007. 357(8): p. 741-52.
286. LaMonte, M.J., C.E. Barlow, R. Jurca, J.B. Kampert, T.S. Church, and S.N. Blair. **Cardiorespiratory fitness is inversely associated with the incidence of metabolic syndrome: a prospective study of men and women.** *Circulation*, 2005. 112(4): p. 505-12.

287. Kodama, S., K. Saito, S. Tanaka, M. Maki, Y. Yachi, M. Asumi, A. Sugawara, K. Totsuka, H. Shimano, Y. Ohashi, N. Yamada, and H. Sone. **Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: a meta-analysis.** *Jama*, 2009. 301(19): p. 2024-35.
288. Pittas, A.G., N.A. Joseph, and A.S. Greenberg. **Adipocytokines and insulin resistance.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(2): p. 447-52.
289. Han, T.S., K. Williams, N. Sattar, K.J. Hunt, M.E. Lean, and S.M. Haffner. **Analysis of obesity and hyperinsulinemia in the development of metabolic syndrome: San Antonio Heart Study.** *Obes Res*, 2002. 10(9): p. 923-31.
290. Yuan, G., L. Zhou, J. Tang, Y. Yang, W. Gu, F. Li, J. Hong, Y. Gu, X. Li, G. Ning, and M. Chen. **Serum CRP levels are equally elevated in newly diagnosed type 2 diabetes and impaired glucose tolerance and related to adiponectin levels and insulin sensitivity.** *Diabetes Res Clin Pract*, 2006. 72(3): p. 244-50.
291. Ouchi, N., S. Kihara, Y. Arita, Y. Okamoto, K. Maeda, H. Kuriyama, K. Hotta, M. Nishida, M. Takahashi, M. Muraguchi, Y. Ohmoto, T. Nakamura, S. Yamashita, T. Funahashi, and Y. Matsuzawa. **Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway.** *Circulation*, 2000. 102(11): p. 1296-301.
292. Duncan, B.B., M.I. Schmidt, J.S. Pankow, H. Bang, D. Couper, C.M. Ballantyne, R.C. Hoogeveen, and G. Heiss. **Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study.** *Diabetes*, 2004. 53(9): p. 2473-8.
293. Aljada, A., H. Ghanim, E. Assian, and P. Dandona. **Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells.** *Metabolism*, 2002. 51(4): p. 487-91.
294. Hotamisligil, G.S. **Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1999. 107(2): p. 119-25.
295. Hotamisligil, G.S. **The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance.** *J Intern Med*, 1999. 245(6): p. 621-5.
296. Long, S.D. and P.H. Pekala. **Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. Evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation to prostaglandin E2.** *J Biol Chem*, 1996. 271(2): p. 1138-44.
297. Porter, M.H., A. Cutchins, J.B. Fine, Y. Bai, and M. DiGirolamo. **Effects of TNF-alpha on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat-cell preparations.** *J Lab Clin Med*, 2002. 139(3): p. 140-6.
298. Sonnenberg, G.E., G.R. Krakower, and A.H. Kissebah. **A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome.** *Obes Res*, 2004. 12(2): p. 180-6.
299. Boden, G. and G.I. Shulman. **Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction.** *Eur J Clin Invest*, 2002. 32 Suppl 3: p. 14-23.
300. Manco, M., M. Calvani, and G. Mingrone. **Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion.** *Diabetes Obes Metab*, 2004. 6(6): p. 402-13.
301. Girard, J. **[Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action. mechanism of beta-cell lipotoxicity].** *Med Sci (Paris)*, 2005. 21 Spec No: p. 19-25.
302. Rodríguez-Rodríguez, E., Perea, J.M., López-Sobaler, A.M., Ortega, R.M. **Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipoquinas:**

- importancia de la dieta y el ejercicio físico.** *Nutr Hosp.* , 2009. 24(4): p. 415-421.
303. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil. **Inflammation, stress, and diabetes.** *J Clin Invest*, 2005. 115(5): p. 1111-9.
304. Ceriello, A. and E. Motz. **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): p. 816-23.
305. Houstis, N., E.D. Rosen, and E.S. Lander. **Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance.** *Nature*, 2006. 440(7086): p. 944-8.
306. Uno, K. and S.J. Nicholls. **Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis.** *Biomark Med.* 4(3): p. 361-73.
307. Roberts, C.K. and K.K. Sindhu. **Oxidative stress and metabolic syndrome.** *Life Sci*, 2009. 84(21-22): p. 705-12.
308. Lakshmi, S.V., G. Padmaja, P. Kuppusamy, and V.K. Kutala. **Oxidative stress in cardiovascular disease.** *Indian J Biochem Biophys*, 2009. 46(6): p. 421-40.
309. Kaneto, H., N. Katakami, M. Matsuhisa, and T.A. Matsuoka. **Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis.** *Mediators Inflamm.* 2010: p. 453892.
310. Huang, Y.S., L.X. Wang, L. Sun, Y. Wu, J.M. Lu, S.C. Zhao, F.M. Dai, B.S. Xu, and S.R. Wang. **Elevated peroxidative glutathione redox status in atherosclerotic patients with increased thickness of carotid intima media.** *Chin Med J (Engl)*, 2009. 122(23): p. 2827-32.
311. Ramirez-Prieto, M.T., F. Garcia-Rio, and J. Villamor. **[Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring].** *Med Clin (Barc)*, 2006. 127(10): p. 386-96.
312. Ralph, S.J., S. Rodriguez-Enriquez, J. Neuzil, E. Saavedra, and R. Moreno-Sanchez. **The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy.** *Mol Aspects Med.* 31(2): p. 145-70.
313. Isobe, C., T. Abe, and Y. Terayama. **Levels of reduced and oxidized coenzyme Q-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenerative process.** *Neurosci Lett.* 469(1): p. 159-63.
314. Ansari, M.A. and S.W. Scheff. **Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex.** *J Neuropathol Exp Neurol.* 69(2): p. 155-67.
315. Arutunian, A.V. and L.S. Kozina. **[Mechanisms of free radical oxidation and its role in aging].** *Adv Gerontol*, 2009. 22(1): p. 104-16.
316. Barbato, J.E., B.S. Zuckerbraun, M. Overhaus, K.G. Raman, and E. Tzeng. **Nitric oxide modulates vascular inflammation and intimal hyperplasia in insulin resistance and the metabolic syndrome.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(1): p. H228-36.
317. Sun, Y.X., S.J. Hu, X.H. Zhang, J. Sun, C.H. Zhu, and Z.J. Zhang. **[Plasma levels of vWF and NO in patients with metabolic syndrome and their relationship with metabolic disorders].** *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2006. 35(3): p. 315-8.

318. Perticone, F., R. Ceravolo, M. Candigliota, G. Ventura, S. Iacopino, F. Sinopoli, and P.L. Mattioli. **Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C.** *Diabetes*, 2001. 50(1): p. 159-65.
319. Fortuno, A., G. San Jose, M.U. Moreno, O. Beloqui, J. Diez, and G. Zalba. **Phagocytic NADPH oxidase overactivity underlies oxidative stress in metabolic syndrome.** *Diabetes*, 2006. 55(1): p. 209-15.
320. Mantena, S.K., M.S. Baliga, and S.K. Katiyar. **Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells.** *Carcinogenesis*, 2006. 27(8): p. 1682-91.
321. Kelly, A.S., J. Steinberger, D.R. Kaiser, T.P. Olson, A.J. Bank, and D.R. Dengel. **Oxidative stress and adverse adipokine profile characterize the metabolic syndrome in children.** *J Cardiometab Syndr*, 2006. 1(4): p. 248-52.
322. Lakka, H.M., D.E. Laaksonen, T.A. Lakka, L.K. Niskanen, E. Kumpusalo, J. Tuomilehto, and J.T. Salonen. **The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men.** *Jama*, 2002. 288(21): p. 2709-16.
323. Takeuchi, H., S. Saitoh, S. Takagi, H. Ohnishi, J. Ohhata, T. Isobe, and K. Shimamoto. **Metabolic syndrome and cardiac disease in Japanese men: applicability of the concept of metabolic syndrome defined by the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III to Japanese men--the Tanno and Sobetsu Study.** *Hypertens Res*, 2005. 28(3): p. 203-8.
324. Thomas, J.E. and J.M. Foody. **The pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes mellitus and the future of therapy.** *J Cardiometab Syndr*, 2007. 2(2): p. 108-13.
325. Ninomiya, J.K., G. L'Italien, M.H. Criqui, J.L. Whyte, A. Gamst, and R.S. Chen. **Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** *Circulation*, 2004. 109(1): p. 42-6.
326. Rutter, M.K., J.B. Meigs, L.M. Sullivan, R.B. D'Agostino, Sr., and P.W. Wilson. **C-reactive protein, the metabolic syndrome, and prediction of cardiovascular events in the Framingham Offspring Study.** *Circulation*, 2004. 110(4): p. 380-5.
327. Sattar, N., A. Gaw, O. Scherbakova, I. Ford, D.S. O'Reilly, S.M. Haffner, C. Isles, P.W. Macfarlane, C.J. Packard, S.M. Cobbe, and J. Shepherd. **Metabolic syndrome with and without C-reactive protein as a predictor of coronary heart disease and diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study.** *Circulation*, 2003. 108(4): p. 414-9.
328. De Backer, G., E. Ambrosioni, K. Borch-Johnsen, C. Brotons, R. Cifkova, J. Dallongeville, S. Ebrahim, O. Faergeman, I. Graham, G. Mancina, V.M. Cats, K. Orth-Gomer, J. Perk, K. Pyorala, J.L. Rodicio, S. Sans, V. Sansoy, U. Sechtem, S. Silber, T. Thomsen, and D. Wood. **European guidelines on cardiovascular disease and prevention in clinical practice.** *Atherosclerosis*, 2003. 171(1): p. 145-55.
329. De Backer, G., E. Ambrosioni, K. Borch-Johnsen, C. Brotons, R. Cifkova, J. Dallongeville, S. Ebrahim, O. Faergeman, I. Graham, G. Mancina, V.M. Cats, K. Orth-Gomer, J. Perk, K. Pyorala, J.L. Rodicio, S. Sans, V. Sansoy, U. Sechtem, S. Silber, T. Thomsen, and D. Wood. **European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: third joint task force of European and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice**

- (constituted by representatives of eight societies and by invited experts). *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2003. 10(4): p. S1-S10.
330. Esposito, K., A. Ceriello, and D. Giugliano. **Diet and the metabolic syndrome.** *Metab Syndr Relat Disord*, 2007. 5(4): p. 291-6.
 331. Schroder, H. **Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes.** *J Nutr Biochem*, 2007. 18(3): p. 149-60.
 332. Perez-Martinez, P., A. Garcia-Rios, J. Delgado-Lista, F. Perez-Jimenez, and J. Lopez-Miranda. **Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus.** *Curr Pharm Des*. 17(8): p. 769-77.
 333. Trichopoulou, A., T. Costacou, C. Bamia, and D. Trichopoulos. **Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population.** *N Engl J Med*, 2003. 348(26): p. 2599-608.
 334. Kafatos, A. and C.A. Codrington. **Nutrition and diet for healthy lifestyles in Europe: the 'Eurodiet' Project.** *Public Health Nutr*, 1999. 2(3A): p. 327-8.
 335. Marquez-Sandoval, F., Bulló, M., Vizmanos, B., Casas-Augustench, P., Salas-Salvado, J. . **Un patrón alimentario saludable: la dieta Mediterránea tradicional.** *Antropo*, 2008. 16: p. 11-22.
 336. Hu, F.B. **The Mediterranean diet and mortality--olive oil and beyond.** *N Engl J Med*, 2003. 348(26): p. 2595-6.
 337. Robertson, R.M. and L. Smaha. **Can a Mediterranean-style diet reduce heart disease?** *Circulation*, 2001. 103(13): p. 1821-2.
 338. **Executive summary of the Third Report of the National cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (Adult Treatment Panel III).** *JAMA*, 2001. 285(19): p. 2486-2497.
 339. Krauss, R.M., R.H. Eckel, B. Howard, L.J. Appel, S.R. Daniels, R.J. Deckelbaum, J.W. Erdman, Jr., P. Kris-Etherton, I.J. Goldberg, T.A. Kotchen, A.H. Lichtenstein, W.E. Mitch, R. Mullis, K. Robinson, J. Wylie-Rosett, S. St Jeor, J. Suttie, D.L. Tribble, and T.L. Bazzarre. **AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association.** *Circulation*, 2000. 102(18): p. 2284-99.
 340. Perez-Jimenez, F., J. Ruano, P. Perez-Martinez, F. Lopez-Segura, and J. Lopez-Miranda. **The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone.** *Mol Nutr Food Res*, 2007. 51(10): p. 1199-208.
 341. Kastorini, C.M., H.J. Milionis, K. Esposito, D. Giugliano, J.A. Goudevenos, and D.B. Panagiotakos. **The effect of Mediterranean diet on metabolic syndrome and its components: a meta-analysis of 50 studies and 534,906 individuals.** *J Am Coll Cardiol*. 57(11): p. 1299-313.
 342. Perez-Jimenez, F., A. Fernandez Duenas, J. Lopez-Miranda, and J.A. Jimenez-Perereperez. **[Olive oil: healthy food since caliphal time to the threshold of the new millennium].** *Med Clin (Barc)*, 2000. 114(6): p. 219-21.
 343. Perez-Martinez, P., López-Miranda, J., Delgado-Lista, J., López-Segura, F., Pérez-Jiménez, F. . **Aceite de oliva y prevención cardiovascular: más que una grasa.** *Clin Invest Arterioscl* 2006. 18(5): p. 195-205.
 344. Weldon, S.M., A.C. Mullen, C.E. Loscher, L.A. Hurley, and H.M. Roche. **Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid.** *J Nutr Biochem*, 2007. 18(4): p. 250-8.

345. Hennig, B., P. Meerarani, P. Ramadass, B.A. Watkins, and M. Toborek. **Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells.** *Metabolism*, 2000. 49(8): p. 1006-13.
346. Carluccio, M.A., M. Massaro, C. Bonfrate, L. Siculella, M. Maffia, G. Nicolardi, A. Distante, C. Storelli, and R. De Caterina. **Oleic acid inhibits endothelial activation : A direct vascular antiatherogenic mechanism of a nutritional component in the mediterranean diet.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. 19(2): p. 220-8.
347. Reaven, P., S. Parthasarathy, B.J. Grasse, E. Miller, F. Almazan, F.H. Mattson, J.C. Khoo, D. Steinberg, and J.L. Witztum. **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(4): p. 701-6.
348. Bellido, C., J. Lopez-Miranda, P. Perez-Martinez, E. Paz, C. Marin, P. Gomez, J.A. Moreno, R. Moreno, and F. Perez-Jimenez. **The Mediterranean and CHO diets decrease VCAM-1 and E-selectin expression induced by modified low-density lipoprotein in HUVECs.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006. 16(8): p. 524-30.
349. Simopoulos, A.P. **Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases.** *J Am Coll Nutr*, 2002. 21(6): p. 495-505.
350. Gil, A. **Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases.** *Biomed Pharmacother*, 2002. 56(8): p. 388-96.
351. Browning, L.M. and S.A. Jebb. **Nutritional influences on inflammation and type 2 diabetes risk.** *Diabetes Technol Ther*, 2006. 8(1): p. 45-54.
352. Kris-Etherton, P.M., J. Derr, D.C. Mitchell, V.A. Mustad, M.E. Russell, E.T. McDonnell, D. Salabsky, and T.A. Pearson. **The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: I. Effects of whole food diets high in cocoa butter, olive oil, soybean oil, dairy butter, and milk chocolate on the plasma lipids of young men.** *Metabolism*, 1993. 42(1): p. 121-9.
353. Jansen, S., J. Lopez-Miranda, P. Castro, F. Lopez-Segura, C. Marin, J.M. Ordovas, E. Paz, J. Jimenez-Pereperez, F. Fuentes, and F. Perez-Jimenez. **Low-fat and high-monounsaturated fatty acid diets decrease plasma cholesterol ester transfer protein concentrations in young, healthy, normolipemic men.** *Am J Clin Nutr*, 2000. 72(1): p. 36-41.
354. Fuentes, F., J. Lopez-Miranda, E. Sanchez, F. Sanchez, J. Paez, E. Paz-Rojas, C. Marin, P. Gomez, J. Jimenez-Pereperez, J.M. Ordovas, and F. Perez-Jimenez. **Mediterranean and low-fat diets improve endothelial function in hypercholesterolemic men.** *Ann Intern Med*, 2001. 134(12): p. 1115-9.
355. Mata, P., J.A. Garrido, J.M. Ordovas, E. Blazquez, L.A. Alvarez-Sala, M.J. Rubio, R. Alonso, and M. de Oya. **Effect of dietary monounsaturated fatty acids on plasma lipoproteins and apolipoproteins in women.** *Am J Clin Nutr*, 1992. 56(1): p. 77-83.
356. Mensink, R.P., P.L. Zock, A.D. Kester, and M.B. Katan. **Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials.** *Am J Clin Nutr*, 2003. 77(5): p. 1146-55.
357. Garg, A., A. Bonanome, S.M. Grundy, Z.J. Zhang, and R.H. Unger. **Comparison of a high-carbohydrate diet with a high-monounsaturated-fat diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *N Engl J Med*, 1988. 319(13): p. 829-34.

358. Roche, H.M. and M.J. Gibney. **Postprandial triacylglycerolaemia: the effect of low-fat dietary treatment with and without fish oil supplementation.** *Eur J Clin Nutr*, 1996. 50(9): p. 617-24.
359. Ferrara, L.A., A.S. Raimondi, L. d'Episcopo, L. Guida, A. Dello Russo, and T. Marotta. **Olive oil and reduced need for antihypertensive medications.** *Arch Intern Med*, 2000. 160(6): p. 837-42.
360. Ruano, J., J. Lopez-Miranda, F. Fuentes, J.A. Moreno, C. Bellido, P. Perez-Martinez, A. Lozano, P. Gomez, Y. Jimenez, and F. Perez Jimenez. **Phenolic content of virgin olive oil improves ischemic reactive hyperemia in hypercholesterolemic patients.** *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(10): p. 1864-8.
361. Ruiz-Gutierrez, V., F.J. Muriana, A. Guerrero, A.M. Cert, and J. Villar. **Plasma lipids, erythrocyte membrane lipids and blood pressure of hypertensive women after ingestion of dietary oleic acid from two different sources.** *J Hypertens*, 1996. 14(12): p. 1483-90.
362. Fito, M., M. Cladellas, R. de la Torre, J. Marti, M. Alcantara, M. Pujadas-Bastardes, J. Marrugat, J. Bruguera, M.C. Lopez-Sabater, J. Vila, and M.I. Covas. **Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial.** *Atherosclerosis*, 2005. 181(1): p. 149-58.
363. Paniagua, J.A., P. Perez-Martinez, I.M. Gjelstad, A.C. Tierney, J. Delgado-Lista, C. Defoort, E.E. Blaak, U. Riserus, C.A. Drevon, B. Kiec-Wilk, J.A. Lovegrove, H.M. Roche, and J. Lopez-Miranda. **A low-fat high-carbohydrate diet supplemented with long-chain n-3 PUFA reduces the risk of the metabolic syndrome.** *Atherosclerosis*.
364. Paniagua, J.A., A. Gallego de la Sacristana, I. Romero, A. Vidal-Puig, J.M. Latre, E. Sanchez, P. Perez-Martinez, J. Lopez-Miranda, and F. Perez-Jimenez. **Monounsaturated fat-rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects.** *Diabetes Care*, 2007. 30(7): p. 1717-23.
365. Piers, L.S., K.Z. Walker, R.M. Stoney, M.J. Soares, and K. O'Dea. **Substitution of saturated with monounsaturated fat in a 4-week diet affects body weight and composition of overweight and obese men.** *Br J Nutr*, 2003. 90(3): p. 717-27.
366. Summers, L.K., B.A. Fielding, H.A. Bradshaw, V. Ilic, C. Beysen, M.L. Clark, N.R. Moore, and K.N. Frayn. **Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity.** *Diabetologia*, 2002. 45(3): p. 369-77.
367. Fernandez de la Puebla, R.A., F. Fuentes, P. Perez-Martinez, E. Sanchez, J.A. Paniagua, J. Lopez-Miranda, and F. Perez-Jimenez. **A reduction in dietary saturated fat decreases body fat content in overweight, hypercholesterolemic males.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2003. 13(5): p. 273-7.
368. Salas-Salvado, J., J. Fernandez-Ballart, E. Ros, M.A. Martinez-Gonzalez, M. Fito, R. Estruch, D. Corella, M. Fiol, E. Gomez-Gracia, F. Aros, G. Flores, J. Lapetra, R. Lamuela-Raventos, V. Ruiz-Gutierrez, M. Bullo, J. Basora, and M.I. Covas. **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): p. 2449-58.
369. Kris-Etherton, P.M. **AHA science advisory: monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease.** *J Nutr*, 1999. 129(12): p. 2280-4.

370. Kris-Etherton, P.M., T.A. Pearson, Y. Wan, R.L. Hargrove, K. Moriarty, V. Fishell, and T.D. Etherton. **High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations.** *Am J Clin Nutr*, 1999. 70(6): p. 1009-15.
371. Garg, A. **High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis.** *Am J Clin Nutr*, 1998. 67(3 Suppl): p. 577S-582S.
372. Ros, E. **Dietary cis-monounsaturated fatty acids and metabolic control in type 2 diabetes.** *Am J Clin Nutr*, 2003. 78(3 Suppl): p. 617S-625S.
373. Franz, M.J., J.P. Bantle, C.A. Beebe, J.D. Brunzell, J.L. Chiasson, A. Garg, L.A. Holzmeister, B. Hoogwerf, E. Mayer-Davis, A.D. Mooradian, J.Q. Purnell, and M. Wheeler. **Evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications.** *Diabetes Care*, 2002. 25(1): p. 148-98.
374. Vessby, B., M. Uusitupa, K. Hermansen, G. Riccardi, A.A. Rivellese, L.C. Tapsell, C. Nalsen, L. Berglund, A. Louheranta, B.M. Rasmussen, G.D. Calvert, A. Maffetone, E. Pedersen, I.B. Gustafsson, and L.H. Storlien. **Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study.** *Diabetologia*, 2001. 44(3): p. 312-9.
375. Perez-Jimenez, F., J. Lopez-Miranda, M.D. Pinillos, P. Gomez, E. Paz-Rojas, P. Montilla, C. Marin, M.J. Velasco, A. Blanco-Molina, J.A. Jimenez Pereperez, and J.M. Ordovas. **A Mediterranean and a high-carbohydrate diet improve glucose metabolism in healthy young persons.** *Diabetologia*, 2001. 44(11): p. 2038-43.
376. Silva, K.D., C.N. Kelly, A.E. Jones, R.D. Smith, S.A. Wootton, G.J. Miller, and C.M. Williams. **Chylomicron particle size and number, factor VII activation and dietary monounsaturated fatty acids.** *Atherosclerosis*, 2003. 166(1): p. 73-84.
377. Cohn, J.S. **Postprandial lipemia and remnant lipoproteins.** *Clin Lab Med*, 2006. 26(4): p. 773-86.
378. Vigna, G.B., P. Donega, A. Passaro, R. Zanca, L. Cattin, M. Fonda, P. Pauciullo, G. Marotta, R. Fellin, S. Gasparrini, and T. Piliago. **Post-prandial effects of gemfibrozil vs simvastatin in hypercholesterolemic subjects with borderline hypertriglyceridemia.** *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 1999. 9(5): p. 234-43.
379. Castro Cabezas, M. **Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia.** *Biochem Soc Trans*, 2003. 31(Pt 5): p. 1090-3.
380. Lopez-Miranda, J., P. Perez-Martinez, C. Marin, J.A. Moreno, P. Gomez, and F. Perez-Jimenez. **Postprandial lipoprotein metabolism, genes and risk of cardiovascular disease.** *Curr Opin Lipidol*, 2006. 17(2): p. 132-8.
381. Zilversmit, D.B. **Atherogenesis: a postprandial phenomenon.** *Circulation*, 1979. 60(3): p. 473-85.
382. Cardona, F., S. Morcillo, M. Gonzalo-Marin, and F.J. Tinahones. **The apolipoprotein E genotype predicts postprandial hypertriglyceridemia in patients with the metabolic syndrome.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(5): p. 2972-5.
383. Mora, S., N. Rifai, J.E. Buring, and P.M. Ridker. **Fasting compared with nonfasting lipids and apolipoproteins for predicting incident cardiovascular events.** *Circulation*, 2008. 118(10): p. 993-1001.

384. Bansal, S., J.E. Buring, N. Rifai, S. Mora, F.M. Sacks, and P.M. Ridker. **Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women.** *Jama*, 2007. 298(3): p. 309-16.
385. Freiberg, J.J., A. Tybjaerg-Hansen, J.S. Jensen, and B.G. Nordestgaard. **Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population.** *Jama*, 2008. 300(18): p. 2142-52.
386. Langsted, A., J.J. Freiberg, and B.G. Nordestgaard. **Fasting and nonfasting lipid levels: influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction.** *Circulation*, 2008. 118(20): p. 2047-56.
387. Benn, M., B.G. Nordestgaard, G.B. Jensen, and A. Tybjaerg-Hansen. **Improving prediction of ischemic cardiovascular disease in the general population using apolipoprotein B: the Copenhagen City Heart Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(3): p. 661-70.
388. Nordestgaard, B.G., M. Benn, P. Schnohr, and A. Tybjaerg-Hansen. **Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women.** *Jama*, 2007. 298(3): p. 299-308.
389. Talmud, P.J., E. Hawe, G.J. Miller, and S.E. Humphries. **Nonfasting apolipoprotein B and triglyceride levels as a useful predictor of coronary heart disease risk in middle-aged UK men.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(11): p. 1918-23.
390. Waterworth, D.M., P.J. Talmud, S.R. Bujac, R.M. Fisher, G.J. Miller, and S.E. Humphries. **Contribution of apolipoprotein C-III gene variants to determination of triglyceride levels and interaction with smoking in middle-aged men.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(12): p. 2663-9.
391. Hokanson, J.E. and M.A. Austin. **Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies.** *J Cardiovasc Risk*, 1996. 3(2): p. 213-9.
392. Sarwar, N., J. Danesh, G. Eiriksdottir, G. Sigurdsson, N. Wareham, S. Bingham, S.M. Boekholdt, K.T. Khaw, and V. Gudnason. **Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies.** *Circulation*, 2007. 115(4): p. 450-8.
393. Di Angelantonio, E., N. Sarwar, P. Perry, S. Kaptoge, K.K. Ray, A. Thompson, A.M. Wood, S. Lewington, N. Sattar, C.J. Packard, R. Collins, S.G. Thompson, and J. Danesh. **Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease.** *Jama*, 2009. 302(18): p. 1993-2000.
394. Tushuizen, M.E., M. Diamant, and R.J. Heine. **Postprandial dysmetabolism and cardiovascular disease in type 2 diabetes.** *Postgrad Med J*, 2005. 81(951): p. 1-6.
395. Paniagua, J.A., A.G. de la Sacristana, E. Sanchez, I. Romero, A. Vidal-Puig, F.J. Berral, A. Escribano, M.J. Moyano, P. Perez-Martinez, J. Lopez-Miranda, and F. Perez-Jimenez. **A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects.** *J Am Coll Nutr*, 2007. 26(5): p. 434-44.
396. Kugiyama, K., H. Doi, T. Motoyama, H. Soejima, K. Misumi, H. Kawano, O. Nakagawa, M. Yoshimura, H. Ogawa, T. Matsumura, S. Sugiyama, T. Nakano, K. Nakajima, and H. Yasue. **Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries.** *Circulation*, 1998. 97(25): p. 2519-26.

397. van Oostrom, A.J., J. van Wijk, and M.C. Cabezas. **Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis.** *Drugs*, 2004. 64 Suppl 2: p. 19-41.
398. Miller, G.J., C.J. Cooke, M.N. Nanjee, D.J. Howarth, J.A. Cooper, I.P. Stepanova, J.H. Morrissey, and N.E. Miller. **Factor VII activation, apolipoprotein A-I and reverse cholesterol transport: possible relevance for postprandial lipaemia.** *Thromb Haemost*, 2002. 87(3): p. 477-82.
399. Graner, M., J. Kahri, T. Nakano, S.J. Sarna, M.S. Nieminen, M. Syvanne, and M.R. Taskinen. **Impact of postprandial lipaemia on low-density lipoprotein (LDL) size and oxidized LDL in patients with coronary artery disease.** *Eur J Clin Invest*, 2006. 36(11): p. 764-70.
400. Vogel, R.A., M.C. Corretti, and G.D. Plotnick. **The postprandial effect of components of the Mediterranean diet on endothelial function.** *J Am Coll Cardiol*, 2000. 36(5): p. 1455-60.
401. Perez-Martinez, P., J.M. Garcia-Quintana, E.M. Yubero-Serrano, I. Tasset-Cuevas, I. Tunez, A. Garcia-Rios, J. Delgado-Lista, C. Marin, F. Perez-Jimenez, H.M. Roche, and J. Lopez-Miranda. **Postprandial oxidative stress is modified by dietary fat: evidence from a human intervention study.** *Clin Sci (Lond)*. 119(6): p. 251-61.
402. Vogel, R.A., M.C. Corretti, and G.D. Plotnick. **Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects.** *Am J Cardiol*, 1997. 79(3): p. 350-4.
403. Perez-Martinez, P., M. Moreno-Conde, C. Cruz-Teno, J. Ruano, F. Fuentes, J. Delgado-Lista, A. Garcia-Rios, C. Marin, M.J. Gomez-Luna, F. Perez-Jimenez, H.M. Roche, and J. Lopez-Miranda. **Dietary fat differentially influences regulatory endothelial function during the postprandial state in patients with metabolic syndrome: from the LIPGENE study.** *Atherosclerosis*. 209(2): p. 533-8.
404. Roche, H.M., A. Zampelas, J.M. Knapper, D. Webb, C. Brooks, K.G. Jackson, J.W. Wright, B.J. Gould, A. Kafatos, M.J. Gibney, and C.M. Williams. **Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism.** *Am J Clin Nutr*, 1998. 68(3): p. 552-60.
405. Ruano, J., J. Lopez-Miranda, R. de la Torre, J. Delgado-Lista, J. Fernandez, J. Caballero, M.I. Covas, Y. Jimenez, P. Perez-Martinez, C. Marin, F. Fuentes, and F. Perez-Jimenez. **Intake of phenol-rich virgin olive oil improves the postprandial prothrombotic profile in hypercholesterolemic patients.** *Am J Clin Nutr*, 2007. 86(2): p. 341-6.
406. Esposito, K., F. Nappo, R. Marfella, G. Giugliano, F. Giugliano, M. Ciotola, L. Quagliaro, A. Ceriello, and D. Giugliano. **Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress.** *Circulation*, 2002. 106(16): p. 2067-72.
407. Bellido, C., J. Lopez-Miranda, L.M. Blanco-Colio, P. Perez-Martinez, F.J. Muriana, J.L. Martin-Ventura, C. Marin, P. Gomez, F. Fuentes, J. Egido, and F. Perez-Jimenez. **Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men.** *Am J Clin Nutr*, 2004. 80(6): p. 1487-91.
408. Brown, A.A. and F.B. Hu. **Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease.** *Am J Clin Nutr*, 2001. 73(4): p. 673-86.

409. De Caterina, R., J.K. Liao, and P. Libby. **Fatty acid modulation of endothelial activation.** *Am J Clin Nutr*, 2000. 71(1 Suppl): p. 213S-23S.
410. Jagla, A. and J. Schrezenmeir. **Postprandial triglycerides and endothelial function.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2001. 109(4): p. S533-47.
411. Moreno, J.J. and M.T. Mitjavila. **The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (review).** *J Nutr Biochem*, 2003. 14(4): p. 182-95.
412. Agren, J.J., O. Hanninen, A. Julkunen, L. Fogelholm, H. Vidgren, U. Schwab, O. Pynnonen, and M. Uusitupa. **Fish diet, fish oil and docosahexaenoic acid rich oil lower fasting and postprandial plasma lipid levels.** *Eur J Clin Nutr*, 1996. 50(11): p. 765-71.
413. Williams, C.M. **Postprandial lipid metabolism: effects of dietary fatty acids.** *Proc Nutr Soc*, 1997. 56(2): p. 679-92.
414. Jimenez-Gomez, Y., C. Marin, P. Peerez-Martinez, J. Hartwich, M. Malczewska-Malec, I. Golabek, B. Kiec-Wilk, C. Cruz-Teno, F. Rodriguez, P. Gomez, M.J. Gomez-Luna, C. Defoort, M.J. Gibney, F. Perez-Jimenez, H.M. Roche, and J. Lopez-Miranda. **A low-fat, high-complex carbohydrate diet supplemented with long-chain (n-3) fatty acids alters the postprandial lipoprotein profile in patients with metabolic syndrome.** *J Nutr*. 140(9): p. 1595-601.
415. Shaw, D.I., A.C. Tierney, S. McCarthy, J. Upritchard, S. Vermunt, H.L. Gulseth, C.A. Drevon, E.E. Blaak, W.H. Saris, B. Karlstrom, O. Helal, C. Defoort, R. Gallego, J. Lopez-Miranda, D. Siedlecka, M. Malczewska-Malec, H.M. Roche, and J.A. Lovegrove. **LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries.** *Br J Nutr*, 2009. 101(5): p. 750-9.
416. Riepponen, P., J. Marniemi, and T. Rautaoja. **Immunoturbidimetric determination of apolipoproteins A-1 and B in serum.** *Scand J Clin Lab Invest*, 1987. 47(7): p. 739-44.
417. Friedewald, W.T., R.I. Levy, and D.S. Fredrickson. **Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge.** *Clin Chem*, 1972. 18(6): p. 499-502.
418. Hernandez-Presa, M., C. Bustos, M. Ortego, J. Tunon, G. Renedo, M. Ruiz-Ortega, and J. Egido. **Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis.** *Circulation*, 1997. 95(6): p. 1532-41.
419. Festa, A., R. D'Agostino, Jr., G. Howard, L. Mykkanen, R.P. Tracy, and S.M. Haffner. **Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS).** *Circulation*, 2000. 102(1): p. 42-7.
420. Temelkova-Kurktschiev, T., G. Siegert, S. Bergmann, E. Henkel, C. Koehler, W. Jaross, and M. Hanefeld. **Subclinical inflammation is strongly related to insulin resistance but not to impaired insulin secretion in a high risk population for diabetes.** *Metabolism*, 2002. 51(6): p. 743-9.
421. Jonasson, L., J. Holm, O. Skalli, G. Bondjers, and G.K. Hansson. **Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.** *Arteriosclerosis*, 1986. 6(2): p. 131-8.
422. van der Wal, A.C., P.K. Das, D. Bentz van de Berg, C.M. van der Loos, and A.E. Becker. **Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic**

- analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest*, 1989. 61(2): p. 166-70.
423. Ridker, P.M. **Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention.** *Circulation*, 2003. 107(3): p. 363-9.
424. Katan, M.B., P.L. Zock, and R.P. Mensink. **Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease.** *Am J Clin Nutr*, 1995. 61(6 Suppl): p. 1368S-1373S.
425. Mata, P., O. Varela, R. Alonso, C. Lahoz, M. de Oya, and L. Badimon. **Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(10): p. 2088-95.
426. Connor, W.E. and S.L. Connor. **Diet, atherosclerosis, and fish oil.** *Adv Intern Med*, 1990. 35: p. 139-71.
427. Simopoulos, A.P. **Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development.** *Am J Clin Nutr*, 1991. 54(3): p. 438-63.
428. Zhu, Y., H.L. Liao, J.H. Lin, L. Verna, and M.B. Stemerman. **Low-density lipoprotein augments interleukin-1-induced vascular adhesion molecule expression in human endothelial cells.** *Atherosclerosis*, 1999. 144(2): p. 357-65.
429. Rahman, A., J. Kefer, M. Bando, W.D. Niles, and A.B. Malik. **E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation.** *Am J Physiol*, 1998. 275(3 Pt 1): p. L533-44.
430. Barnes, P.J. and M. Karin. **Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.** *N Engl J Med*, 1997. 336(15): p. 1066-71.
431. Shin, W.S., A. Szuba, and S.G. Rockson. **The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights.** *Atherosclerosis*, 2002. 160(1): p. 91-102.
432. Williams, D.E., A.T. Prevost, M.J. Whichelow, B.D. Cox, N.E. Day, and N.J. Wareham. **A cross-sectional study of dietary patterns with glucose intolerance and other features of the metabolic syndrome.** *Br J Nutr*, 2000. 83(3): p. 257-66.
433. Camargo, A., Delgado-Lista, J., García-Ríos, A., Cruz-Teno, C., et al. **Gene expression of proinflammatory, proatherogenic genes is reduced by mediterranean diet in elderly people.** *British Journal of Nutrition*, 2011.
434. Yubero-Serrano, E.M., Gonzalez-Guardia, L., Rangel-Zuñiga, O., et al. **Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q10 modified the expression of proinflammatory and endoplasmic reticulum stress-related genes in elderly men and women.** *Journal of Gerontology*, 2011.
435. Jimenez-Gomez, Y., J. Lopez-Miranda, L.M. Blanco-Colio, C. Marin, P. Perez-Martinez, J. Ruano, J.A. Paniagua, F. Rodriguez, J. Egido, and F. Perez-Jimenez. **Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men.** *Atherosclerosis*, 2009. 204(2): p. e70-6.
436. Lin, L., J.D. Hron, and S.L. Peng. **Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a.** *Immunity*, 2004. 21(2): p. 203-13.

437. Lin, L., S.L. Brody, and S.L. Peng. **Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF-kappa B and IL-6.** *J Immunol*, 2005. 175(2): p. 951-8.
438. Zhou, W., Q. Cao, Y. Peng, Q.J. Zhang, D.H. Castrillon, R.A. DePinho, and Z.P. Liu. **FoxO4 inhibits NF-kappaB and protects mice against colonic injury and inflammation.** *Gastroenterology*, 2009. 137(4): p. 1403-14.
439. Ito, C.Y., A.G. Kazantsev, and A.S. Baldwin, Jr. **Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha.** *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(18): p. 3787-92.
440. Sun, Z. and R. Andersson. **NF-kappaB activation and inhibition: a review.** *Shock*, 2002. 18(2): p. 99-106.
441. Zabel, U. and P.A. Baeuerle. **Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA.** *Cell*, 1990. 61(2): p. 255-65.
442. Futterman, L.G. and L. Lemberg. **High-sensitivity C-reactive protein is the most effective prognostic measurement of acute coronary events.** *Am J Crit Care*, 2002. 11(5): p. 482-6.
443. Meneses, M.E., Camargo, A., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Cruz-Teno, C. **Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after the intake of different dietary models.** *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011. 55: p. 1-12.
444. Stow, J.L., P.C. Low, C. Offenhauser, and D. Sangermani. **Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators.** *Immunobiology*, 2009. 214(7): p. 601-12.
445. Kong, Y.Z., X. Yu, J.J. Tang, X. Ouyang, X.R. Huang, G. Fingerle-Rowson, M. Bacher, L.A. Scher, R. Bucala, and H.Y. Lan. **Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques.** *Atherosclerosis*, 2005. 178(1): p. 207-15.
446. Speidl, W.S., S.P. Kastl, R. Hutter, K.M. Katsaros, C. Kaun, G. Bauriedel, G. Maurer, K. Huber, J.J. Badimon, and J. Wojta. **The complement component C5a is present in human coronary lesions in vivo and induces the expression of MMP-1 and MMP-9 in human macrophages in vitro.** *Faseb J.* 25(1): p. 35-44.
447. Mena, M.P., E. Sacanella, M. Vazquez-Agell, M. Morales, M. Fito, R. Escoda, M. Serrano-Martinez, J. Salas-Salvado, N. Benages, R. Casas, R.M. Lamuela-Raventos, F. Masanes, E. Ros, and R. Estruch. **Inhibition of circulating immune cell activation: a molecular antiinflammatory effect of the Mediterranean diet.** *Am J Clin Nutr*, 2009. 89(1): p. 248-56.
448. Gosling, J., S. Slaymaker, L. Gu, S. Tseng, C.H. Zlot, S.G. Young, B.J. Rollins, and I.F. Charo. **MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B.** *J Clin Invest*, 1999. 103(6): p. 773-8.
449. Boisvert, W.A., R. Santiago, L.K. Curtiss, and R.A. Terkeltaub. **A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.** *J Clin Invest*, 1998. 101(2): p. 353-63.
450. Galic, S., J.S. Oakhill, and G.R. Steinberg. **Adipose tissue as an endocrine organ.** *Mol Cell Endocrinol.* 316(2): p. 129-39.

451. Manning, P.J., W.H. Sutherland, M.M. McGrath, S.A. de Jong, R.J. Walker, and M.J. Williams. **Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women.** *Obesity (Silver Spring)*, 2008. 16(9): p. 2046-52.
452. Pang, S.S. and Y.Y. Le. **Role of resistin in inflammation and inflammation-related diseases.** *Cell Mol Immunol*, 2006. 3(1): p. 29-34.
453. Kaser, S., A. Kaser, A. Sandhofer, C.F. Ebenbichler, H. Tilg, and J.R. Patsch. **Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro.** *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 309(2): p. 286-90.
454. Bokarewa, M., I. Nagaev, L. Dahlberg, U. Smith, and A. Tarkowski. **Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties.** *J Immunol*, 2005. 174(9): p. 5789-95.
455. Thies, F., J.M. Garry, P. Yaqoob, K. Rerkasem, J. Williams, C.P. Shearman, P.J. Gallagher, P.C. Calder, and R.F. Grimble. **Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial.** *Lancet*, 2003. 361(9356): p. 477-85.
456. de Mello, V.D., M. Kolehmainen, U. Schwab, U. Mager, D.E. Laaksonen, L. Pulkkinen, L. Niskanen, H. Gylling, M. Atalay, R. Rauramaa, and M. Uusitupa. **Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome.** *Metabolism*, 2008. 57(2): p. 192-9.
457. Maas, K., S. Chan, J. Parker, A. Slater, J. Moore, N. Olsen, and T.M. Aune. **Cutting edge: molecular portrait of human autoimmune disease.** *J Immunol*, 2002. 169(1): p. 5-9.
458. Visvikis-Siest, S., J.B. Marteau, A. Samara, H. Berrahmoune, B. Marie, and M. Pfister. **Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs): a possible model for studying cardiovascular biology systems.** *Clin Chem Lab Med*, 2007. 45(9): p. 1154-68.



X. ANEXOS

PUBLICACIÓN DERIVADA DE LA TESIS DOCTORAL

Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study.

Cruz-Teno C, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, García-Ríos A, Marín C, Gómez P, Jiménez-Gómez Y, Camargo A, Rodríguez-Cantalejo F, Malagón MM, Pérez-Jiménez F, Roche HM, López-Miranda J.

Mol Nutr Food Res. 2012 Jun;56(6):854-65.

Área temática en la Base de Datos de referencia: Food Science and & Technology.

Índice de impacto de la revista en el año de publicación del artículo: 4.713, (Q1-D1).

Lugar que ocupa/nº de revistas del área temática: 1/128.

RESEARCH ARTICLE

Dietary fat modifies the postprandial inflammatory state in subjects with metabolic syndrome: the LIPGENE study

Cristina Cruz-Teno¹, Pablo Pérez-Martínez¹, Javier Delgado-Lista¹, Elena M. Yubero-Serrano¹, Antonio García-Ríos¹, Carmen Marín¹, Purificación Gómez¹, Yolanda Jiménez-Gómez¹, Antonio Camargo¹, Fernando Rodríguez-Cantalejo², M.M. Malagón³, Francisco Pérez-Jiménez¹, Helen M. Roche⁴ and José López-Miranda¹

¹Lipids and Atherosclerosis Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain

²Clinical Analysis Service, Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain

³Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital/University of Cordoba and CIBER Fisiopatología Obesidad y Nutrición (CIBEROBN) Instituto de Salud Carlos III, Córdoba, Spain

⁴Nutrigenomics Research Group, UCD Conway Institute, School of Public Health & Population Science, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland

Scope: Our aim was to investigate whether the inflammatory state associated to metabolic syndrome (MetS) patients is affected by diets with different fat quality and quantity.

O1 Methods and results: Seventy-five subjects from LIPGENE cohort were included in this feeding trial and randomly assigned to one of four diets: high saturated fatty acids (HSFA); high monounsaturated fatty acids (HMUFA) and two low-fat, high complex carbohydrate (LFHCC) diets, supplemented with long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LFHCC n-3) or placebo (LFHCC), for 12 weeks each. A postprandial fat challenge, reflecting the intervention dietary fat composition, was conducted post-intervention. The HMUFA diet significantly reduced postprandial nuclear transcription factor-kappaB (NF-κB) activity and the nuclear p65 protein levels relative to fasting values ($p < 0.05$). Furthermore, we observed a postprandial decrease in this protein with the HMUFA diet compared with the HSFA and LFHCC diets ($p < 0.05$). The postprandial response of inhibitory molecule from NF-κB mRNA levels increased with the HMUFA diet compared with the HSFA and LFHCC n-3 diets ($p < 0.05$). Postprandial tumor necrosis factor-α and Metalloproteinase 9 mRNA levels were also reduced after the HMUFA diet compared with the HSFA diet ($p < 0.05$).

Conclusions: Our results indicate that the long-term consumption of a healthy diet model with HMUFA attenuates the postprandial inflammatory state associated with MetS.

Keywords:

Metabolic syndrome / Inflammation / NF-κB / Postprandial state / Monounsaturated fatty acids

Received: February 12, 2012

Revised: March 13, 2012

Accepted: March 29, 2012



1 Introduction

The metabolic syndrome (MetS) is a cluster of metabolic abnormalities leading to increased risk for cardiovascular disease and diabetes type 2 [1]. Metabolic, genetic and environmental factors, in particular dietary excess, play an important role in its development and progression [2, 3]. The obese,

Q2 Correspondence: José López-Miranda, Lipids and Atherosclerosis Unit at Reina Sofia University Hospital. Avda. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba. Spain

E-mail: jlopezmir@uco.es

Fax: +34-957-204763

Abbreviations: CHO, carbohydrate; DHA, docosahexaenoic acid; E, energy; HMUFA, High monounsaturated fatty acids diet; HSFA, High saturated fatty acids diet; IκB-α, inhibitory molecule from NF-κB; IL-6, interleukin 6; IR, insuline resistance; LC, long-Chain; LFHCC, low-fat, high-complex carbohydrate diet; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MetS, metabolic syndrome; MIF,

macrophage migration inhibitory factor; MMP-9, metalloproteinase 9; NEFA, non-esterified fatty acids; NF-κB, nuclear transcription factor kappa B; n-3 PUFA, n-3 polyunsaturated fatty acids; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

insulin-resistant (IR), pro-inflammatory state are central to the disease process [1].

Obesity and IR are characterized by increased macrophage infiltration, altered cytokine production and activation of inflammatory signalling pathway in adipose tissue. In this context, previous studies have confirmed an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and adipose tissue of the obese subjects [4]. The amount and type of dietary fat, such as high intake of saturated fatty acids (SFA) has been reported to contribute to the development of components of MetS producing pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) via the nuclear transcription factor-kappaB (NF-kB) activation [1].

Inflammation at the cellular level can be described as an increase in the NF-kB (p50/p65) in the nucleus accompanied by a decrease in its inhibitors inhibitory molecule from NF-kB (I κ B- α) and/or I κ B- β [5]. NF-kB is a pleiotropic transcription factor activated by reactive oxygen species (ROS), among others, and inhibited by antioxidants [6]. This factor regulates the expression of several cytokines, chemokines, cell adhesion molecules, immunoreceptors and inflammatory enzymes [7], molecules that are involved in diseases such as atherosclerosis and IR. Previous studies have confirmed that fat consumption induced the activation of inflammatory markers during the postprandial phase [8, 9]. However, to date no study has determined the effect of a long-term dietary fat intervention on the postprandial inflammation response in subjects with MetS. In this regard, we have previously demonstrated that Mediterranean diet attenuated PBMC NF-kB activation compared with a Western SFA-rich diet in young healthy subjects [10, 11]. Interestingly, a recent study by Weldon et al. [12] demonstrated that docosahexaenoic acid (DHA) suppressed the mRNA expression and production of several pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and IL-6, in Lipopolysaccharide-stimulated human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) monocyte-derived macrophages.

On the other hand, it should be remembered that we spend most of our time in a postprandial state, with a continual fluctuation in the degree of lipemia throughout the day. In addition, previous evidence suggests that postprandial lipemia induces endothelial dysfunction [13], which is accompanied by an acute inflammatory response [14] and a pro-coagulant state [15]. For all these reasons, it is essential to know what changes are produced during the postprandial phase that is influenced by the quantity and quality of the fat ingested [16].

To this end, our aim was to determine whether the long-term consumption of four isoenergetic diets with different fat contents has a selective influence on the postprandial NF-kB activity and the related expression of pro-inflammatory genes in PBMC of MetS patients. In a next step, we explored whether plasma cytokine levels were affected by these diets.

2 Methods and Materials

2.1 Participant and recruitment

The current study was conducted within the framework of the LIPGENE study ('Diet, genomics and the metabolic syndrome: an integrated nutrition, agro-food, social and economic analysis'), a Framework 6 Integrated Project funded by the European Union. Seventy-five patients with MetS (28 males and 47 females) from LIPGENE cohort were included in the study. All participants gave written, informed consent and underwent a comprehensive medical history, physical examination and clinical chemistry analysis before enrolment. This study was carried out in the Lipid and Atherosclerosis Research Unit at the Reina Sofia University Hospital from February 2005 to April 2006. The experimental protocol was approved by the local ethic committee at each of the intervention centre, according to the Helsinki Declaration. The study was registered with The US National Library of Medicine Clinical Trials registry (NCT00429195).

2.2 Design

Each volunteer was randomly stratified to one of four dietary interventions for 12 weeks (Supporting Information Fig. 1). MetS was defined by published criteria [17] that conformed to the LIPGENE inclusion and exclusion criteria [18]. The MetS patients of our study were not taking medications for lipids and diabetes; however, 53% patients were taking medications for blood pressure. Post-intervention was administered a breakfast or test meal with the same fat composition that is consumed in each of the diets. The intervention study design and the dietary strategy protocol have been previously described in detail by Shaw et al. [18], which also provides information about the control of food consumption during intervention, adherence to the dietary advices and details of diet composition at baseline and end of intervention period. Briefly, to realize the dietary assessment volunteers completed 3-day weighed food diaries at baseline, week 6 and week 12. Weighed food intake over 2 weekdays and 1 weekend day was obtained using scales provided by the investigators. The dietary analysis program used for our centre was the 'Dietsource version 2.0'.

2.3 Randomisation and intervention

Randomisation was completed centrally, according to age, gender and fasting plasma glucose concentration using the MINIM (Minimisation Programme for Allocating patients to Clinical Trials, Dept of Clinical Epidemiology, The London Hospital Medical College, UK) randomisation programme. The composition of the four isoenergetic diets (Table 1) was as follows:

Table 1. Composition of diets pre- and post-intervention period, alongside dietary targets

Completers	HSFA Mean ± SEM	HMUFA Mean ± SEM	LFHCC Mean ± SEM	LFHCC n-3 Mean ± SEM
Pre-intervention				
N	17	18	20	20
Energy (MJ/day)	8.8 ± 0.5	8.1 ± 0.4	8.5 ± 0.4	8.8 ± 0.4
%E from fat	43.3 ± 1.3	42.8 ± 1.2	41.4 ± 1.1	45.5 ± 1.4
%E from SFA	11.6 ± 0.5	10.7 ± 0.5	10.2 ± 0.4	12.0 ± 0.4
%E from MUFA	20.9 ± 0.9	21.7 ± 0.7	20.4 ± 0.7	22.7 ± 0.9
%E from PUFA	4.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2
%E from CHO	37.6 ± 1.3	38.9 ± 1.0	40.9 ± 1.3	36.6 ± 1.7
%E from protein	17.2 ± 0.5	17.7 ± 0.7	16.6 ± 0.6	16.8 ± 0.5
Total EPA and DHA (g/day)	0.4 ± 0.06	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.07	0.4 ± 0.06
Objective				
%E from fat	38	38	28	28
%E from SFA	16	8	8	8
%E from MUFA	12	20	11	11
%E from PUFA	6	6	6	6
Total EPA and DHA (g/day)				1.24
Post-intervention				
N	17	18	20	20
Energy (MJ/day)	8.2 ± 0.4	7.7 ± 0.4	7.7 ± 0.4	9.2 ± 0.5
%E from fat	40.3 ± 0.5 ^{a)}	40.2 ± 0.7 ^{a)}	27.1 ± 0.5 ^{b)}	26.5 ± 0.5 ^{b)}
%E from SFA	17.9 ± 0.3 ^{a)}	9.1 ± 0.4 ^{b)}	6.6 ± 0.2 ^{c)}	6.4 ± 0.3 ^{c)}
%E from MUFA	12.8 ± 0.3 ^{c)}	21.1 ± 0.3 ^{b)}	11.5 ± 0.2 ^{a)}	11.1 ± 0.3 ^{a)}
%E from PUFA	6.1 ± 0.3	5.7 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.0 ± 0.2
%E from CHO	38.3 ± 1.0 ^{a)}	40.7 ± 1.0 ^{a)}	51.2 ± 1.1 ^{b)}	54.1 ± 0.9 ^{b)}
%E from protein	19.2 ± 0.7 ^{a)}	19.2 ± 0.7 ^{a)}	21.2 ± 0.9 ^{b)}	18.8 ± 0.6 ^{a)}
Total EPA and DHA (g/day)	0.42 ± 0.1 ^{a)}	0.41 ± 0.1 ^{a)}	0.47 ± 0.08 ^{a)}	1.83 ± 0.1 ^{b)}

Values are presented as the mean ± SEM of each diet group. Differences ($p < 0.05$) between diet groups were assessed by one-way ANOVA. ^{a)}, ^{b)} and ^{c)} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different. HSFA = High saturated fatty acids diet, HMUFA = High monounsaturated fatty acids diet, LFHCC = Low-fat, high-complex carbohydrate diet, LFHCC n-3 = Low-fat, high-complex carbohydrate diet with n-3 polyunsaturated fatty acids.

- High saturated fatty acids (HSFA) diet (38% energy (E): 16% SFA, 12% MUFA 6% PUFA).
- High monounsaturated fatty acids (HMUFA) diet (38% E: 8% SFA, 20% MUFA, 6% PUFA).
- Low-fat (28% E), high-complex carbohydrate (LFHCC) diet (8% SFA, 11% MUFA, 6% PUFA) with 1 g/day high-oleic sunflower oil (placebo).
- Low-fat (28% E), high-complex carbohydrate diet (8% SFA, 11% MUFA, 6% PUFA) with 1.24 g/day long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA), (LFHCC n-3).

Post-intervention period (week 12), we performed a postprandial challenge with the same fat composition as consumed during the dietary period. Patients presented at the clinical centre at 8:00 a.m following a 12-h fast, refrained from smoking during the fasting period and abstained from alcohol intake during the preceding 7 days, in the laboratory and, after cannulation a fasting blood sample was taken before the test meal, which then was ingested under supervision within 20 min. The test meal reflected fatty acid composition of each subject chronic dietary intervention. Subsequent blood samples were drawn at 2 and 4 h. Test meals provided an equal amount of fat (0.7 g/kg body weight), cholesterol (5 mg/kg of body weight) and vitamin A (62.9 μmol vitamin

A (retinol)/m² body surface area). The test meal provided 65% of E as fat, 10% as protein and 25% as carbohydrates (CHO). During the postprandial assessment, subjects rested, did not consume any other food for 9 h, but were allowed to drink water. The composition of the breakfasts was as follows: HSFA breakfast (38% SFA, 21% MUFA, 6% PUFA); HMUFA breakfast (12% SFA, 43% MUFA, 10% PUFA); LFHCC breakfast with placebo (21% SFA, 28% MUFA, 16% PUFA); LFHCC n-3 breakfast with 1.24 g of LC n-3 PUFA (21% SFA, 28% MUFA, 16% PUFA).

2.4 Measurements

2.4.1 Lipid analysis

Blood was collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to give a final concentration of 0.1% EDTA. Plasma was separated from red cells by centrifugation at 1500 × g for 15 min at 4°C.

Total cholesterol and triglycerides in plasma and lipoprotein fractions were assayed by enzymatic procedures. Apolipoprotein (apo) A-I and apo B were determined by turbidimetry [19]. High-density lipoprotein (HDL-C) was

measured by precipitation of a plasma aliquot with dextran sulphate-Mg²⁺. Low-density lipoprotein (LDL-C) was calculated using the Friedewald formula [20].

2.4.2 Plasma-soluble inflammatory markers

Plasma concentrations of IL-6, TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were determined in duplicate with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Inc.). The quantitative determination of non-esterified fatty acids (NEFA) was measured using the Free Fatty Acids Half-Micro Colorimetric kit (Roche Diagnostic).

2.4.3 Isolation of PBMC

Blood was collected in tubes containing EDTA. The blood samples were diluted 1:1 in PBS, and cells were separated in Ficoll gradient by centrifugation at $800 \times g$ for 25 min at 20°C. PBMC were collected, washed with PBS and resuspended in Trizol (Tri Reagent®, Sigma).

2.4.4 NF- κ B (p65) DNA binding activity

PBMC nuclear extracts were prepared as described by Hernández-Presa et al. [21]. Nuclear NF- κ B activity was determined using the NF- κ B (p65) Transcription Factor Assay kit (Cayman Chemical).

2.4.5 Western blotting

Cytoplasmic and nuclear lysates were prepared from PBMC as described previously [21]. Protein concentrations were determined using the two-dimensional Quant kit (GE Healthcare) with bovine serum albumin as a standard. Cytoplasmic and nuclear proteins (40 μ g) were separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. The following proteins were detected using their corresponding antibodies: I κ B- α (C-21, 36 kDa, Santa Cruz Biotechnology, CA), β -Actin (clone AC-15, 42 kDa, Sigma), p65 (C-20, 65 kDa, Santa Cruz Biotechnology) and Transcription factor IIB (TFIIB; C-18, 30 kDa, Santa Cruz Biotechnology). Immunocomplexes were detected with appropriate peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma) and detected by enhanced chemiluminescence (ECL advance; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Values for cytoplasmic I κ B- α were normalized with the signal for β -Actin and values for nuclear p65 were normalized with the signal for TFIIB. Protein levels were quantified using the image analysis software Quantity One, version 4.4.0 (BIORAD, Barcelona, Spain). Results were expressed in arbitrary units (AU).

2.4.6 Total RNA isolation and real-time (RT)-PCR

Total cellular RNA from PBMC was extracted using the Trizol method and quantified by NanoDrop 1000A Spectrophotometer. RNA integrity was verified on agarose gel electrophoresis. Next, since PCR can detect even a single molecule of DNA, RNA samples were digested in DNase I (AMPD-1, Sigma) before RT-PCR. Total RNA was reverse transcribed into cDNA using the iScript cDNA Synthesis kit (BIORAD). The expression levels of the TNF- α , IL-6, I κ B- α , p65, metalloproteinase 9 (MMP-9), macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MCP-1 genes were measured by RT PCR with the use of iQ5-BIORAD thermal cycler system. All measurements were performed in duplicate. The specificity and the size of the PCR products were tested through a melt curve and resolved on a 2% agarose gel. The expression of each target gene was normalized with the signal for the *Homo sapiens ribosomal protein L13a* gene (RPL13a). Results were expressed in AU.

2.5 Statistical analysis

Statistical analysis used SPSS statistical software, version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). All data in the text and tables are expressed as mean \pm SEM. The normal distribution of variables to characterize the postprandial response was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test and log transformed if appropriate. PBMC I κ B- α , MMP-9, IL-6, MCP-1, p65 and plasma IL-6, TNF- α were log transformed before statistical analyses. The data were analysed using one-way ANOVA, Student *t*-test for paired data analysis and repeated measures ANOVA (RM-ANOVA). In this analysis, we studied the statistical effects of time independently of diet. We also studied the statistical effects of diet, independently of the postprandial time points. Furthermore, we also studied the effect of the interaction of both factors—diet and time—which is indicative of the magnitude of the postprandial response in each meal. In this analysis, we adjusted for the covariates of gender and smoking status. Post hoc statistical analysis was completed by using the Bonferroni's test to identify significant differences between dietary treatments. A study of the relationship among parameters was also carried out using Pearson's linear correlation coefficient. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Achievement of dietary targets

Table 1 shows the composition of diets pre- and post-intervention wherein dietary targets were largely achieved. Total eicosapentaenoic (EPA) and DHA, percentage of E (%E) from SFA, MUFA and fat was log transformed before statistical analysis. There were no significant differences in dietary composition at pre-intervention period between the four diet

groups. However, during the post-intervention, %E from fat was significantly lower in the LFHCC and LFHCC n-3 diets compared with the HSFA and HMUFA diets. Also dietary SFA (%E) was significantly greater in HSFA diet compared to all other diets. MUFA levels were also greater in the HMUFA diet compared with the other diets, MUFA levels were also greater in the HSFA diet compared with the LFHCC and LFHCC n-3. %E as CHO intake was significantly greater in LFHCC and LFHCC n-3 diets compared with the HSFA and HMUFA diets. Total EPA and DHA acid (g/d) was consistently greater in the LFHCC n-3 than the other diets.

3.2 Diet intake and pro-inflammatory cytokines

Table 2 shows the characteristics pre- and post-intervention of 75 subjects with MetS, randomised to each dietary intervention. With the aim of identifying the postprandial effects of long-term consumption of four diets, on the expression of a number of inflammatory parameters in PBMC, we measured the nuclear NF- κ B activity, nuclear p65 and cytoplasmic I κ B- α protein levels. Furthermore, we analysed the transcription of pro-inflammatory genes regulated by NF- κ B at the end of dietary intervention. After 12 weeks of dietary intervention and 4 h after the fat overload with the HMUFA diet, we observed a postprandial decrease in nuclear NF- κ B activity relative to fasting values ($p = 0.027$). By contrast, this effect was not observed after the consumption of the other three diets (Figure 1A). Moreover, the postprandial decrease in nuclear NF- κ B activity was associated with a postprandial decrease in the nuclear levels of p65 ($p = 0.002$) following consumption of HMUFA diet (Figure 1B). Consistently, we observed a postprandial decrease in this protein with the HMUFA diet compared with the HSFA ($p = 0.009$) and LFHCC diets ($p = 0.003$). Moreover, we analysed cytoplasmic I κ B- α protein levels in the post-intervention period. No significant differences were found, after the ingestion of the different diets in cytoplasmic levels of I κ B- α ($p > 0.05$; data not show).

Interestingly, after long-term consumption of the HMUFA diet and 4 h after the fat overload, we observed a postprandial increase in the transcription of PBMC I κ B- α gene (Figure 2A) compared with HSFA ($p = 0.017$) and LFHCC n-3 ($p = 0.043$) diets. On the other hand, after 12 weeks of dietary intervention with the LFHCC n-3 diet and fasting (0 h), we observed the higher I κ B- α mRNA expression with this diet (Figure 2A) than did the HSFA ($p = 0.015$) and HMUFA ($p = 0.023$) diets.

Postprandial PBMC TNF- α (Figure 2B) and MMP-9 (Figure 2C) mRNA levels were reduced after intake of HMUFA diet compared with HSFA diet ($p = 0.022$ and $p = 0.05$, respectively). Moreover, the intake of the four breakfasts induced an increase in the expression of PBMC TNF- α , MMP-9 and IL-6 genes independently of the diet consumed, reflecting an acute inflammatory response during the postprandial period (Table 3). There were no significant differences in the post-

prandial PBMC p65, MIF and MCP-1 mRNA levels among the four diets (Table 3).

In the next step, we analysed plasma concentrations of IL-6, TNF- α , MCP-1 and NEFA during the post-intervention period. Postprandial plasma levels of MCP-1 (Figure 3) were reduced after intake of HMUFA ($p = 0.046$) and LFHCC n-3 ($p = 0.026$) diets compared to HSFA diet. Furthermore, 4 h after the intake of the breakfasts, we observed an increase in the postprandial plasma levels of IL-6 independently of the diet consumed (Table 3). No significant differences were found, after the ingestion of the different diets in plasma levels of TNF- α and NEFA (Table 3).

On the other hand, we have analysed the influence of gender and smoking status in our findings. In this context, we did not observe any significant differences compared with the previous analysis according these confounding factors.

3.3 Correlation analysis

We observed a positive correlation between nuclear NF- κ B (p65) activity with TNF- α gene at postprandial period (4 h; $p < 0.040$; Figure 4A). There was also a positive correlation between TNF- α mRNA expression with IL-6 gene at fasting (0 h; $p = 0.037$), and postprandial period (4 h; $p = 0.018$; Figure 4B). In addition, we found a positive correlation between TNF- α mRNA levels with MCP-1 mRNA expression at postprandial state (4 h; $p = 0.022$; Figure 4C). Furthermore, we observed a positive correlation between TNF- α mRNA levels with MMP-9 mRNA expression at fasting (0 h; $p < 0.01$; Figure 4D), and postprandial state (4 h; $p = 0.017$).

4 Discussion

The results of our study show that after long-term consumption of the HMUFA diet and 4 h after the fat overload, we observed a postprandial decrease in NF- κ B activation and in the nuclear p65 protein levels in MetS patients. Moreover, we observed a postprandial increased in the transcription of PBMC I κ B- α gene. The reduced transcriptional activity of PBMC TNF- α and MMP-9 after HMUFA diet, as reflected in decreased mRNA levels, is consistent with decreased NF- κ B binding and also with an improvement in the pro-inflammatory state of MetS patients.

The MetS is associated with unhealthy lifestyles, and its most important feature is IR. Inflammation interferes with insulin signalling and thus plays a role in the pathogenesis of MetS. Furthermore, treatment of MetS aims at ameliorating IR through lifestyle changes, including exercise and diet [1]. Williams et al. [22] showed that dietary patterns close to the MUFA-enriched Mediterranean diet could serve as an anti-inflammatory dietary pattern, which could protect from or even treat diseases that are related to chronic inflammation, including the MetS. Nevertheless, although we have observed an increase in the postprandial inflammatory response, the

Table 2. Characteristics pre- and post-intervention of subjects with the MetS assigned to each diet

Characteristics	HSFA (n = 17)	HMUFA (n = 18)	LFHCC (n = 20)	LFHCC n-3 (n = 20)	p Value
Pre-intervention					
Age, years	58.5 ± 1.9	54.6 ± 1.8	56.3 ± 1.8	55.3 ± 1.4	0.449
BMI, Kg/m ²	35.2 ± 0.9	34.4 ± 0.8	35.4 ± 0.7	35.1 ± 0.8	0.798
Systolic blood pressure (mmHg)	151.8 ± 4.2	145.1 ± 3.9	149.7 ± 3.2	149.8 ± 3.1	0.706
Diastolic blood pressure (mmHg)	89.3 ± 2.5	93.5 ± 2.4	91.3 ± 2.1	93.6 ± 1.9	0.767
Total cholesterol, mmol/L	5.2 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.3 ± 0.2	4.9 ± 0.2	0.405
Total triglycerides, mmol/L	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.654
LDL-cholesterol, mmol/L	3.5 ± 0.2	3.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.4 ± 0.2	0.374
HDL-cholesterol, mmol/L	1.1 ± 0.06	1.1 ± 0.06	1.1 ± 0.06	1.1 ± 0.05	0.834
Apo B, g/L	0.92 ± 0.04	0.89 ± 0.04	1.01 ± 0.05	0.90 ± 0.05	0.291
Apo A-1, g/L	1.33 ± 0.04	1.35 ± 0.05	1.35 ± 0.05	1.30 ± 0.04	0.876
Post-intervention					
Age, years	58.5 ± 1.9	54.6 ± 1.8	56.3 ± 1.8	55.3 ± 1.4	0.449
BMI, Kg/m ²	35.2 ± 0.9	34.8 ± 0.8	35.0 ± 0.7	34.7 ± 0.8	0.904
Systolic blood pressure (mmHg)	148.0 ± 3.6	133.7 ± 3.8	140.9 ± 3.2	143.9 ± 3.1	0.628
Diastolic blood pressure (mmHg)	87.2 ± 2.4	89.7 ± 2.2	90.3 ± 1.8	87.8 ± 2.4	0.961
Total cholesterol, mmol/L	5.1 ± 0.2	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.6 ± 0.2	0.362
Total triglycerides, mmol/L	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.614
LDL-cholesterol, mmol/L	3.4 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.4 ± 0.2	3.1 ± 0.2	0.520
HDL-cholesterol, mmol/L	1.05 ± 0.05	1.09 ± 0.06	1.05 ± 0.05	1.01 ± 0.04	0.728
Apo B, g/L	0.88 ± 0.02	0.87 ± 0.03	0.93 ± 0.04	0.85 ± 0.05	0.574
Apo A-1, g/L	1.32 ± 0.04	1.30 ± 0.05	1.24 ± 0.03	1.19 ± 0.04	0.167

Values are presented as the mean ± SEM of each diet group. The data were analysed using one-way ANOVA.

HSFA = High saturated fatty acids diet, HMUFA = High monounsaturated fatty acids diet, LFHCC = Low-fat, high-complex carbohydrate diet, LFHCC n-3 = Low-fat, high-complex carbohydrate diet with n-3 polyunsaturated fatty acids.

ingestion of a HMUFA diet, as compared to the other diets, reduced the postprandial increase of PBMC TNF- α and MMP-9 mRNA levels associated to a decrease in NF-kB activation.

In most cells, NF-kB (p50/p65) is present in an inactive form in the cytoplasm, bound to an inhibitor I κ B. Certain stimuli result in the phosphorylation, ubiquitination and subsequent degradation of I κ B proteins thereby enabling

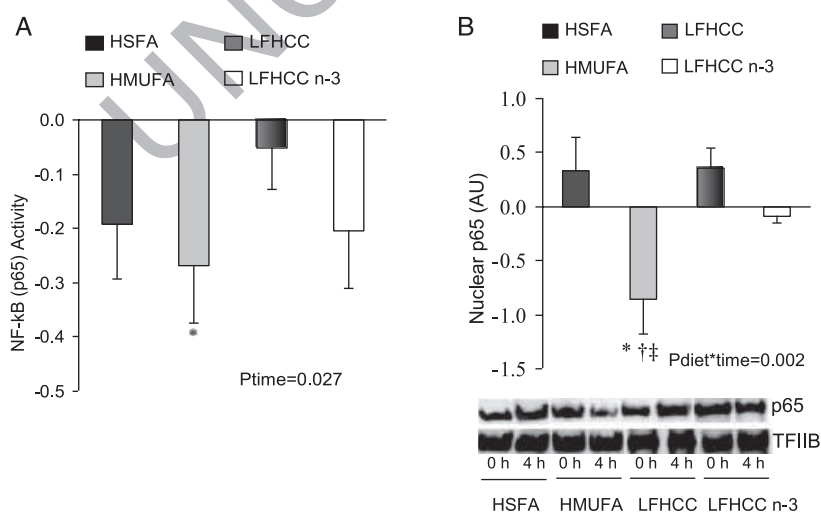


Figure 1. Postprandial changes of nuclear NF-kB (p65) activity (A) and p65 protein levels (B) in PBMC. n = 75. Data were analysed using Student *t*-test (A) and one-way ANOVA (B). Results are expressed as mean ± SEM. * *p* < 0.05: HMUFA diet, postprandial changes (time 4 h versus fasting). † HMUFA versus HSFA and ‡ HMUFA versus LFHCC diet. HSFA = High saturated fatty acids diet, HMUFA = High monounsaturated fatty acids diet, LFHCC = Low-fat, high-complex carbohydrate diet, LFHCC n-3 = Low-fat, high-complex carbohydrate diet with n-3 polyunsaturated fatty acids.

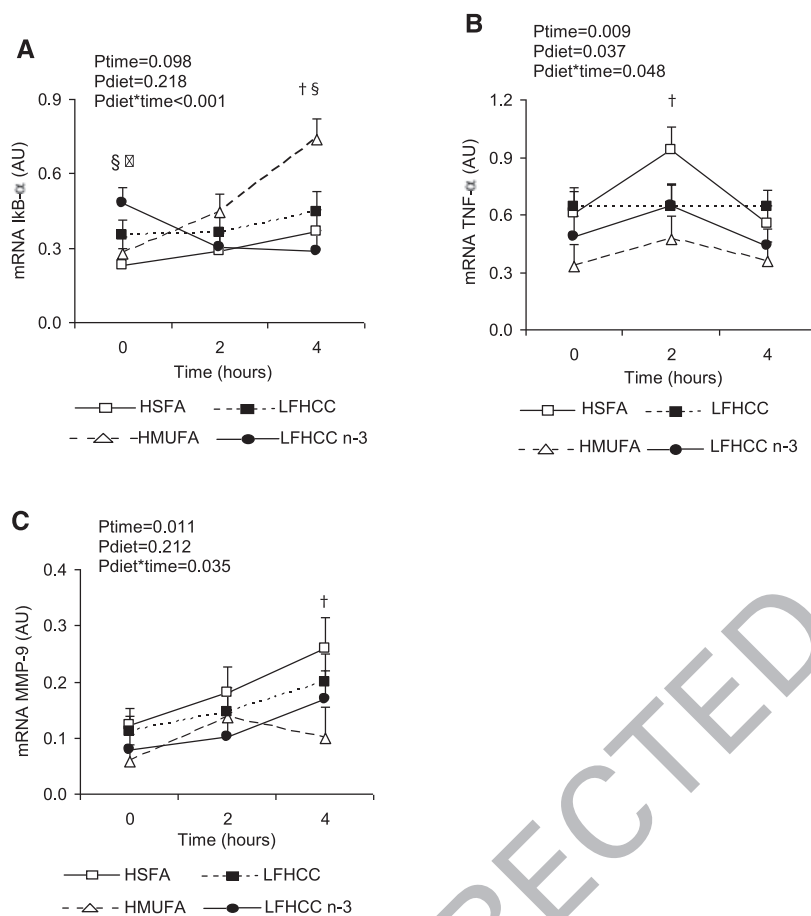


Figure 2. mRNA expression of IκB-α (A), TNF-α (B) and MMP-9 (C) measured by RT-PCR from total RNA. $n = 75$. Data were analysed using RM-ANOVA. Results are expressed in AU. $p < 0.05$: [†]HMUFA versus HSFA, [‡]LMHCC n-3 versus HSFA diet. HSFA = High saturated fatty acids diet, HMUFA = High monounsaturated fatty acids diet, LFMHCC = Low-fat, high-complex carbohydrate diet, LFMHCC n-3 = Low-fat, high-complex carbohydrate diet with n-3 polyunsaturated fatty acids.

translocation of this transcription factor into the nucleus. NF-κB bind to DNA sequences thereby regulating expression of target genes [23]. Aljada et al. [24] have demonstrated that consumption of a hyper-caloric breakfast increased the nuclear NF-κB activity, accompanied by a reduction in the cytoplasmic IκB-α expression in healthy subjects. In a similar young healthy population, we previously demonstrated a postprandial decrease in the nuclear activity of NF-κB after consumption of HMUFA rather than HSFA breakfast [10, 11]. However, at present no studies have been performed regarding the effect of long-term dietary fat in the typical pro-inflammatory environment of MetS patients. In the current study, we observed a postprandial decrease in the nuclear activity of NF-κB 4 h after consumption of the HMUFA diet. Consistently, we observed a postprandial decrease in nuclear p65 protein levels with the HMUFA diet relative to fasting values. Furthermore, we observed a postprandial decrease in this protein following consumption of HMUFA diet compared with the HSFA and LFMHCC diets. These data support previous studies suggesting that this type of fat had beneficial effect on the inflammatory profile. The duration of this pro-inflammatory effect is important because the time for another meal is generally 4–5 h after a meal, with the potential

for further NF-κB activation, ROS load and pro-inflammatory changes. It is possible that chronic postprandial state may result in permanent increases in NF-κB binding activity and in total expression as a protein in the cell [25].

Moreover, after 12 weeks of dietary intervention and 4 h after the different fat overload, we analysed cytoplasmic IκB-α protein levels in the post-intervention period and no significant differences were found. In contrast, after long-term consumption of the HMUFA diet and 4 h after the fat overload, we observed a postprandial increase in the transcription of PBMC IκB-α gene. This observation could be explained given that the transcription and translation processes do not occur concomitantly. On the other hand, it is possible that in a low-grade chronic inflammatory state, such as obesity or MetS, IκB-β might play a major role in the decrease of nuclear activity NF-κB.

Interestingly, we observed a postprandial increase in the transcription of PBMC IκB-α gene 4 h after the fat overload with the HMUFA diet, in comparison with the HSFA and LFMHCC n-3 diets. This finding could be explained by the fact that other transcription factors could be involved as modulator of IκB genes expression. Previous data suggest that different transcription factors bind to the promoters of

Table 3. Postprandial changes of inflammatory parameters in PBMC and plasma in subjects with MetS

	HSFA (n = 17)		HMUFA (n = 18)		LFHCC (n = 20)		LFHCC n-3 (n = 20)		p Values	
	Δ 2 h	Δ 4 h	Δ 2 h	Δ 4 h	Δ 2 h	Δ 4 h	Δ 2 h	Δ 4 h	time	diet
PBMC IL-6 mRNA (AU)	-0.1 ± 0.4	1.7 ± 0.8 ^{a)}	0.9 ± 0.4	2.8 ± 0.8 ^{a)}	0.2 ± 0.4	1.6 ± 0.7 ^{a)}	-0.2 ± 0.4	1.1 ± 0.7 ^{a)}	<0.001	0.281
PBMC MCP-1 mRNA (AU)	0.2 ± 0.7	0.6 ± 0.8	-0.1 ± 0.7	-0.2 ± 0.8	-0.2 ± 0.7	0.5 ± 0.7	-1.2 ± 0.7	-0.3 ± 0.7	0.106	0.631
PBMC p65 mRNA (AU)	-0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.3	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.3	-0.03 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.509	0.711
PBMC MIF mRNA (AU)	0.1 ± 0.2	-0.04 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	-0.05 ± 0.2	0.001 ± 0.2	-0.2 ± 0.2	-0.3 ± 0.2	0.414	0.479
plasma IL-6 (pg/mL)	0.5 ± 0.5	2.1 ± 0.7 ^{a)}	1.3 ± 0.4	2.0 ± 0.6 ^{a)}	0.6 ± 0.4	2.5 ± 0.6 ^{a)}	1.01 ± 0.4	2.8 ± 0.6 ^{a)}	<0.001	0.831
plasma TNF-α (pg/mL)	-0.02 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-0.2 ± 0.1	-0.02 ± 0.1	-0.005 ± 0.1	-0.1 ± 0.1	-0.1 ± 0.1	0.899	0.356
plasma NEFA (mM)	-0.3 ± 0.04 ^{a)}	-0.05 ± 0.06	-0.2 ± 0.04 ^{a)}	-0.02 ± 0.06	-0.3 ± 0.04 ^{a)}	0.02 ± 0.05	-0.3 ± 0.04 ^{a)}	-0.07 ± 0.05	<0.001	0.752

Values are presented as the mean ± SEM of postprandial changes (Δ) relative to fasting values in each diet group. The data were analysed using RM-ANOVA.

a) $p < 0.05$: Postprandial changes (Δ) relative to fasting values in each diet group.

AU = Arbitrary units, HSFA = High saturated fatty acids diet, HMUFA = High monounsaturated fatty acids diet, LFHCC = Low-fat, high-complex carbohydrate diet, LFHCC n-3 = Low-fat, high-complex carbohydrate diet with n-3 polyunsaturated fatty acids.

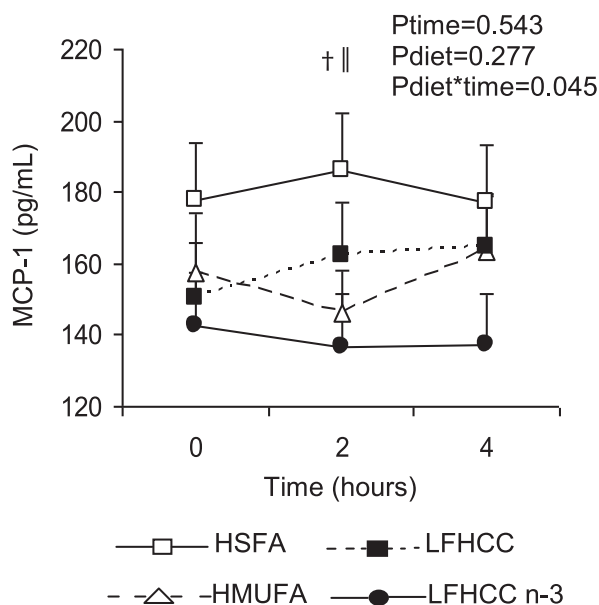


Figure 3. Plasma levels of MCP-1 measured by ELISA. $n = 75$. Data were analysed using RM-ANOVA. Result is expressed in pg/mL. $p < 0.05$: *HMUFA versus HSFA and †LHFCC n-3 versus HSFA diet. HSFA = High saturated fatty acids diet, HMUFA = High monounsaturated fatty acids diet, LHFCC = Low-fat, high-complex carbohydrate diet, LHFCC n-3 = Low-fat, high-complex carbohydrate diet with n-3 polyunsaturated fatty acids.

genes belong to the I κ B family up-regulating I κ B expression [26–28]. We speculated that these transcription factors would be modulated by the long-term consumption of MUFA. One of these transcription factors could be members of the forkhead box transcription factor O (FoxO) family, although these aspects need further investigation [26–28]. The newly synthe-

sized I κ B- α can release p50/p65 heterodimers from kB sites and then induce transport of these bound heterodimers from the nucleus into the cytoplasm, thereby restoring its inactive state and in consequence, inhibiting the inflammatory response [29].

Emerging knowledge of key pathogenic mechanisms suggests that TNF- α is related to MetS [30]. In endothelial cells, TNF- α induces a decrease in the expression of the insulin receptor itself, in addition to causing a reduction in tyrosine phosphorylation of the insulin receptor [31] as well as a reduction in the expression of glucose-insulin-sensitive (GLUT-4) receptors. We observed that long-term consumption of HMUFA diet reduced the postprandial TNF- α mRNA levels in PBMC relative to HSFA diet. Elevated postprandial TNF- α mRNA expression has been observed in healthy subjects following a HSFA diet [32]. Previous studies have confirmed an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines in PBMC and adipose tissue of the obese subjects [4]. PBMC are known to migrate to the arterial wall to form foam cells in atherosclerotic lesions and into adipose tissue to activate adipocytes into producing pro-inflammatory cytokines [4]. The infiltration of adipose tissue by macrophages is strongly correlated with BMI in humans. Adipose tissue itself or the infiltrating macrophages are able to secrete pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , which promote production of adipokines [33]. Furthermore, TNF- α stimulates lipolysis that in turn promotes the development of the IR, hyperinsulinemia and high blood pressure [34]. Thus, it became evident that the overproduction of TNF- α in adipose tissue could be one link between obesity and IR and ultimately playing a major role in the development of MetS [35]. Some evidence in humans indicates that obesity and IR are associated with activation of PBMC and changing in the expression of a variety of cytokines genes related to inflammation and the immune response [5, 36, 37]. In our study, we observed

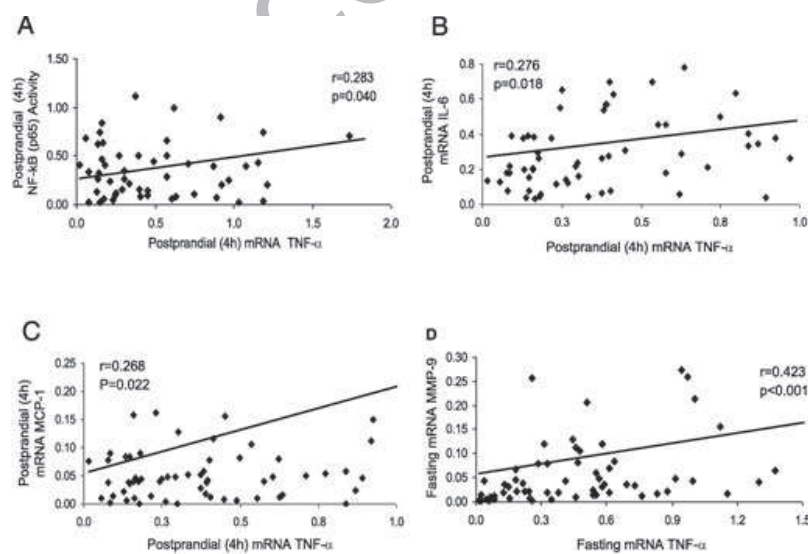


Figure 4. Correlation between nuclear NF- κ B (p65) activity and TNF- α mRNA expression at 4 h of postprandial period (A). Correlation between TNF- α mRNA levels with IL-6 (B) and MCP-1 (C) genes at postprandial state (4 h). Correlation between TNF- α mRNA expression with MMP-9 gene at fasting (D).

a beneficial effect of the HMUFA diet compared with HSFA diet on PBMC TNF- α expression, however, no significant differences were found in plasma levels. This fact could be explained given that the plasma half-life of TNF- α is short [38]. On the other hand, there exist different time course for the synthesis and secretion of this protein [32, 39] and/or different additional regulatory mechanisms acting on the secretory pathway. Recent studies have revealed that newly synthesized cytokines can be routed via compartments such as recycling endosomes prior to their secretion [40].

Another interesting factor is MMP-9, which is involved in several stages of atherosclerosis through remodelling of the extracellular matrix. Foam cells segregate a greater amount of MMP-9 in response to oxidised lipoproteins and cytokines [41]. The expression of MMP-9 in atherosclerotic plaques coincides with the production of free radicals [42], which are found in greater quantity in MetS patients. Moreover, MMP-9 might be a potential mediator of the NADPH oxidase dependent ROS production in the atherosclerotic process and previous studies suggested that NADPH oxidase activity increase significantly after consumption of a hypercaloric breakfast [24]. Robert et al. [43] observed a lower level of plasma MMP-9 in MetS patients after they had consumed a healthy diet and taken exercise for 21 days. In our study, we observed a reduction in postprandial MMP-9 mRNA levels following long-term consumption of HMUFA diet, and a postprandial increase after HSFA diet in PBMC. The mechanism responsible for rises in the levels of TNF- α and MMP-9 with HSFA diet could be the increase in ROS production inducing the activation of the inflammatory response when this type of fat is consumed. Furthermore, TNF- α has been shown to induce MMP-9 expression, however, the inductive mechanisms of MMP-9 by TNF- α remain unclear [44].

We have also studied the gene expression and plasma levels of MCP-1. MCP-1 is involved in several stages of atherosclerosis and regulates the transmigration of monocytes and other mononuclear cells on inflammatory sites [45]. In our study, we observed a postprandial decrease in plasma levels of MCP-1 following long-term consumption of HMUFA and LFHCC n-3 diets compared to HSFA diet. However, when we analysed the MCP-1 mRNA levels, we did not observe any significant differences between diets. This observation could be explained as MCP-1 can be expressed by PBMC and/or by macrophages infiltrated in adipose tissue, among other cell types. The increased levels of this chemokine could be due to the expression of different cell types, especially macrophages infiltrated in adipose tissue, since the patients in our study have abdominal obesity and MetS [46].

On the other hand, we observed a postprandial increased of TNF- α , MMP-9 and IL-6 mRNA levels, in addition to IL-6 plasma levels, independently of the type of diet consumed. We also observed a positive relationship between the expression of TNF- α with MMP-9, IL-6 and MCP-1 mRNA expressions, in addition to nuclear NF- κ B (p65) activity in the postprandial period. These results are consistent with the induction of an inflammatory response during the postprandial period and

raise fundamental issues about the relation between food intake, oxidative damage, inflammation and atherosclerosis [24].

This study suggest that PBMC may provide a representative view of the inflammatory status in terms of activation of transcription factor, inflammatory markers in plasma and expression of pro-inflammatory genes in patients with MetS. Macronutrient intake induce a pro-oxidant state that is accompanied by an increase in biomarkers inflammation, cell adhesion molecules and endothelial dysfunction, while all these factors involved in the genesis of atherosclerosis. These effects are magnified in subjects with abdominal obesity and IR as patients with MetS. Thus, PBMC may be used as a model to evaluate systemic inflammation and its relationship to IR in obese and MetS patients [5].

Chronic or long-term diet ingestion thus results in a more faithful translation of the effects of the different dietary models, in that meal consumption is not an isolated phenomenon. This study does have certain limitations. Ensuring adherence to dietary instructions is difficult in a feeding trial. In this context, in our study the adherence to recommended dietary patterns was good, as judged by measurements of compliance. On the other hand, this design has the strength of reproducing real-life conditions with home-prepared foods, reflecting the subjects' usual practice. Another limitation in our study is concerning the sample size. Our cohort is very well characterized in terms of our metabolic phenotyping. However, our results belong to a single study and new more evidences are needed in order to confirm our findings.

In conclusion, this study has demonstrated that dietary fat modulates the inflammatory response in MetS patients. The long-term consumption of a healthy diet model with HMUFA attenuates the postprandial inflammatory state associated with MetS. These novel findings support recommendations to consume this dietary pattern as a useful preventive measure against the chronic inflammation that underlies in MetS patients.

This study was supported in part by research grants from the European community (LIPGENE European Integrated Project-505944), Consejería de Salud (07/43, PI-0193/2009), Consejería de Innovación, Proyecto de investigación de excelencia, Junta de Andalucía (P06-CTS-01425), the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2006–01979/ALI and AGL2009–12270) and the Spanish Ministry of Health (CB06/03/0047 (CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición is an initiative of ISCIII)). Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

We thank to M José Gómez-Luna for technical support.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Fulop, T., Tessier, D., Carpentier, A., The metabolic syndrome. *Pathol. Biol.* 2006, 54, 375–386.

- [2] Phillips, C., Lopez-Miranda, J., Perez-Jimenez, F., McManus, R. et al., Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* 2006, 21, 185–193.
- [3] Pereira, M. A., Jacobs, D. R. Jr, Van Horn, L., Slattery, M. L. et al., Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA Study. *J. Am. Med. Assoc.* 2002, 287, 2081–2089.
- [4] Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M. et al., Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003, 112, 1796–1808.
- [5] Ghanim, H., Aljada, A., Hofmeyer, D., Syed, T. et al., Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* 2004, 110, 1564–1571.
- [6] Mantena, S. K., Katiyar, S. K., Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signalling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 2006, 40, 1603–1614.
- [7] Piva, R., Belardo, G., Santero, M. G., NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxid. Redox Signal.* 2006, 8, 478–486.
- [8] Nappo, F., Esposito, K., Cioffi, M., Giugliano, G. et al., Postprandial endothelial activation in healthy subjects and type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002, 39, 1145–1150.
- [9] Jellema, A., Plat, J., Mensink, R. P., Weigh reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004, 34, 766–773.
- [10] Perez-Martinez, P., Lopez-Miranda, J., Blanco-Colio, L., Bellido, C. et al., The chronic intake of a Mediterranean diet enriched in virgin olive oil, decreases nuclear transcription factor kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells from healthy men. *Atherosclerosis* 2007, 194, 141–146.
- [11] Bellido, C., Lopez-Miranda, J., Blanco-Colio, L. M., Perez-Martinez, P. et al. Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy male. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 1487–1491.
- [12] Weldon, S. M., Mullen, A. C., Loscher, C. E., Hurley, L. A. et al., Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J. Nutr. Biochem.* 2007, 18, 250–258.
- [13] Kugiyama, K., Doi, H., Motoyama, T., Soejima, H. et al., Association of remnant lipoprotein levels with impairment of endothelium-dependent vasomotor function in human coronary arteries. *Circulation* 1998, 97, 2519–2526.
- [14] Van Oostrom, A. J., Van Wijk, J., Cabezas, M. C., Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs* 2004, 64(Suppl 2), 19–41.
- [15] Miller, G. J., Cooke, C. J., Nanjee, M. N., Howarth, D. J. et al., Factor VII activation, apolipoprotein A-I and reverse cholesterol transport: possible relevance for postprandial lipaemia. *Thromb. Haemost.* 2002, 87, 477–482.
- [16] Kolovou, G. D., Mikhailidis, D. P., Kovar, J., Lairon, D. et al., Assessment and clinical relevance of non-fasting and postprandial triglycerides: an expert panel statement. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2011, 9, 258–270.
- [17] Grundy, S. M., Brewer, H. B. Jr., Cleeman, J. I., Smith, S. C. Jr. et al., National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24, 13–18.
- [18] Shaw, D. I., Tierney, A. C., McCarthy, S., Upritchard, J. et al., LIPGENE food-exchange model for alteration of dietary fat quantity and quality in free-living participants from eight European countries. *Br. J. Nutr.* 2009, 101, 750–759.
- [19] Riepponen, P., Marniemi, J., Rautaoja, T. Immunoturbidimetric determination of apolipoproteins A-1 and B in serum. *Scand. J. Clin. Invest.* 1987, 47, 739–744.
- [20] Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972, 18, 499–502.
- [21] Hernandez-Presa, M., Bustos, C., Ortego, M., Tuñon, J. et al., Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997, 95, 1532–1541.
- [22] Williams, D. E., Prevost, A. T., Whiclow, M. J., Cox, B. D. et al., A cross-sectional study of dietary patterns with glucose intolerance and other features of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 2000, 83, 257–266.
- [23] Courtois, G., Gilmore, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 2006, 25, 6831–6843.
- [24] Aljada, A., Mohanty, P., Ghanim, H., Abdo, T. et al., Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 682–690.
- [25] Esposito, K., Nappo, F., Marfella, R., Giugliano, G. et al., Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002, 106, 2067–2072.
- [26] Lin, L., Hron, J. D., Peng, S. L., Regulation of NF-kappaB Th activation and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a. *Immunity* 2004, 21, 203–213.
- [27] Lin, L., Brody, S. L., Peng, S. L. Restraint of B cell activation by Foxj1-mediated antagonism of NF-kB and IL-6. *J. Immunol.* 2005, 175, 951–958.
- [28] Zhou, W., Cao, Q., Peng, Y., Zhang, Q. et al., FoxO4 inhibits NF-kB and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology* 2009, 137, 1403–1414.
- [29] Sun, Z., Andersson, R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 2002, 18, 99–106.
- [30] Xydakis, A. M., Case, C. C., Jones, P. H., Hoogeveen, R. C. et al., Adiponectin, inflammation, and the expression of the metabolic syndrome in obese individuals: the impact

- of rapid weight loss through caloric restriction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, *89*, 2697–703.
- [31] Aljada, A., Ghanim, H., Assian, E., Dandona, P., Tumor necrosis factor- α inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells. *Metabolism* 2002, *51*, 487–491.
- [32] Jimenez-Gomez, Y., Lopez-Miranda, J., Blanco-Colio, L. M., Marin, C. et al., Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men. *Atherosclerosis* 2009, *204*, 70–76.
- [33] Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., Spiegelman, B. M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 1995, *95*, 2409–2415.
- [34] Porter, M. H., Cutchins, A., Fine, J. B., Bai, Y., DiGirolamo, M. Effects of TNF- α on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat-cell preparations. *J. Lab. Clin. Med.* 2002, *139*, 140–146.
- [35] Sonnenberg, G. E., Krakower, G. R., Kissebah, A. H. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes. Res.* 2004, *12*, 180–186.
- [36] de Mello, V. D., Kolehmainen, M., Schwab, U., Peger, U. et al., Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008, *57*, 192–199.
- [37] O'Rourke, R. W., Kay, T., Lyle, E. A., Traxler, S. A. et al., Alterations in peripheral blood lymphocyte cytokine expression in obesity. *Clin. Exp. Immunol.* 2006, *146*, 39–46.
- [38] Futterman, L. G., Lemberg, L., High-sensitivity C-reactive protein is the most effective prognostic measurement of acute coronary events. *Am. J. Crit. Care.* 2002, *11*, 482–486.
- [39] Meneses, M. E., Camargo, A., Pérez-Martínez, P., Delgado-Lista, J. et al., Postprandial inflammatory response in adipose tissue of patients with metabolic syndrome after intake of different dietary models. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, *55*, 1759–1770.
- [40] Stow, J. L., Ching Low, P., Offenhauser, C., Sagermani, D. L., Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology* 2009, *214*, 601–612.
- [41] Rodríguez, J. A., Orbe, J., Páramo, J. A., Metaloproteasas, remodelado vascular y síndromes aterotrombóticos. *Páramo Rev. Esp. Cardiol.* 2007, *60*, 959–967. [Spanish].
- [42] Zalba, G., Fortuño, A., Orbe, J., San José, G. et al., Phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production stimulates matrix metalloproteinase-9: implications for human atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007, *27*, 587–593.
- [43] Roberts, C. K., Won, D., Pruthi, S., Kurtovic, S. et al., Effect of a short-term diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation, MMP-9, and monocyte chemotactic activity in men with metabolic syndrome factors. *J. Appl. Physiol.* 2006, *100*, 1657–1665.
- [44] Lee, C. W., Lin, C. C., Lin, W. N., Liang, K. C. et al. TNF- α induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF- κ B/p300 binding in human trachea smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007, *292*, 799–812.
- [45] Krishnaswamy, G. et al., Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 1999, *19*, 91–104.
- [46] Galic, S., Oakhill, J. S., Steinberg, G. R., Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell Endocrinol.* 2010, *316*, 129–139.

Q7



FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE ARTERIOSCLEROSIS
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ARTERIOSCLEROSIS

El Comité Científico de la Sociedad Española de Arteriosclerosis
y el Comité Organizador del XXII Congreso Nacional
han decidido otorgar, por su calidad científica,

MENCIÓN ESPECIAL 2009 ^(27/30)
MEJORES COMUNICACIONES PRESENTADAS
EN EL XXII CONGRESO NACIONAL S.E.A.
PAMPLONA 2009

a la comunicación

**INFLUENCIA DEL TIPO DE GRASA DE LA DIETA
SOBRE LA EXPRESIÓN POSTPRANDIAL DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA
EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO.**

presentada por los autores:

**Cruz-Teno C[a], Camargo A[a],
Gómez MJ[a], Lora-Aguilar P[a],
Marín C[a],[]Rodríguez F[b],
Roche H[c], Pérez-Jiménez F[a]
y López-Miranda J[a].**


CIBER. Fisiopatología, Obesidad y Nutrición. Instituto de Salud Carlos III.

[a] Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis,
Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España.

[b] Departamento de Bioquímica,
Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España.

[c] Nutrigenomics Research Group, UCD Conway Institute,
University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Republic of Ireland.


Jesús Mitán Núñez-Cortés
Presidente S.E.A.


Miguel Pocovi Mieras
Vicepresidente Área Científica S.E.A.

